



Plaguicidas polares en el medio ambiente: análisis, presencia y evaluación de riesgo

Marianne Alejandra Köck Schulmeyer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de doctorado
"Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució"

PLAGUICIDAS POLARES EN EL MEDIO AMBIENTE: ANÁLISIS, PRESENCIA Y EVALUACIÓN DE RIESGO

Memoria presentada para optar al título de
Doctora por la Universidad de Barcelona

Marianne Alejandra Köck Schulmeyer

Tutora:

Director:

Co-directora:

Dra. Mercé Granados Juan

Prof. Damià Barceló i
Cullerés

Dra. Miren López de Alda
Villaizán

Profesora Titular

Profesor de Investigación

Investigador Científico

Dep. Química Analítica

Dep. de Química Ambiental

Dep. de Química Ambiental

Universidad de Barcelona

IDAEA-CSIC

IDAEA-CSIC

Barcelona, 7 de mayo de 2014

*Seis honrados servidores me
enseñaron cuanto sé; sus nombres son
cómo, cuándo, dónde, qué, quién y por qué.*

Rudyard Kipling

(1865-1936)

Novelista británico

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la ayuda financiera otorgada por la Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya y el Fondo Social Europeo mediante una beca predoctoral para la formación de personal investigador (FI-DGR-2010) y una beca para realizar estancias breves en el extranjero (2011 BE-00148) y con el soporte económico proporcionado por el Ministerio de Economía y Competitividad mediante los proyectos CEMAGUA (CGL2007-64551/HID), SOSTAQUA (Proyecto CENIT - CEN 20071039) y SCARCE (Consolider-Ingenio CSD2009-00065). El trabajo desarrollado también ha sido parcialmente financiado por la Agencia Catalana del Agua (ACA) y por los proyectos europeos, ENSAT (009/RNO8/-01.1), VIECO (009/RNO8/-01.1) y ECOTOXTOOLS (PTDC/AAC-AMB/103547/2008).

Diseño de la portada: Marianne Köck Schulmeyer

Fotografías: Marianne Köck Schulmeyer

AGRADECIMIENTOS

En estas pocas líneas dejo aquí mis agradecimientos:

Al Prof. Damià Barceló y la Dra. Miren López de Alda por darme la oportunidad de desarrollar mis estudios de doctorado bajo su supervisión.



A la Dra. Mercè Granados por su tutoría por parte de la Universidad de Barcelona.



Al Prof. Bart Koelmans de la Wageningen University (Holanda) por permitirme realizar una estancia pre-doctoral bajo su supervisión.



A todos los colegas, compañeros y amigos del CSIC por la colaboración, ayuda, compañerismo, amistad y soporte técnico.



A todas las otras instituciones (ACA, ICRA, AGBAR) por financiar y/o colaborar en los estudios y así hacer posible el desarrollo de mi tesis doctoral.



A la AGAUR por el soporte financiero mediante dos becas: una beca FI para estudios predoctorales y una beca BE para estancias en el extranjero.



Finalmente, gracias a mi familia, amigos y en especial a Samuel Jiménez por el apoyo en todo momento.

SUMMARY

The excessive use of pesticides in the world during the last years (there is more than 500 pesticide active ingredients only in Europe) has had a positive effect at the level of crop production and control of transmission of disease through insects; however, it has also caused damage to both humans and in the environment. As a result, the study of pesticides in different environmental compartments has become a matter of paramount importance not only to assess and to manage their use for agricultural purposes, but also because the effects of pesticides on organisms and the environment are a warning of the possible implications for human health. In this context, the presence of up to 26 pesticides and transformation products (herbicides, insecticides and fungicides) belonging to 7 different chemical families was evaluated in wastewater, surface water, groundwater, drinking water (all from Catalonia, NE Spain) and sediments (from Spain). In addition, their environmental impact assessed through the performance of toxicity studies, the development of predictive models, and the calculation and design of environmental risk indices (one of them created during the Doctoral Thesis) was also evaluated.

The analysis of pesticides and their transformation products in the different environmental compartments requires sophisticated analytical techniques, techniques that are constantly evolving to meet the challenge of analyzing environmental contaminants at the parts per trillion (ppt) levels or less. The developed methods in this Thesis were based on the use of *on-line* solid phase extraction (SPE) and pressurized liquid extraction (PLE) for the analysis of water and sediment samples respectively, in both cases followed by liquid chromatographic analysis coupled to tandem mass spectrometry detection (LC-MS/MS).

The use of the isotope dilution technique for quantification of the pesticides allowed good validation parameters. Relative recoveries (RR) between 80 and 120%, relative standard deviations (RSD) lower than 30% using matrices with low or no organic matter and linear calibration curves (r^2 : 0,993-1,000). With wastewater samples the spectrum of RR and RSD increased according to the complexity of the matrix, but always maintaining RSDs below 30%. For sediment samples, RRs were $100 \pm 30\%$, with few exceptions. Moreover, the use of only 5 mL of water and 1.5 g of sediment to analyze target compounds in the range of ng/L and ng/g, respectively, make clear the high sensitivity of the methods. Most of the limits of determination (Ldet) for the five different water matrices studied were between 1 and 10 ng/L, whereas in the case of the analysis of sediment, most Ldet were between 0.1 and 1 ng/g. The use of isotopically labeled compounds as internal standards (surrogates), the appropriate selection of the fragments for selected reaction monitoring (SRM) MS/MS and the use of the limit of determination (limit of quantification with guaranteed confirmation by the second transition) for compound positive identification and quantification provided adequate reliability of the results.

The most ubiquitous pesticides detected in urban areas were diazinon, diuron and terbuthylazine. Diazinon was also the pesticide presenting the highest concentrations. In rice growing areas MCPA, molinate and bentazone (widely used herbicides in rice cultivation) presented the highest ubiquity and concentrations. Malathion was also detected at high concentrations in both water samples and seafood in these areas. On the other hand, the presence of pesticides in groundwater in Catalonia was found to be determined not only by the activities conducted in the area, but also by the degree of soil irrigation, the GUS index and the depth of the water sampling points. In Lleida (intensive agricultural area), greatly affected by pesticides pollution, the most ubiquitous pesticides were atrazine and simazine (banned since 2004). These findings correlate well with the high GUS index of these herbicides, followed by diuron, herbicide widely used too.

From a regional perspective, the studies showed that the main factors contributing to an increase in the frequency of detection of pesticides in a given environmental aquatic compartment include: specific physico-chemical properties of pesticides, intensive land use, and high level of irrigation. Moreover, the low ubiquity of some pesticides (cyanazine, metolachlor, molinate, linuron) seems to be related to restrictive regulations and to their usage characteristics (e.g. pesticides used in a few type of crops are less likely to be found than pesticides used in several type of crops).

Studies conducted in four wastewater treatment plants (WWTPs) have highlighted not only the presence of high concentrations of pesticides in urban areas (> 500 ng/L of individual pesticides), but also their poor removal during wastewater treatment. Pesticide levels were often higher in the effluent when compared to the corresponding levels in the influent of the WWTP. This behaviour suggests possible deconjugation, hydrolysis and/or desorption (from organic matter) of the contaminants during their passage through the different treatments. Tertiary treatments and their products (reclaimed water) were also evaluated, revealing the inefficiency of some treatments (i.e. coagulation, flocculation, decantation, chlorination, UV radiation and microfiltration) and consequently the poor quality of reclaimed waters. However, the use of such reclaimed water to maintain minimum flows of the Llobregat River (reuse study) does not seem to affect significantly and negatively neither the quality of the river water nor the efficiency of the drinking water treatment plant (DWTP) located downstream.

Studies regarding artificial aquifer recharge revealed that percolation through a reactive layer prepared with fresh compost during the recharge process increases the quality of the recharge water and can be used to treat and recover surface and eventually waste waters. This is possible because the use of this type of reactive layer improves contaminant removal through adsorption / degradation and redox processes through transport to deeper waters.

Regarding the general state of the waters, 19 of the 22 pesticides studied in natural waters (groundwater and surface water) or in treated or reclaimed waters, exceeded at least once the reference level of 100 ng/L. In addition, and 16% of the analysed water samples exceeded the reference level of 500 ng/L for the sum of pesticides. The only pesticides that never presented values above 100 ng/L were the herbicides isoproturon and mecoprop, and cyanazine, prohibited since 2002. Regarding the EQS for priority compounds in surface waters (Directive 2013/39/EC), only alachlor exceeded the maximum allowable concentration (MAC) established by the European Community.

Finally, all environmental risk assessment (ERA) studies conducted during this thesis showed consistent and valuable results that evidenced the influence of pesticides on the quality status of the water bodies. All these studies point to pesticides as one stressors in the aquatic environment, especially 8 of them in the following order: diazinon, malathion, diuron, terbuthylazine, simazine, atrazine, isoproturon, and chlortoluron. All these pesticides are included in the list of priority compounds (Water Framework Directive), being included as well in rankings prioritization of classical and emerging organic contaminants in water (von der Ohe et al. 2011).

As a result of the various studies conducted within this Thesis, the following actions are recommended for improvement of the current water quality status: more quality control on the discharge of treated and reclaimed water, prohibit pesticides estimated to be highly toxic (starting with diuron, malathion and terbuthylazine), increase control over the trade and use of banned pesticides (starting with diazinon), use more effective water purification techniques for organic contaminants removal in WWTPs, study the transformation products of pesticides (most times more toxic than native compounds); promote the use of reactive layers in artificial recharge processes, and finally, promote more ERA studies on pesticides effects in the environment and human health.

TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA	15
1. Objetivos	17
2. Estructura	18
CAPÍTULO 1: Introducción	21
1.1. Introducción	23
1.2. Los plaguicidas en el contexto ambiental	26
1.3. Los plaguicidas en el contexto científico	32
1.4. Evaluación del riesgo ambiental	34
1.5. Legislación	37
1.6. Análisis de plaguicidas en el medio ambiente	41
1.6.1. Toma y conservación de muestras ambientales	41
1.6.2. Pre-tratamiento de las muestras	43
1.6.3. Extracción de muestras	44
1.6.4. Análisis de las muestras	53
1.7. Compuestos investigados	60
CAPÍTULO 2: Metodologías analíticas	77
2.1. Introducción y objetivos	79
2.2. Resultados	79
2.2.1. Análisis de 22 plaguicidas en aguas	79
2.2.2. Análisis de 26 plaguicidas en sedimento	89
<i>Publicación científica #1: Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry</i>	89
2.2.3. Análisis de un cocktail de contaminantes orgánicos seleccionados, incluyendo varios plaguicidas, en aguas y sedimentos	104
2.3. Discusión de los resultados	108
2.3.1. Fragmentación	110
2.3.2. Análisis	118

2.3.3. Validación	120
2.3.4. Comparativa entre las metodologías desarrolladas	128
CAPÍTULO 3: Plaguicidas en aguas residuales	137
3.1. Introducción y objetivos	139
3.2. Presencia, comportamiento y relevancia ambiental de plaguicidas en EDARs.	141
Publicación científica #2: <i>Occurrence and behaviour of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact</i>	141
3.3. Evaluación del impacto de la re-utilización de aguas residuales tratadas	157
Publicación científica #3: <i>Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain)</i>	157
3.3.1. Estudios complementarios	177
3.4. Discusión de los resultados	178
3.4.1. Presencia y eliminación de plaguicidas en las EDARs.	178
3.4.2. Tratamientos terciarios en las EDARs	181
3.4.3. Sobre la cantidad y calidad de las aguas regeneradas.....	186
CAPÍTULO 4: Plaguicidas en aguas y sedimentos continentales.....	191
4.1. Introducción y objetivos	193
4.2. Estudio de la presencia de plaguicidas en agua superficial	197
4.2.1. Caso de estudio: el Delta del Ebro	197
Publicación científica #4: <i>Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain)</i>	197
4.2.2. Caso de estudio: tramo bajo del río Llobregat	211
Publicación científica #5: <i>Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain)</i>	211
4.3. Estudio de la presencia de plaguicidas en aguas subterráneas	225
4.3.1. Presencia y distribución de plaguicidas en aguas subterráneas de Cataluña	226
Publicación científica #6: <i>Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain)</i>	226
4.3.2. Estudio del comportamiento de plaguicidas en procesos de recarga artificial de acuíferos: estudio de campo en San Vicenç dels Horts (tramo bajo/delta del Llobregat).....	258
4.4. Estudio de la presencia de plaguicidas en sedimentos.....	274

4.5. Discusión de los resultados	277
4.5.1. Los plaguicidas y las actividades realizadas en la zona	278
4.5.2. El transporte de los plaguicidas a las aguas subterráneas	281
4.5.3. Los plaguicidas y su interacción con el sedimento	285
4.5.4. Análisis global de los resultados.....	287
CAPÍTULO 5: Evaluación del riesgo ambiental	291
5.1. Introducción y objetivos	293
5.2. Delta del Ebro: toxicidad real y toxicidad estimada asociada a los plaguicidas en tres organismos acuáticos.....	297
5.2.1. Resultados	299
5.3. Río Llobregat: evaluación del riesgo asociado a los plaguicidas mediante el índice PRISW-1.....	303
5.3.1. Resultados	306
5.4. EDARs: estudio del impacto de las aguas residuales en el medio acuático receptor mediante el índice ERPWI.....	309
5.4.1. Resultados	311
5.5. Predicción de niveles de contaminación en el río Llobregat.....	314
5.5.1. Resultados	316
5.6. Modelo dinámico medioambiental del río Llobregat.....	318
5.6.1. Resultados	321
5.7. Discusión de los resultados	323
5.7.1. Los plaguicidas más relevantes.....	323
5.7.2. Las NCA y el riesgo ambiental	324
CAPÍTULO 6: Conclusiones.....	329
BIBLIOGRAFIA	335
ANEXOS	363
ANEXO I: Índice de abreviaturas y acrónimos.....	365
ANEXO II: Índice de tablas.....	371
ANEXO III: Índice de figuras	373

PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA



1. Objetivos

Los plaguicidas se diseñaron para proteger a las plantas, los cultivos, el ganado, los animales, los materiales de construcción y también el ser humano frente a distintos tipos de plagas. Sin embargo, el aumento de la población mundial ha conllevado un uso extenso y excesivo de los plaguicidas, resultando en niveles cada vez más preocupantes de estos compuestos, tanto para la salud humana como ambiental. Los plaguicidas se encuentran entre los grupos de contaminantes ambientales más estudiados por los científicos en las últimas décadas. Los estudios realizados se centran, sobre todo, en el desarrollo de métodos de análisis para su determinación en los distintos compartimentos ambientales y en el estudio de su degradación y su toxicidad. Sin embargo, son escasos los estudios que abordan conjuntamente todos estos aspectos (presencia, comportamiento, transporte y toxicidad) y menos aun los que lo hacen simultáneamente para diversos compuestos pertenecientes a distintas familias químicas y en varios compartimentos ambientales.

En este contexto, los objetivos generales de la presente memoria consistían en (i) el estudio de la presencia de diversos plaguicidas en el medio ambiente, concretamente en los compartimentos ambientales agua y sedimento, y (ii) la evaluación del riesgo ambiental derivada de la misma para diferentes organismos acuáticos. Estos objetivos se han concretado mediante el establecimiento de los objetivos, más concretos, expuestos a continuación:

1. Desarrollar metodologías analíticas selectivas y sensibles para determinar plaguicidas y productos de transformación seleccionados en aguas y sedimentos, basadas en la técnica de cromatografía de líquidos – espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).
2. Aplicar las metodologías analíticas desarrolladas al estudio de la presencia y distribución de los plaguicidas en muestras de aguas y sedimentos en distintas zonas de interés.
3. Relacionar los niveles de plaguicidas detectados con las características (geográficas, económicas, etc.) de la zona, con el fin de valorar su presencia en el medio en cuestión y la problemática derivada de la misma.

4. Evaluación del riesgo ambiental asociado a los plaguicidas mediante estudios de toxicidad, desarrollo y cálculo de índices de impacto y aplicación de modelos matemáticos predictivos.

2. Estructura

La presente memoria está estructurada en 6 capítulos. En el primer capítulo se presenta una introducción general sobre los plaguicidas, en donde se comenta brevemente su consumo y producción, así como la legislación aplicable y su evolución en los últimos años en la CE (Comunidad Europea). También se presenta el estado del arte en la evaluación del riesgo ambiental de los plaguicidas y en el análisis de los mismos en el medio ambiente y, finalmente, se presentan los compuestos que fueron objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, desde un punto de vista químico, de uso y legal.

Cada uno de los capítulos 2 a 5 se subdivide en una pequeña introducción, los resultados obtenidos (en forma de publicación científica o no) y una discusión de todos los datos presentados en el capítulo. El Capítulo 2 presenta el desarrollo y la validación de las metodologías analíticas empleadas para determinar plaguicidas en aguas y sedimentos. Estas metodologías se basan en el análisis de los compuestos objeto de estudio mediante LC-ESI-MS/MS.

Los capítulos 3 a 5 recogen el trabajo experimental realizado a lo largo de la Tesis Doctoral en distintos estudios ambientales llevados a cabo en varias zonas geográficas. El Capítulo 3 trata sobre los plaguicidas antes, durante y después del tratamiento de depuración de aguas residuales, así como el impacto de la reutilización de las aguas regeneradas. El Capítulo 4 expone los niveles de plaguicidas detectados en compartimentos ambientales naturales (aguas superficiales, sedimentos y aguas subterráneas) como base para discutir el transporte y degradación de los mismos. La discusión se consolida con un estudio de recarga artificial de acuíferos. El Capítulo 5 viene a evaluar el impacto que los plaguicidas presentes en los diversos compartimentos ambientales pueden ejercer en el medio acuático. La evaluación por medio de índices se ha realizado en aguas superficiales y en aguas depuradas. La predicción de la concentración de plaguicidas en zonas sin datos reales se llevó a cabo por medio de modelos matemáticos. También se presentan en este capítulo los resultados parciales obtenidos en los estudios de modelos dinámicos de flujo llevados a cabo durante una estancia de tres meses en el grupo de Ecología Acuática y Gestión de la Calidad del Agua (Aquatic Ecology and Water Quality Management Group) de la Universidad de Wageningen (Holanda).

En el último capítulo (Capítulo 6) se recogen las conclusiones generales obtenidas en esta Tesis Doctoral, siempre buscando integrar las principales observaciones de los

capítulos anteriores. Al final de la memoria se detalla la bibliografía utilizada junto con diversos anexos correspondientes a las listas de abreviaturas, tablas, figuras, y otras publicaciones científicas generadas a lo largo de la Tesis Doctoral no incluidas en la memoria.

La distribución de las publicaciones científicas incluidas en esta memoria es la siguiente:

Capítulo 2:

Publicación científica #1: Köck-Schulmeyer, M., Olmos, M., López de Alda, M., Barceló, D., 2013. Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1305 (2013) 176-187.

Capítulo 3:

Publicación científica #2: Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., Alda, M.L.d., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F. and Barceló, D., 2013. Occurrence and behaviour of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of the Total Environment*, 458-460(0): 466-476.

Publicación científica #3: Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., López-Serna, R., Pérez, S., Brix, R., Llorca, M., Alda, M.L.d., Petrovic, M., Munné, A., Tirapu, L. and Barceló, D., 2011. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain). *Chemosphere* 82 (5): 670-678.

Capítulo 4:

Publicación científica #4: Köck, M., Farre, M., Martinez, E., Gajda-Schrantz, K., Ginebreda, A., Navarro, A., de Alda, M.L. and Barcelo, D., 2010. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology* 383 (1-2): 73-82.

Publicación científica #5: Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Gonzalez, S., Cortina, J. L., Lopez de Alda, M. and Barcelo, D., 2012. Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain). *Chemosphere* 86 (1): 8-16.

Publicación científica #6: Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., Garrido, T., Fraile, J., López de Alda, M., Barceló, D., 2014. Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain). *Science of the Total Environment*, 470-471 (2014) 1087-1098.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



1.1. Introducción

El término plaguicida se aplica a herbicidas, fungicidas, insecticidas, y varias otras sustancias o mezclas de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar las plagas. Puede ser una sustancia química, un agente biológico (tal como un virus o una bacteria), un desinfectante antimicrobiano, o un dispositivo utilizado contra plagas de organismos tales como insectos, patógenos de plantas, malas hierbas o microbios. Hay distintos tipos de plaguicidas que se diferencian entre sí de diversas formas, lo que genera una variada lista de tipos de clasificación. De todas ellas, las más relevantes para el estudio realizado en esta Tesis Doctoral son las que atienden al punto de vista funcional, químico y tóxico. La Tabla 1-1 resume las clasificaciones más relevantes para este estudio.

Tabla 1 - 1. Lista y descripción de clasificaciones de plaguicidas.

Clasificación	Descripción	Ejemplos
Función	Según el tipo de plaga de controlan	Fungicidas, insecticidas, herbicidas, acaricidas, biocidas
Química	Según la familia química de su principio activo	Carbamatos, amidas, triazinas, fenilureas, organofosforados, azoles
Tóxica	Según su toxicidad y peligrosidad	Ia, Ib, II, III, U
Modo de actuación	En función del modo de aplicación	De contacto, sistémico, residual, repelente
Momento de aplicación	En función del momento de aplicación	Pre-siembra, pre-emergencia, post-emergencia

Fuente: Environmental Protection Agency (2013)

Con relación a su función, los plaguicidas se clasifican según el tipo de organismo sobre el cual el compuesto realiza su acción, ya sean hongos (fungicidas), malezas (herbicidas), insectos (insecticidas) o todo tipo de organismos vivos (biocidas).

La estructura química del principio activo nos ayuda a predecir la reactividad de estas sustancias en las diversas matrices ambientales, a través de la evaluación de la polaridad, el tamaño de la molécula y de muchas otras propiedades que cada principio activo posee.

La clasificación en base a su toxicidad contribuye a un uso más controlado de estos compuestos, pues indica el grado de peligrosidad de los plaguicidas tras la inhalación, ingestión y/o penetración cutánea de los mismos en un individuo dado. Uno de los parámetros más utilizados es la concentración letal (LC_{50} del inglés *Letal Concentration*) o efectiva (EC_{50} del inglés *Effective Concentration*) que afecta a 50% de los individuos expuestos, en este caso, de microorganismos acuáticos (*Daphnia*, algas, peces).

La forma en la que una plaga dada es atacada también genera una clasificación. Por ejemplo, los herbicidas suelen ser residuales; se aplican antes de que brote la planta y permanecen en el suelo tiempo suficiente como para ir matando las malas hierbas en el momento de su germinación. El momento de aplicación depende de la forma en la que una plaga dada es atacada. La aplicación antes de la siembra se considera un tratamiento preventivo, mientras que los plaguicidas pos emergentes suelen aplicarse después del nacimiento de las malas hierbas.

El uso de los plaguicidas se remonta a más de 2000 años atrás, cuando cenizas y aceites eran usados con ese fin. Los plaguicidas, como los conocemos hoy (de origen principalmente químico), se han masificado tras el descubrimiento del DDT en los años cuarenta, generando un sinfín de compuestos orgánicos sintéticos, como los organofosforados, los organoclorados y los carbamatos.

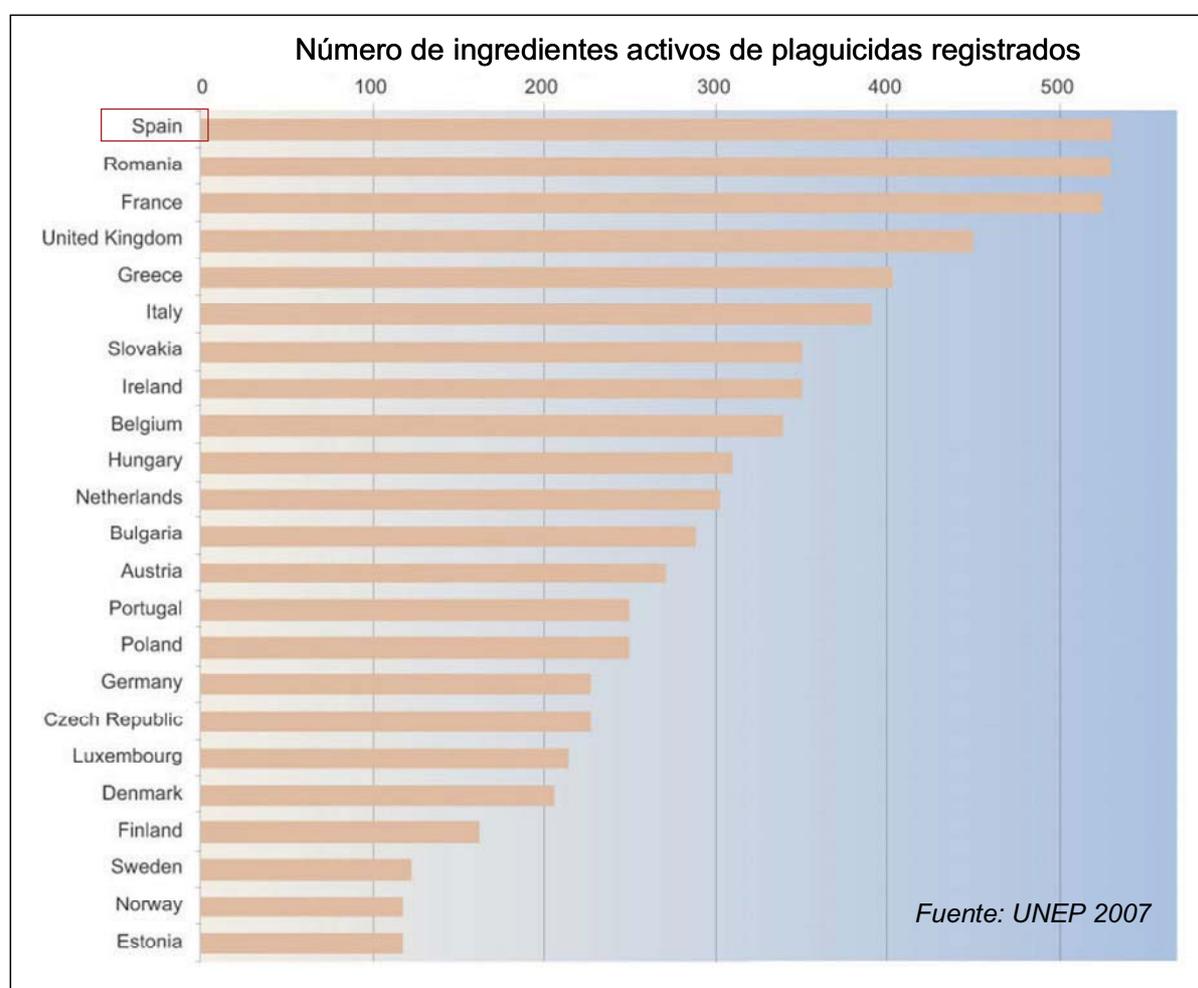


Figura 1 - 1. Número de ingredientes activos de plaguicidas registrados en Europa.

Hoy, 60 años después del primer plaguicida sintético, existen más de 500 ingredientes activos de plaguicidas sólo en Europa, siendo España y Francia el primer y el

tercer país, respectivamente, en número de ingredientes activos de plaguicidas registrados en Europa. Además, estos dos países representan más del 40% de la superficie del cultivo europeo (ver Figura 1-1). A nivel mundial, y según datos de 2006, Francia es el tercer mayor consumidor de plaguicidas del mundo, después de EE.UU. y Japón, que lideran la primera y segunda posición, respectivamente (AFIP 2008).

España, considerado uno de los principales consumidores de plaguicidas de Europa, ha presentado una disminución en el uso de plaguicidas en los últimos 10 años. Según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA 2011, 2012), los insecticidas, seguidos por los herbicidas y luego por los fungicidas son los plaguicidas más utilizados (Figura 1-2a). En 2004 se registró la máxima aplicación de plaguicidas, superando los 3 kg de ingrediente activo por hectárea (Figura 1-2b), y en 2002 se registró un gasto de casi 1000 millones de euros en el consumo de fitosanitarios (Figura 1-2c).

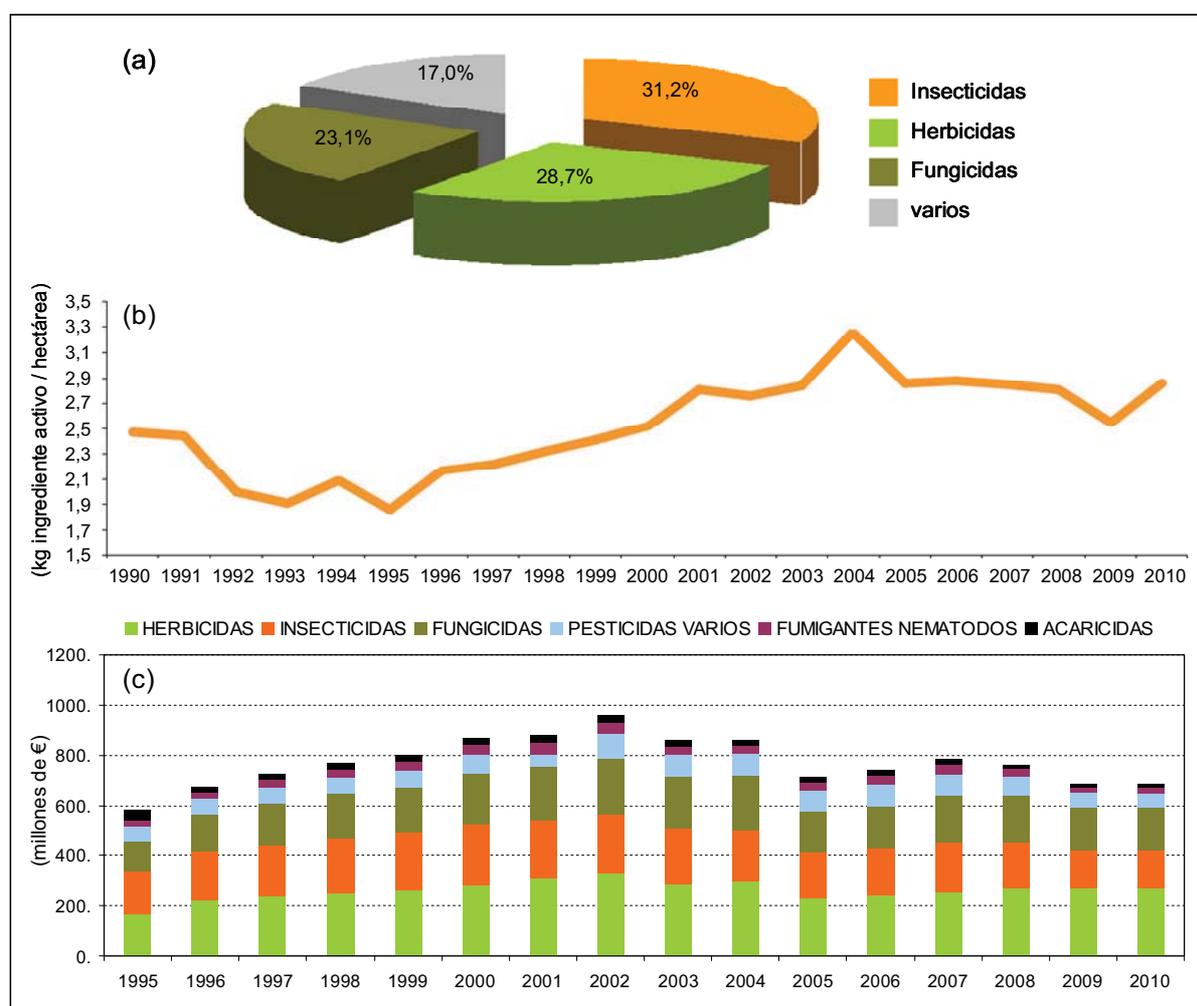


Figura 1 - 2. Consumo de fitosanitarios en España. (a) Consumo de las diversas familias de plaguicidas en 2010 y serie histórica (b) en kg de ingrediente activo por hectárea y (c) en millones de euros.

1.2. Los plaguicidas en el contexto ambiental

Este uso desmedido de plaguicidas en el mundo ha tenido un efecto positivo a nivel de producción de cultivos y de control de transmisiones de enfermedades a través de los insectos, sin embargo, también ha ocasionado una serie de efectos dañinos tanto para el ser humano (Corsini et al. 2008; Shaw et al. 2011) como para el medio ambiente (Kattwinkel et al. 2011; Margni et al. 2002).

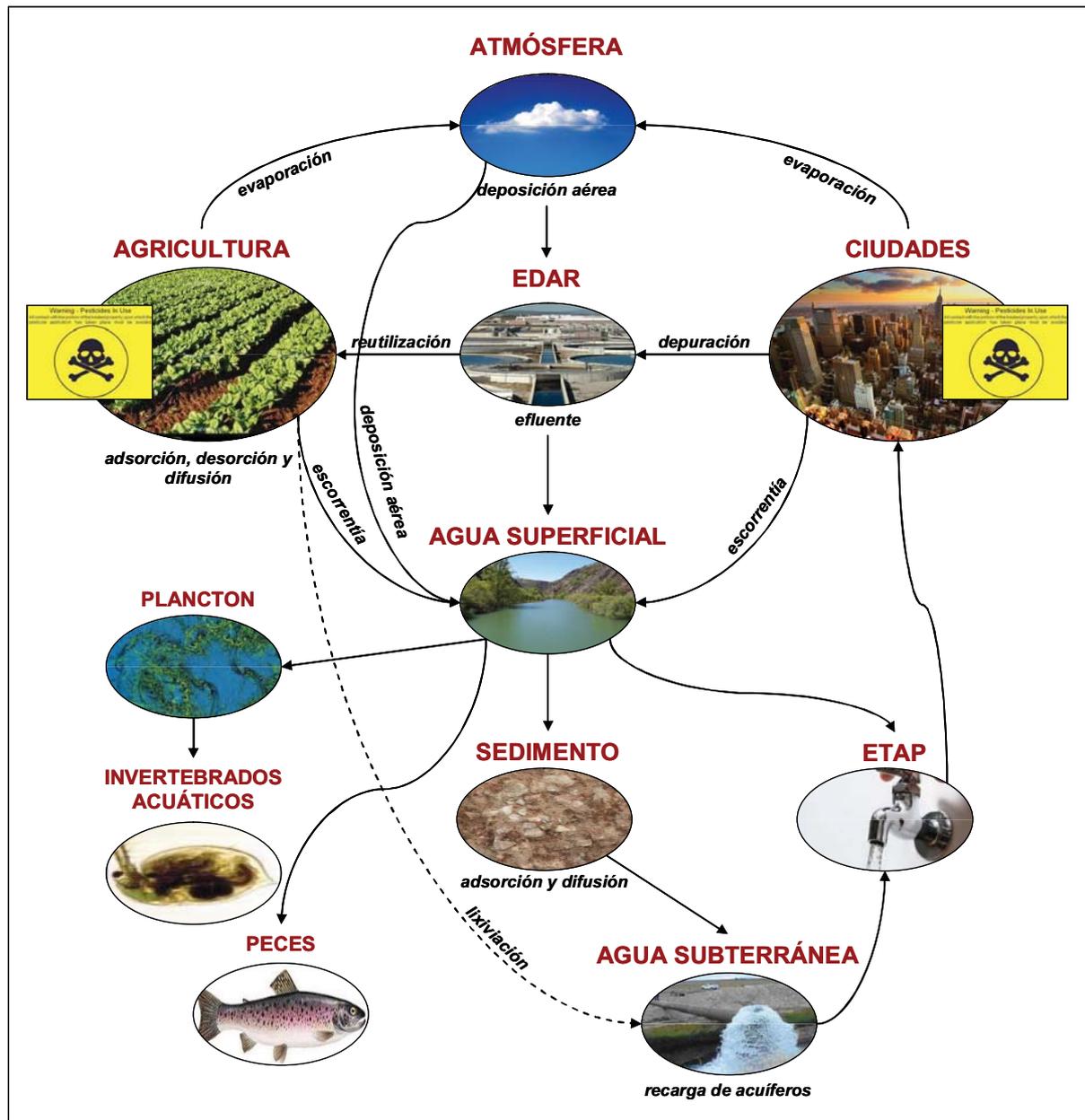


Figura 1 - 3. Fuentes y destino de los plaguicidas. EDAR: Estación de Depuración de Agua Residual; ETAP: Estación de Tratamiento de Agua Potable.

La presencia de plaguicidas en el medio ambiente acuático se considera el principal

factor de estrés químico para los organismos presentes en los ecosistemas acuáticos (Bunzel et al. 2013).

Si se consideran todas las vías de transporte de plaguicidas en el medio ambiente, se observa que no hay ningún compartimento ambiental completamente libre de la presencia de plaguicidas. Como se muestra en la Figura 1-3, y partiendo de la base de que los plaguicidas se usan no sólo en la agricultura sino también en las zonas domésticas, su impacto puede afectar tanto la atmósfera como las aguas residuales, las aguas subterráneas y las superficiales. Tal afirmación se confirma al evaluar los resultados de diversos estudios científicos que ponen en evidencia la presencia de los plaguicidas en los diversos compartimentos ambientales, aparte de la ya conocida presencia de los residuos en la agricultura y en los alimentos (Cabras et al. 2000)).

Bass y colaboradores (Bass et al. 2001) evaluaron los resultados de una encuesta realizada para determinar qué plaguicidas eran los más usados en zonas urbanas de los E.E.U.U. tales como la cocina y los patios. De los plaguicidas estudiados en la presente Tesis Doctoral, diazinón era el de mayor uso en hogares. Según Burkhardt y colaboradores (Burkhardt et al. 2007) otra fuente doméstica importante de plaguicidas son los materiales de construcción que, por medio del sistema de alcantarillado, recorren ciudades alcanzando ríos y aguas residuales.

Lamentablemente las EDARs no están preparadas para eliminar de forma eficiente los plaguicidas y otros contaminantes orgánicos (Petrovic et al. 2003), generando efluentes con alta carga de contaminantes. Como ejemplo podemos citar los altos niveles de plaguicidas detectados en efluentes de diversas EDARs: 340 ng/L de isoproturón en Suiza (Morasch et al. 2010), 510 ng/L de simazina en Irlanda (Cahill et al. 2011), 1010 ± 590 ng/L de mecoprop en Zurich (Singer et al. 2010), y Castellón y Almería con niveles de 480 ng/L de terbutilazina y 3000 ng/L de diurón, respectivamente (Muñoz et al. 2009; Pitarch et al. 2010). La Figura 1-4 muestra el intervalo de concentraciones individuales de plaguicidas determinados en diversos efluentes de EDARs, observándose niveles de hasta 42 µg/L de isoproturón en Alemania entre los años 1996 y 1997. Estos efluentes de aguas tratadas se vierten a los ríos, mientras que en otros casos son reutilizados, como por ejemplo en el regadío agrícola y riego urbano, según la calidad del agua y las demandas hídricas de la región. Por ejemplo, España (al igual que Grecia, Portugal e Italia) usa la mayor parte del agua reutilizada en la agricultura, mientras que otros países le dan un uso más urbano, por ejemplo para la calefacción (Bélgica, Holanda, Finlandia) (Bixio et al. 2006).

Como resultado del vertido de esos efluentes en ríos, de la escorrentía de aguas de lluvia y en menor medida de la deposición aérea, las aguas continentales superficiales son las que presentan los niveles más altos de plaguicidas.

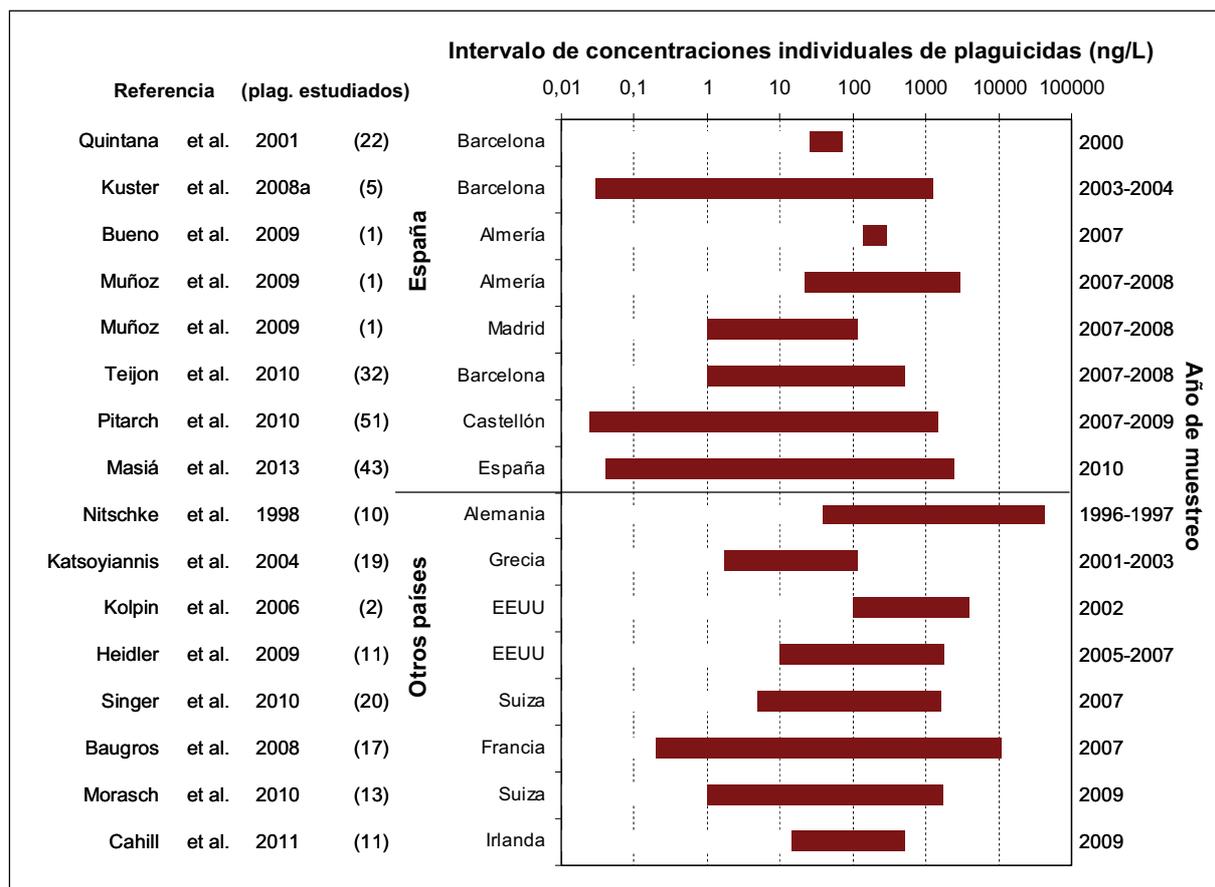


Figura 1 - 4. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) a la salida de EDARs.

La Figura 1-5 presenta un resumen del intervalo de concentraciones individuales de plaguicidas detectados en diversos estudios en aguas superficiales tales como ríos, lagunas, y riachuelos, donde se observa que en prácticamente todos los estudios los niveles de plaguicidas superan los 100 ng/L. En España, los niveles más altos se atribuyen al herbicida bentazona, usado principalmente en el cultivo del arroz, con residuos de más de 250 µg/L en el Delta del Ebro (Barata et al. 2007). A escala global, el diazinón destaca por sus 460 µg/L detectados en aguas de ríos argentinos (Molina-Morales, et al. 2012).

En el contexto europeo, Von der Ohe y colaboradores (Von der Ohe et al. 2011) estudiaron la presencia de 500 plaguicidas en diversos ríos europeos (Llobregat, Elbe, Danube y Scheldt) detectando concentraciones entre ng/L y µg/L. Ricciardi y colaboradores (Ricciardi et al. 2009) también estudiaron el efecto que los contaminantes orgánicos presentes en ríos provocan en la comunidad biológica de los ríos. La presencia y el efecto de los plaguicidas también se ha estudiado en peces (Benejam et al. 2010, Laetz et al. 2009; Lavado et al. 2004; Macneale et al. 2010), en moluscos (Ramón et al. 2007) y en otras comunidades biológicas como las serpientes (Santos et al. 2009).

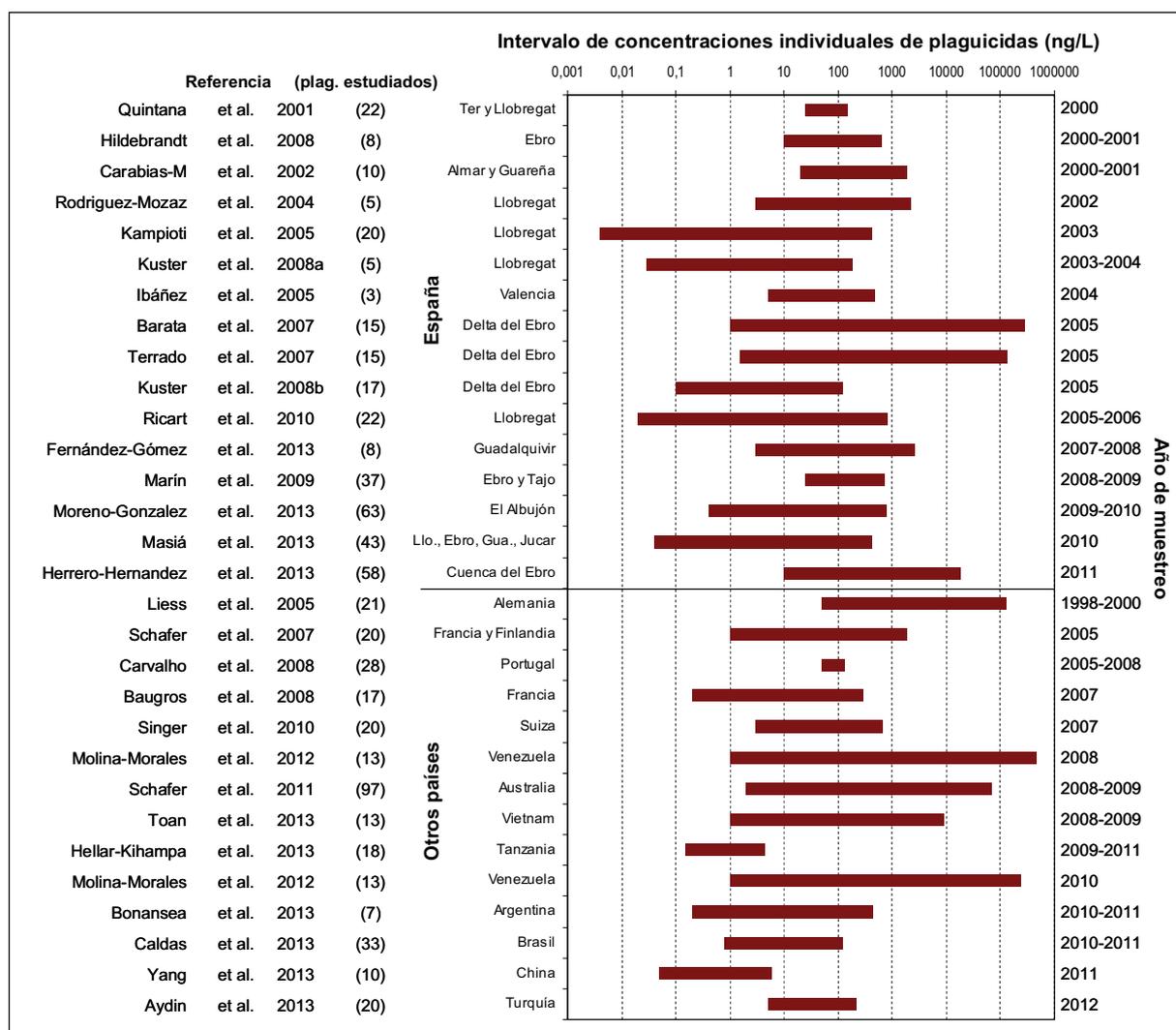


Figura 1 - 5. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en aguas superficiales.

Además de las aguas, los sedimentos también pueden sufrir los efectos contaminantes de los plaguicidas utilizados. Se han detectado 0,627 ng/g de metolacloro (Xue et al. 2008), 9,5 ng/g de isoproturón (Lazartigues et al. 2011) y 55,6 ng/g de fenitrotión (Villaverde et al. 2008) en China, Francia y Portugal, respectivamente. En España, en la cuenca del Ebro, se han detectado 72,08 ng/g de diazinón, 3,45 ng/g de molinato y 6,89 de propanil (Navarro et al. 2010). La Figura 1-6 presenta un resumen del intervalo de concentraciones de plaguicidas individuales encontradas en diversos estudios en sedimentos donde se observan niveles de hasta 450 ng/g de lindano (Villaverde et al. 2008) y 460 ng/g de clorotalonil (Schafer et al. 2011) en Portugal y Australia, respectivamente.

Con respecto al agua subterránea, muchos plaguicidas (provenientes de sedimentos y suelos agrícolas contaminados con plaguicidas) se lixivian y alcanzan los acuíferos (Esteves et al. 2012).

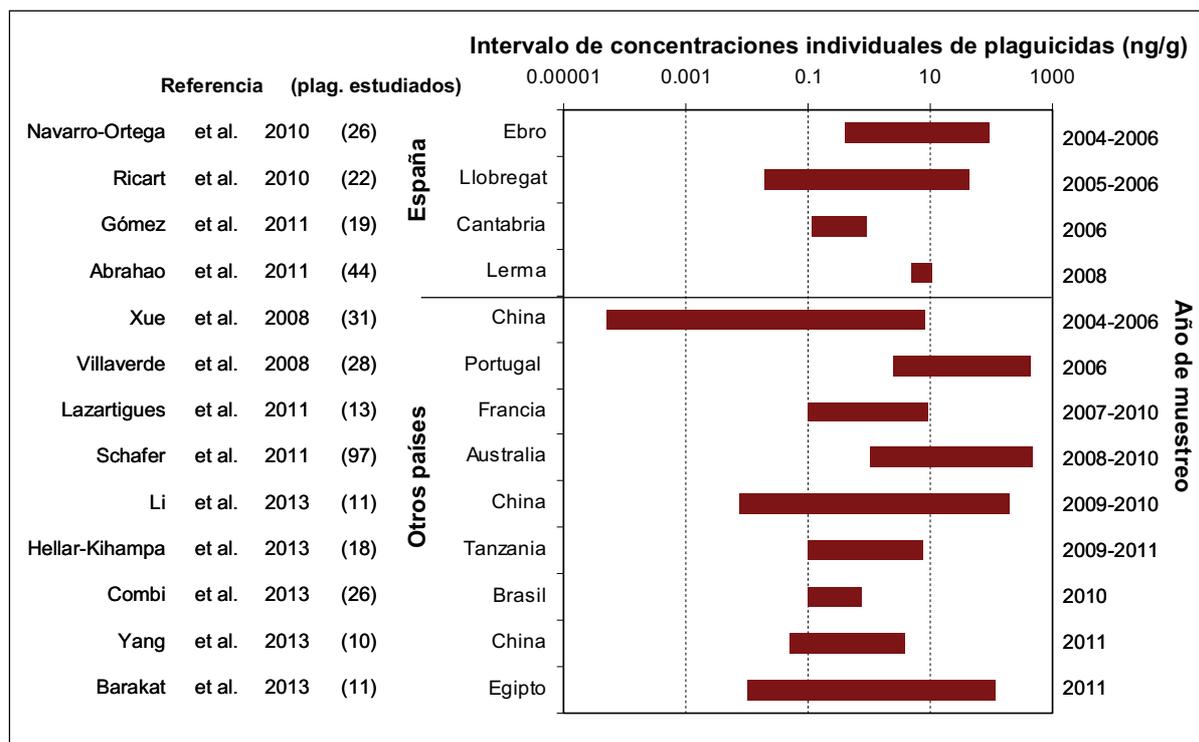


Figura 1 - 6. Intervalo de concentraciones (ng/g) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en sedimentos.

Como consecuencia, se han detectado en España 5,37 ng/L de metolacoloro (Hildebrand et al. 2007), 2,46 ng/L de atrazina (Hildebrand et al. 2008), 1,7 ng/L de cianazina (Carabias-Martínez et al. 2003), 9,95 ng/L de alacloro (Postigo et al. 2010) y 1,3 ng/L de malatión (Garrido et al. 2000) en las aguas subterráneas del Ebro (las dos primeras), Salamanca y Cataluña (las dos últimas). En el contexto mundial, se han detectado 33 ng/mL de metribuzine (Haarstad et al. 2007), 3,2 ng/mL de metolacoloro (Kolpin et al. 2004) y 10,2 ng/L de alacloro (Guzzella et al. 2006) en Noruega, E.E.U.U., Italia, respectivamente. La Figura 1-7 presenta un resumen del intervalo de concentraciones de plaguicidas individuales encontrados en diversos estudios en aguas subterráneas.

También se ha observado una deficiente eliminación de los plaguicidas durante el proceso de potabilización de aguas (Broseus et al. 2009). Revisando estudios llevados a cabo desde el 2002 (ver Figura 1-8), queda patente que los plaguicidas están presentes en algunas aguas potables, como por ejemplo el diurón, detectado a 259 ng/L en aguas potables de Portugal (Carvalho et al. 2008).

Finalmente, también se detectaron niveles de plaguicidas en el aire (Schummer et al. 2010), pudiendo perjudicar a la salud humana (Kattwinkel et al. 2011).

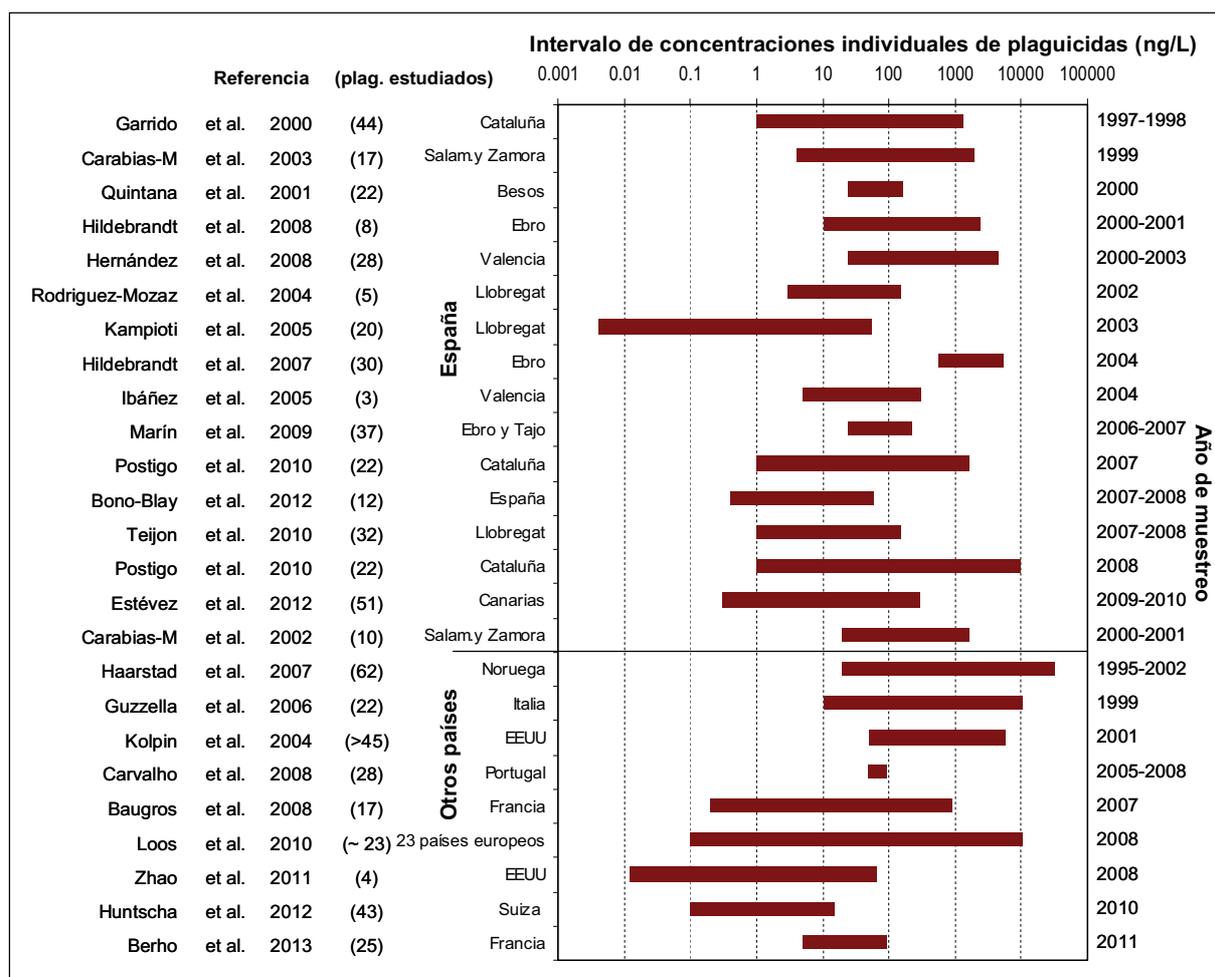


Figura 1 - 7. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en aguas subterráneas.

Como resultado de todo lo anterior, los diversos compartimentos ambientales son receptores de estos compuestos. Los principales factores (FAO 1997) que influyen en la toxicidad de los plaguicidas en estos compartimentos son:

- la propia toxicidad de los plaguicidas, que normalmente se expresa en forma de LD₅₀ o EC₅₀; en diversos casos se aplica el concepto de “riesgo” que consiste en el tiempo de exposición (cantidad y/o duración) x toxicidad;
- la persistencia de los compuestos, medida en términos de vida media (tiempo necesario para que la concentración de un compuesto se reduzca a la mitad), que a su vez está determinada por procesos bióticos y abióticos (hidrólisis, fotólisis, oxidación, etc.);
- los productos de transformación, generados a partir de los propios plaguicidas y que en muchos casos presentan una toxicidad aun mayor que la del compuesto original;
- la permanencia del plaguicida en un determinado compartimento ambiental, que depende principalmente de sus propiedades físico-químicas, así como de las

condiciones reales de medio (por ejemplo, la temperatura y la luz solar).

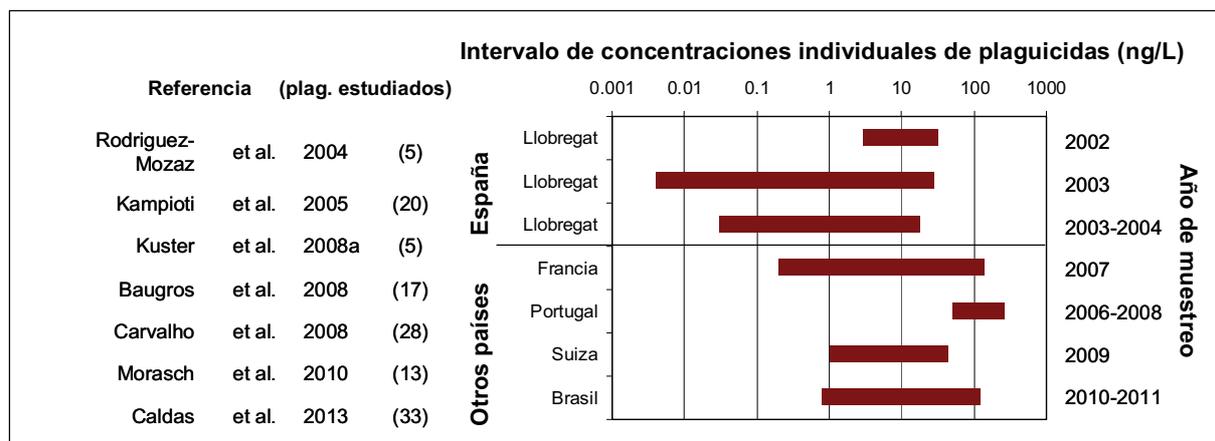


Figura 1 - 8. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en aguas potables.

Debido a la diversidad de formulaciones químicas de plaguicidas, los distintos plaguicidas provocan efectos muy diferentes en la vida acuática, causando en la mayoría de los casos efectos crónicos y agudos entre los que se pueden destacar las lesiones, inhibición o fracaso reproductivo, supresión del sistema inmunitario, perturbación del sistema endocrino, daños celulares y deformidades físicas, entre otros (FAO, 1997).

1.3. Los plaguicidas en el contexto científico

El estudio de estos efectos es de suma importancia no solo para poder evaluar y gestionar el uso de los plaguicidas con fines ecológicos, sino también porque los efectos producidos en los organismos y en el medio ambiente constituyen una advertencia de las posibles repercusiones para la salud humana.

Durante décadas se han estudiado los efectos de los plaguicidas en el medio ambiente, la salud pública y la calidad del agua (FAO, 1997). Sin embargo, el interés y la preocupación por estudiar su comportamiento y toxicidad no deja de crecer, tal y como lo demuestra el número de publicaciones que abordan el estudio de los plaguicidas en aguas, suelos y/o sedimentos. En los últimos 23 años se han superado las 4500 publicaciones (Figura 1-9).

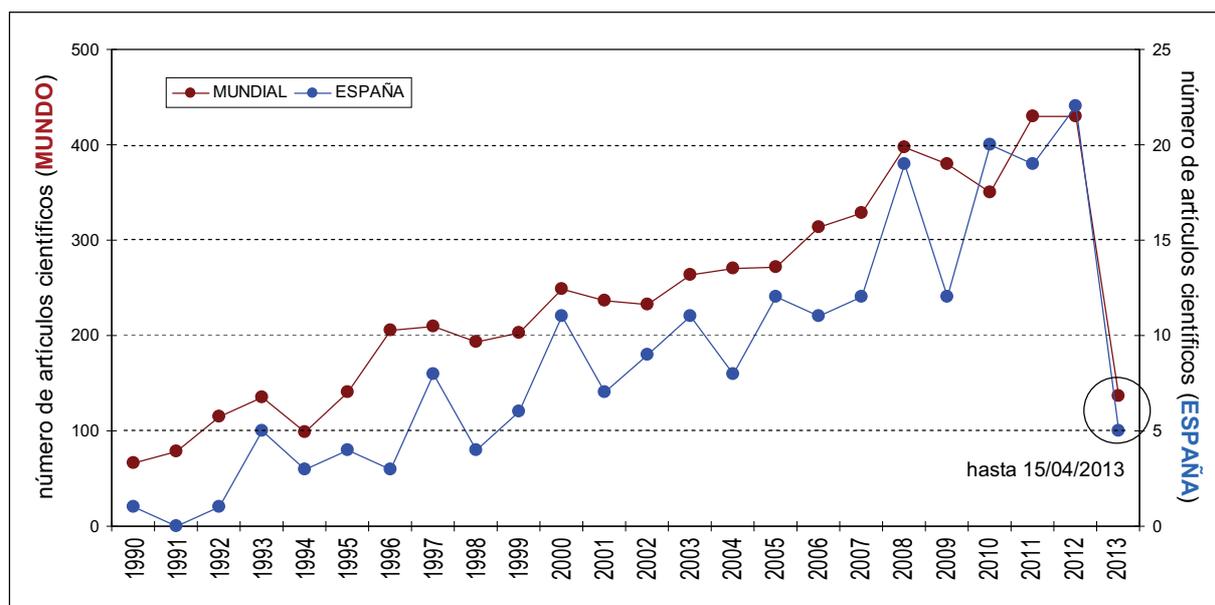


Figura 1 - 9. Número de publicaciones científicas (total de 4554) que abordan la problemática de los plaguicidas en aguas, suelos y/o sedimentos en los últimos 23 años según SCOPUS; fecha: 04.04.2013. Criterio de búsqueda: pesticides or insecticides and surface water or groundwater or wastewater or sedimento or soil in Article title, Abstract, Keywords).

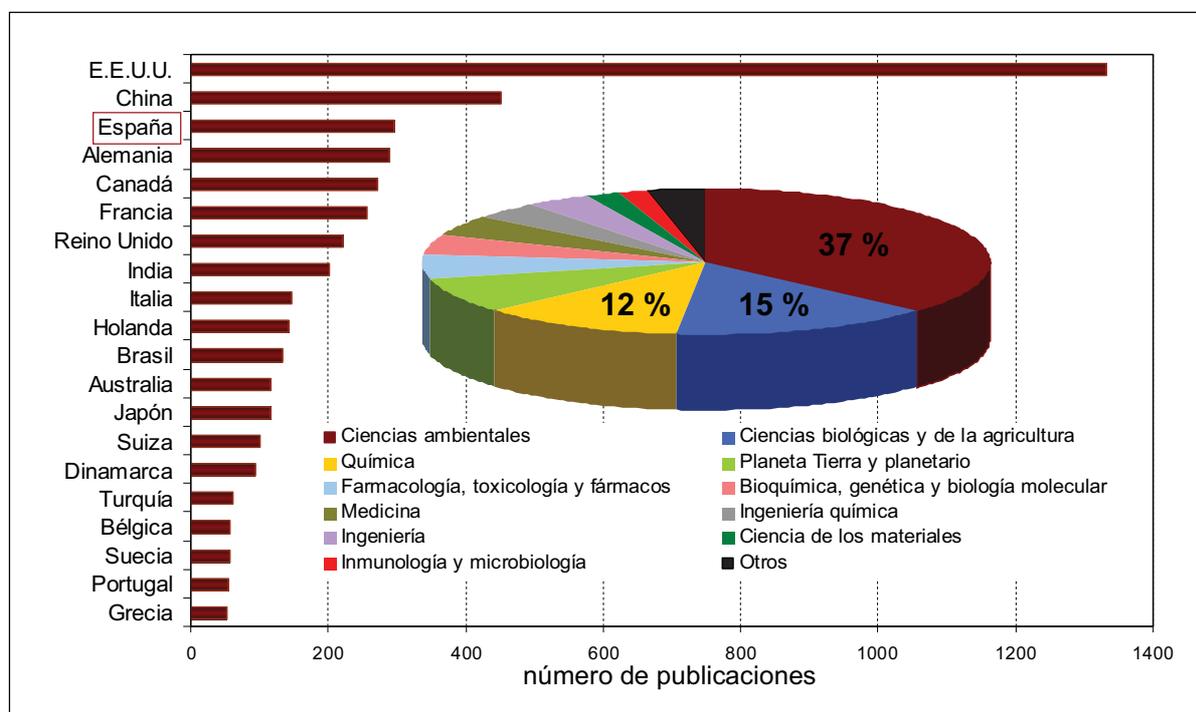


Figura 1 - 10. Características de las 4554 publicaciones relacionadas con el ámbito de plaguicidas y medio ambiente: clasificación de los 20 países que más publican al respecto (diagrama de barras) y áreas de conocimiento en las que se clasifican (diagrama circular).

Aunque la mayoría de las publicaciones relacionadas con el destino y efectos de los plaguicidas en aguas naturales y en sedimentos se realizan dentro de las áreas de las ciencias ambientales, biológicas y agrícolas (Figura 1-10), también hay que tener en cuenta la continua científica de otras áreas como la farmacología, la bioquímica y la medicina, siendo EE.UU. el mayor contribuyente, seguido por China y luego por España.

1.4. Evaluación del riesgo ambiental

Con los años cada vez es mayor el número de estudios científicos llevados a cabo que evalúan el riesgo ecológico de los plaguicidas. Esto se debe a que los efectos ecológicos de los plaguicidas no sólo afectan a organismos individuales, sino que pueden afectar a todo un ecosistema. Según estudios realizados en Suecia (Janssen et al. 1990), la aplicación de plaguicidas es uno de los factores que más influye en la biodiversidad en el medio acuático y terrestre. Los investigadores han constatado que el descenso continuado de la población de perdices suecas está vinculado a cambios en el aprovechamiento de la tierra y a la utilización de herbicidas.

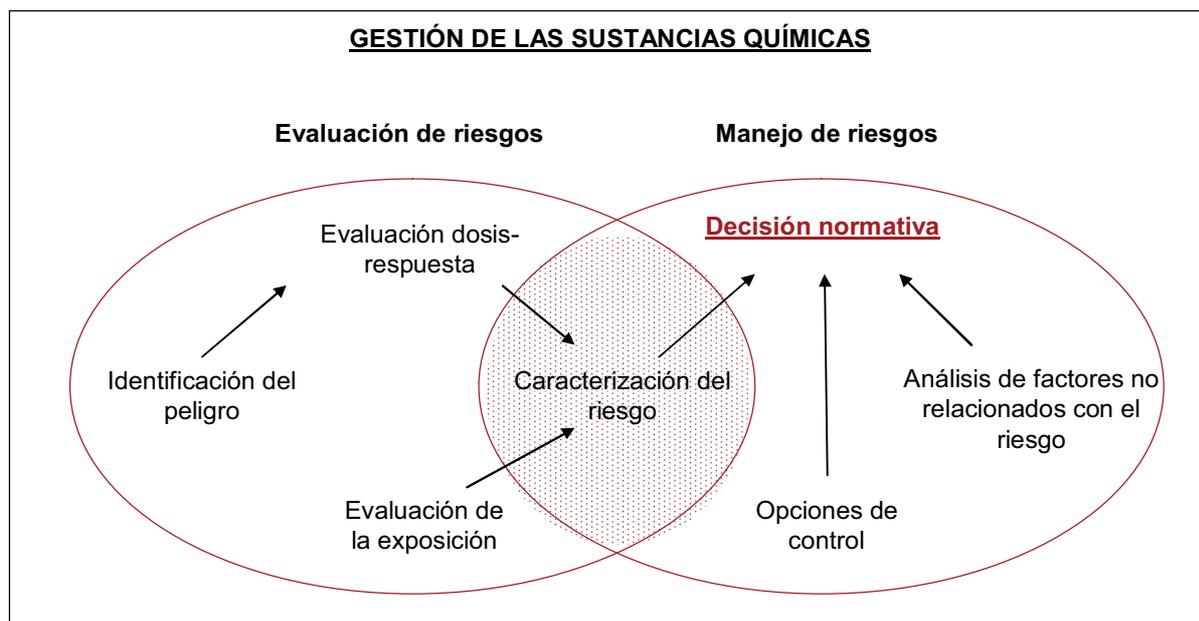


Figura 1 - 11. Gestión de las sustancias químicas. Fuente: INE 2000.

En la Figura 1-11 se muestra un esquema de la gestión de sustancias químicas consideradas de riesgo.

En lo que respecta a la evaluación de riesgos desde la perspectiva de los efectos ecológicos, de manera general, los estudios más usuales se centran en organismos acuáticos invertebrados y vertebrados, así como en insectos polinizadores, microorganismos

del suelo o bacterias de los lodos de plantas de tratamiento de agua residual, así como en aves y mamíferos predadores (INE 2000).

Los parámetros a evaluar en cada estudio dependerán de los organismos objeto del estudio y de la naturaleza del compartimento ambiental en el que se encuentren tales organismos. En el caso de estudiar el riesgo ambiental que generan los plaguicidas en aguas superficiales, los organismos acuáticos tales como algas, *daphnias* y peces, suelen ser los más utilizados como representativos de los distintos niveles de la cadena trófica y en los que se han centrado la mayor parte de los estudios (Finizio 2001).

Para llevar a cabo tales evaluaciones, los científicos disponen de una serie de herramientas de las que hacen uso según el enfoque que quieran darle al estudio. Una de las estrategias aplicadas por muchos científicos consiste en usar datos reales de concentraciones de determinados contaminantes en un compartimento ambiental dado y a partir de ellos calcular el riesgo que esas concentraciones suponen en organismos específicos basándose en los índices de toxicidad de esos contaminantes frente a esos organismos, esto es, desarrollar y calcular índices o indicadores de riesgo ambiental y, en base a éstos, promover medidas para reducir los niveles de riesgo.

Tabla 1 - 2. Lista de índices, indicadores y modelos que se aplican en la evaluación de riesgo de plaguicidas en matrices ambientales.

Acrónimo	Índice, indicador o modelo	Referencia
BBI	Belgium Biotic Index	von der Ohe et al. 2007
BMWP	Biological Monitoring Working Party	von der Ohe et al. 2007
DUFLOW	Surface water hydrodynamic model	Manache et al. 2004
EIQ	Environmental Impact Quotient model	Stenrød et al. 2008
EPRIP	Environmental Potencial Risk Indicator for Pesticides	Leendertse et al. 1999, Padovani et al. 2004, Reus et al. 2002
EYP	Yardstick for Pesticides	Leendertse et al. 1999, Reus et al. 2000, Reus et al. 2002
FOCUS	FORum for Co-ordination of pesticide fate models and their Use exposure models	Knaebel et al. 2012
GLEAMS	Groundwater Loading Effects of Agricultural Management Systems	Sarmah et al. 2005
HD	Hasse Diagram rank pesticides	Galassi et al. 1996, Leendertse et al. 1999, Reus et al. 2002
HYDRUS-1D	Water flow and solute transport in variably saturated porous media MODEL	Sarmah et al. 2005
Ipest	Pesticide Environmental Impact Indicator	Leendertse et al. 1999, Reus et al. 2002, van der Werf et al. 1998,

Tabla 1 - 2. (continuación).

Acrónimo	Índice, indicador o modelo	Referencia
LEACHM	LEAching estimation and CHEmistry Model	Sarmah et al. 2005
MIKE SHE ADM	Advanced integrated hydrological modeling system	de Bruyn et al. 2006
NARI	Norwegian Aquatic Risk Indicator	Stenrød et al. 2008
NERI	Norwegian Environmental Risk Indicator	Stenrød et al. 2008
p-EMA	Environmental performance indicator for Pesticides	Brown et al. 2003, Leendertse et al. 1999, Reus et al. 2002
PERI	Pesticide Environmental Risk Indicator	Leendertse et al. 1999, Reus et al. 2002
POCER	Pesticide Occupational and Environmental Risk indicator	Vercruyssen et al. 2002
PRISW	Pesticide Risk Index for Surface Water systems	Finizio et al. 2001, Travisi et al. 2004
REXTOX	Ratio of EXposure to TOXicity	Probst et al. 2005
SACADEAU	A Decision-Aid System to Improve Stream-Water Quality	Gascuel-Oudoux et al. 2009
SI	Saprobic Index	von der Ohe et al. 2007
SPASMO	Physically-based dynamic generic plant growth and nutrient leaching model	Sarmah et al. 2005
SPEAR	SPEcies At Risk (pesticides)	Liess et al. 2005, Schafer et al. 2007, von der Ohe et al. 2007
SWAT	Soil and Water Assessment Tool	Holvoet et al. 2005
SWAT-model	Surface Water ATtenuation model	Stenrød et al. 2008
SYNOPS	SYNOptic assessment model of risk potential of chemical plant protection products	Hernandez-Hernandez et al. 2007, Leendertse et al. 1999, Reus et al. 2002
SyPEP	System for Predicting the Environmental impact of Pesticides	Leendertse et al. 1999, Pussemier et al. 1999, Reus et al. 2002
VESPP	Vulnerability of surface waters to phytosanitary products indicator	de Bruyn et al. 2006
WCSI	Water Cycle Spreading Index	Reemtsma et al. 2006

Otra estrategia muy usada en el mundo científico consiste en crear modelos, como los de predicción (dinámicos o no).

El uso de modelos de predicción del comportamiento de agrotóxicos es útil para obtener una estimación del riesgo de contaminación ambiental y así mismo ayuda a escoger los agrotóxicos que deben ser objeto de vigilancia en las masas de agua (Martini et al.

2012). Los modelos dinámicos consisten en usar concentraciones reales de determinados contaminantes y a partir de ellos crear modelos en ecosistemas tales como los ríos, que reproduzcan lo mejor posible el transporte de dichos contaminantes. Así se aplican en casos de riesgo máximo y a partir de esos resultados se promueven medidas para minimizar los niveles de riesgo (por ejemplo, la creación de modelos de flujo y de concentración). La Tabla 1-2 muestra los índices de riesgo y los modelos matemáticos que han sido desarrollados y aplicados para el estudio del impacto ambiental de los plaguicidas en los últimos años. Cabe resaltar que no solo los modelos matemáticos computacionales son objeto de estudio. Los microcosmos también ayudan a elucidar la dinámica del transporte, adsorción y degradación de los contaminantes, generando modelos de riesgo ambiental (Koelmans et al. 2000, Van Beusekom et al. 2006).

Cualquiera de estas herramientas permite establecer la probabilidad de que se produzcan efectos adversos sobre el hombre, los animales, las plantas o el medio ambiente como resultado de la exposición a uno o más agentes estresantes (Environmental Protection Agency, 2002).

1.5. Legislación

Teniendo en cuenta las consecuencias deseadas y no deseadas del uso de plaguicidas, los países europeos han adoptado diversas medidas (FAO/CEPE, 1991) entre ellas:

- reducción del uso de plaguicidas
- prohibición de determinados ingredientes activos
- revisión de los criterios de registro de plaguicidas
- capacitación y necesidad de licencias para las personas que aplican los plaguicidas
- reducción de la dosis y mejor programación de la aplicación de plaguicidas
- comprobación y aprobación de equipos de pulverización
- limitaciones de la pulverización de áreas
- gravámenes ambientales a los plaguicidas
- promoción del uso de alternativas mecánicas y biológicas en sustitución de los plaguicidas

Normativamente, hoy en día existe una legislación en continuo desarrollo y evolución que regula la aplicación de plaguicidas y la mayoría de las medidas citadas en el párrafo anterior. En la Tabla 1-3 se puede apreciar una retrospectiva de las leyes más relevantes de interés en esta Tesis.

Tabla 1 - 3. Orden cronológico de leyes (separadas por tipo) de aplicación a los plaguicidas en las matrices ambientales estudiadas en esta memoria.

Año	Ley	Relativo a	Contexto	Descripción
1975	Directiva 75/440/CEE*	calidad	agua superficial	relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros
1991	Directiva 91/271/CEE	calidad	aguas residuales	relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas
1998	Directiva 98/83/CE	calidad	aguas de consumo humano	relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano
1998	Directiva 98/15/CE	calidad	aguas residuales	por la que se modifica la Directiva 91/271/CEE del Consejo en relación con determinados requisitos establecidos en su anexo I
2003	Real Decreto 140/2003	calidad	aguas de consumo humano	por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano
2006	Directiva 2006/118/CE	calidad	aguas subterráneas	relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro
1979	Directiva 79/117/CEE	fitosanitarios	mercado	relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas
1991	Directiva 91/414/CEE	fitosanitarios	mercado	relativa a la comercialización de productos fitosanitarios
1998	Directiva 98/8/CE	biocidas	mercado	relativa a la comercialización de biocidas
2009	Reg.(CE) No.1107/2009	fitosanitarios	mercado	relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo
2009	Directiva 2009/128/CE	plaguicidas	gestión	por la que se establece el marco de actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas
2012	Reg.(CE) No.528/2012	biocidas	mercado	relativo a la comercialización y el uso de los biocidas
1976	Directiva 76/464/CEE*	sustancias peligrosas	medio acuático	relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad
1980	Directiva 80/68/CEE	sustancias peligrosas	aguas subterráneas	relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas
2006	Directiva 2006/11/CE	sustancia peligrosas	vertidos	relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad

Tabla 1 - 3. (continuación).

Año	Ley	Relativo a	Contexto	Descripción
2000	Directiva 2000/60/CE	sustancias prioritarias	aguas ambientales	por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas
2001	Decisión 2455/2001/CE	sustancias prioritarias	aguas ambientales	por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE
2005	Decisión 2005/646/CE	sustancias prioritarias	aguas ambientales	relativa a la creación de un registro de puntos para constituir la red de intercalibración de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo
2008	Directiva 2008/105/CE	sustancias prioritarias	aguas ambientales	relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE
2013	Directiva 2013/39/UE	sustancias prioritarias	aguas ambientales y biota	por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas
1999	COM (1999) 706	alteradores endocrinos	gestión	aplicación de la estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos -sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales
2001	COM (2001) 262	alteradores endocrinos	gestión	sobre la aplicación de la estrategia en materia de alteradores endocrinos
2010	Directiva 2010/75/UE	emisiones industriales	gestión	relativa a las emisiones industriales (prevención y control integrados de la contaminación)

* Derrogada; Reg.: Reglamento; COM: Informe de la Comisión Europea; Directivas en negrita indican mayor importancia en el contexto de esta tesis doctoral.

En relación a la calidad de todos los tipos de aguas, entre los años 1975 y 2009 se promulgaron leyes que buscaban una calidad cada vez mejor de las aguas residuales tratadas, superficiales, subterráneas y de consumo humano. Cabe resaltar que en 1998 (Directiva 98/83/CE) ya se ponía en práctica el parámetro de calidad de plaguicidas (límite máximo de tolerancia de concentración de plaguicidas: 100 ng/L y 500 ng/L (total)) en las aguas destinadas al consumo humano, y luego, en 2006 (Directiva 2006/118/CE), se especificaban esos mismos límites para todas las aguas subterráneas. Las medidas previstas en esta última directiva para luchar contra la contaminación de las aguas subterráneas incluyen criterios para evaluar el estado químico de las aguas, determinar tendencias en el aumento de concentraciones de contaminantes sostenidas y

significativas, así como regular la prevención y limitación de los vertidos indirectos de estos contaminantes en las aguas subterráneas.

En lo que respecta a las sustancias peligrosas, durante décadas la distribución y el uso de plaguicidas peligrosos ha sido un tema de preocupación, causando la reacción de la Comisión Europea, la cual divulgó en 1976 la Directiva 76/464/CE. Incluye una lista de compuestos considerados peligrosos, selección basada principalmente en su toxicidad, persistencia y bioacumulación (anexo de la directiva, lista 1), así como por tener un efecto perjudicial sobre el medio acuático (anexo de la directiva, lista 2). En la primera lista hay, entre otros compuestos, los organoclorados y organofosforados, y en la segunda los biocidas y demás plaguicidas no citados en la lista 1. Esta directiva tenía por objeto proteger el medio acuático de la contaminación y en 2006 fue actualizada y derogada (Directiva 2006/11/CE).

Pero no solo Europa ha tomado medidas para proteger el medio ambiente de las sustancias peligrosas. La Red de Acción en Plaguicidas (PAN, del inglés *Pesticide Action Network*), fundada en 1982, ha sido la Organización de la Sociedad Civil que con mayor constancia y continuidad ha llamado a adoptar medidas internacionales efectivas para la eliminación de los plaguicidas más peligrosos (RAP-AL 2013). En 2009 la PAN presentó la "Lista de plaguicidas altamente peligrosos" (Neumeister y Weber 2009), en la cual se incluyen casi todos los plaguicidas analizados en esta Tesis Doctoral. La PAN trabaja en pro de la mejora de las políticas fitosanitarias, con miras a lograr sistemas de manejos de plagas más seguros, socialmente justos y económicamente viables.

Sobre los fitosanitarios (plaguicidas de uso agrícola), en 1979 (Directiva 79/117/CE) la CE inició el control de comercialización, autorización y prohibición. Los biocidas, plaguicidas para fines de protección no vegetal (Wittmer et al. 2010), se regularon casi 20 años más tarde (Directiva 98/8/CE). Actualmente, la comercialización de estos plaguicidas se regula por medio de los reglamentos No. 1107/2009 (fitosanitarios) y 528/2012 (biocidas).

El control de las ventas de plaguicidas ayuda a controlar su uso, pero no ayuda a evaluar el estado de su impacto en los medios acuáticos. En ese contexto, la CE establece en el año 2000 (Directiva 2000/60/CE) un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas donde se considera que el agua no es un bien comercial como los demás, sino un patrimonio que hay que proteger y defender. Esta directiva marco tiene varios objetivos, concretamente la prevención y la reducción de la contaminación, la promoción del uso sostenible del agua, la protección del medio ambiente, la mejora de la situación de los ecosistemas acuáticos y la atenuación de los efectos de las inundaciones y de las sequías. En 2008 (Directiva 2008/105/CE) se establecen las normas de calidad ambiental (NCA - límites de concentración media anual y de concentración máxima admisible) relativas a la presencia, en las aguas superficiales, de las sustancias o grupos de sustancias identificadas

como prioritarias en la previa Directiva Marco del Agua (DMA) en razón del riesgo significativo que presentan para el medio acuático, o a través de él, y de otros contaminantes determinados. Se trata de una lista de 33 sustancias prioritarias (20 son peligrosas y un tercio plaguicidas) que, de acuerdo con la directiva, debe pasar por una revisión cada cuatro años. En 2013 (Directiva 2013/39/CE) salió una directiva actualizando y consolidando las dos anteriores directivas relativas a las sustancias prioritarias, en la cual la CE procedió a modificar la lista de sustancias prioritarias mediante la identificación de nuevas sustancias para acciones prioritarias a escala de la Unión, revisó las NCA para algunas sustancias existentes en función del progreso científico, y estableció NCA en la biota para algunas sustancias prioritarias existentes y las sustancias identificadas recientemente. El objetivo último de la DMA es alcanzar un «buen estado» ecológico y químico de todas las aguas comunitarias para 2015.

Finalmente, otros focos de atención de la CE son los alteradores endocrinos (entre ellos muchos plaguicidas) y las emisiones industriales, que también están reguladas por sus respectivas normativas (COM-1999/706 y Directiva 2010/75/UE), con el fin de promover una buena gestión de los mismos.

El estatus legal de los plaguicidas objeto de estudio en esta Tesis Doctoral se presenta en el apartado 1.7 (Tabla 1-10) de este capítulo.

1.6. Análisis de plaguicidas en el medio ambiente

El análisis de residuos de plaguicidas en el medio ambiente consiste en la cuantificación, a nivel de trazas, de estos compuestos en diferentes matrices y generalmente consta de las etapas de extracción / concentración, purificación y determinación. Previo a estas etapas está la toma de la muestra y su correcta conservación hasta el momento del análisis, así como su preparación incluyendo filtración, liofilización, tamizado para que las muestras estén en condiciones óptimas para el inicio del análisis.

Para llevar a cabo los análisis, se requieren procedimientos y técnicas analíticas sofisticados, que se encuentran en continua evolución para afrontar el reto que supone analizar estos compuestos en muestras medioambientales a niveles de partes por trillón (ppt) o inferiores.

1.6.1. Toma y conservación de muestras ambientales

La toma de muestra es una de las etapas más importantes del proceso de análisis de muestras ambientales, y un diseño de muestreo inadecuado puede generar muestras poco representativas. Frecuentemente los investigadores no revelan el diseño del experimento. Al

estudiar 87 publicaciones científicas que incluían el análisis de aguas a la entrada de EDARs, Ort et al. (2010) revelaron que menos del 5% de todos los estudios consideran explícitamente directrices reconocidas internacionalmente o métodos para el diseño experimental de campañas de vigilancia.

La toma de muestra puntual es la más usada en el análisis de aguas superficiales y es recomendada por la DMA. Se aplica más para aguas donde la variación de la concentración del analito a estudiar se asuma pequeña, como por ejemplo lagunas y embalses, o cuando la tasa de degradación del analito en el medio en cuestión sea muy alta.

La toma de muestras integradas consiste en coger un número definido de muestras representativas de la matriz en estudio e integrarlas en una única muestra. Esta técnica es ideal en matrices poco homogéneas (por ejemplo, el sedimento) o en casos donde la variación de la concentración en función del tiempo sea alta (por ejemplo, estaciones de tratamiento de aguas). Para que la aplicación de esta técnica genere muestras lo más representativas posibles, la automatización es casi un requisito. Recientemente, Xing y colaboradores (Xing et al. 2013) presentaron un estudio en el cual mostraron la influencia de los diferentes tipos de toma de muestra en el análisis de residuos de plaguicidas en aguas superficiales. Usando un muestreador automático para muestras integradas (n=12) consiguieron detectar de un 20 a un 30% más plaguicidas que usando la técnica manual de toma de muestra.

Los muestreadores pasivos (por ejemplo, el sistema POCIS, del inglés *Polar Organic Chemical Integrative Samplers*) también se emplean en el análisis de microcontaminantes orgánicos en aguas medioambientales. Estos dispositivos contienen una fase sólida que va acumulando gradualmente los contaminantes de interés que pasan por su interior a través de una membrana externa. Para el análisis de ríos, por ejemplo, si los caudales no varían significativamente, esta técnica puede ser muy útil; sin embargo, debido a que los plaguicidas suelen mostrar variabilidad temporal que coincide con el hidrograma de los ríos, esta técnica tendría una capacidad limitada (Xing et al. 2013). Aplicado a aguas subterráneas, Berho y colaboradores (Berho et al. 2013) presentaron los resultados de un estudio preliminar en el cual aplican esta técnica de muestreo al análisis de 25 plaguicidas y otros contaminantes orgánicos en aguas subterráneas concluyendo que POCIS es una herramienta muy útil, especialmente en el análisis de contaminantes a muy bajas concentraciones.

Tras haber finalizado la toma de muestra, ésta debe permanecer en condiciones óptimas hasta su análisis lo que implica, entre otras cosas, evitar pérdidas indeseadas. Las pérdidas de los plaguicidas durante la toma de muestra puntual y en mayor escala durante la toma de muestra integrada (y durante el almacenamiento) de agua pueden ocurrir

principalmente como resultado de la hidrólisis, la biodegradación, la fotólisis y los procesos de evaporación (Barcelo y Alpendurada 1996, Luque y Rubio 2012), afectando de manera diferente a los diversos compuestos de acuerdo con sus propiedades físico-químicas. Por ejemplo, las triazinas, las cloroanilidas y los fenoxiácidos parecen ser más estables que otras clases de plaguicidas tales como los organofosforados y los carbamatos (Aboufadi et al 2010, Barcelo y Alpendurada 1996, Ferrer y Barcelo 1996). Para evitar o minimizar estas pérdidas se han adoptado diferentes estrategias: adición de productos químicos (por ejemplo, cloroformo, HgCl_2) (Bedding et al. 1988, Bourne 1978, Jeannot 1994), refrigeración (Casas et al 2007) y acidificación, así como también el almacenamiento de las muestras después de su extracción en fase sólida en el cartucho o en el disco utilizada para ésta o en el extracto orgánico resultante (Crescenzi et al. 1995, Lytikainen et al. 2003).

1.6.2. Pre-tratamiento de las muestras

La principal técnica de análisis de micro contaminantes orgánicos en matrices ambientales es la cromatografía (de gases o de líquidos).

En el caso del análisis de aguas, éstas deben contener la menor cantidad posible de materia sólida en suspensión y para este fin la filtración y la centrifugación son las técnicas más usadas. La necesidad o no de esta etapa dependerá de la cantidad de materia en suspensión que contenga la muestra, el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) de los analitos, y la técnica de extracción que le siga. Por ejemplo, para analizar muestras con alto contenido de material en suspensión, Pitarch y colaboradores (Pitarch et al. 2010) analizaron 51 plaguicidas en aguas residuales tratadas centrifugando las muestras a 3500 rpm durante 10 min antes de extraerlas.

Con todo, la técnica más usada para eliminar estos sólidos es la filtración. Moreno y colaboradores (Moreno-Gonzales et al. 2013) estudiaron el efecto de la filtración y de la cantidad de materia en suspensión en el análisis de 63 plaguicidas (y otros contaminantes) en muestras de agua superficial usando extracción por sorción sobre barras magnéticas (SBSE, del inglés *stir bar sorptive extraction*). Observaron que las bajas concentraciones de sólidos en suspensión tienen menos efecto sobre la recuperación de la extracción por SBSE que el proceso de filtración, y que si se tiene en cuenta el K_{ow} de los analitos, se puede estimar que menos del 20% del total de ellos podrían estar asociados a la fracción sólida. Al constatar la importancia del proceso de filtración, y con el objetivo de preparar muestras de agua superficial y residual para su posterior extracción y análisis de 20 plaguicidas (y otros contaminantes), Singer y colaboradores (Singer et al. 2010) analizaron la eficacia del proceso de filtración de 5 filtros de composiciones diferentes (celulosa regenerada, nitrato de celulosa, polietersulfona y filtros de microfibras de vidrio) con tamaños de poro variando de

0,45 a 1,5 μm y revelaron que los filtros de polietersulfona son los menos adecuados con pérdidas de hasta un 46% (diazinón) mientras que los filtros de microfibra de vidrio son los más apropiados. En la literatura también se observa una predominancia del uso de filtros de membrana de nylon (poro 0,45 μm) para excluir sólidos en suspensión (Kampioti et al., 2005, López-Serna et al. 2012, Masiá et al. 2013).

Para muestras sólidas como sedimentos, la preparación de la muestra consiste generalmente en secar previamente la muestra para su posterior homogenización, siempre que la técnica de extracción que le siga así lo exija. El secado de la muestra se puede realizar al aire libre y a temperatura ambiente (Zhao et al. 2013) o mediante liofilización de la muestra previamente congelada. Villaverde y colaboradores (Villaverde et al. 2008), tras haber congelado la muestra a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, la liofilizaron a $-0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 36 horas. La homogenización de la muestra seca puede ser parcial, limitándose a la retirada de piedras y otros sólidos indeseados, o puede ser más completa, usando trituradoras y después tamices de poros en la escala de los μm . Escoger la mejor técnica dependerá de los analitos que se quieran detectar. Usando la técnica de extracción Soxhlet para analizar 18 organohalogenados, Hellar y colaboradores (Hellar-Kihampa et al. 2013) liofilizaron las muestras y las homogeneizaron parcialmente. Por otro lado, para el análisis de plaguicidas prioritarios y organoclorados usando la técnica de extracción con líquidos presurizados (PLE, del inglés *Pressurized Liquid Extraction*), Villaverde y Zhao (Villaverde et al. 2008, Zhao et al. 2013) (respectivamente) tamizaron los sedimentos previamente liofilizados a 100 μm . También hay quien usa particulados menores. Gomez y colaboradores (Gomez et al. 2011) tamizaron las muestras de sedimento a 63 μm antes de la extracción de 19 organoclorados usando la técnica de extracción asistida por microondas (MAE, del inglés *Microwave assisted extraction*). Finalmente, hay estudios en los cuales la centrifugación del sedimento ha sido la técnica adoptada para la preparación de la muestra, como una alternativa a la liofilización y homogeneizado. Xue y colaboradores (Xue et al. 2008) centrifugaron previamente las muestras de sedimento mojado a 4000 rpm y a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para luego extraer 18 plaguicidas por sonicación (USE, del inglés *ultra-sonication extraction*).

1.6.3. Extracción de muestras

El sistema más tradicional de extracción de muestras líquidas que se sigue empleando hoy en día en algunas ocasiones es la extracción líquido-líquido (LLE, del inglés *liquid liquid extraction*). Buscando reducir el tiempo de análisis y aumentar la eficacia y la selectividad de los métodos de extracción, en los últimos años han surgido nuevas técnicas. De acuerdo con la revisión de Lambropoulou y Albanis, hay una serie de técnicas de microextracción en fase líquida (LPME, del inglés *liquid phase micro extraction*) nuevas aplicables

al análisis de residuos de plaguicidas (Lambropoulou y Albanis, 2007) como la micro extracción en gota (SDME, del inglés *single drop micro extraction*) y la micro extracción por flujo (CFME, del inglés *continuous flow micro extraction*), y otras técnicas como la extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid phase extraction*).

La variedad de métodos de extracción aplicados al estudio de plaguicidas en diversas matrices acuosas es amplia. La Tabla 1-4 presenta un resumen de las metodologías de análisis aplicadas en diversos estudios para el análisis de plaguicidas en muestras de agua. Al ordenar las técnicas de extracción aplicadas, se genera la Figura 1-12 en la que se observa claramente que la técnica más utilizada es la SPE, aplicada en casi el 80% de los estudios, de los cuales 36% la aplican de forma automática y en línea con la cromatografía (SPE online).

Tabla 1 - 4. Metodologías aplicadas en diversos estudios (orden cronológico) para el análisis de plaguicidas en muestras de agua.

Referencia	Año	Matriz ambiental	Plaguicidas	Pre-concentración / Extracción	Purificación	Separación / Detección
Nitschke et al.	1998	agua residual tratada	10	SPE (cartucho C18)	gel de Sílice	HPLC
Garrido et al.	2000	agua subterránea	44	SPE (cartucho C8) y LLE	ninguna	GC-MS y GC-ECD
Koerber et al.	2001	agua superficial	9	on-line SPE (RAM y MIP)	ninguna	LC-MS
Quintana et al.	2001	agua potable, subterránea y residual tratada	22	SPE (cartucho SDB)	ninguna	GC-MS
Asperger et al.	2002	agua potable y superficial	11	on-line SPE (columna TFC)	ninguna	HPLC(API)-MS/MS
Carabias-Martínez et al.	2003	agua subterránea	17	SPE (cartucho polimérico)	ninguna	HPLC-DAD
Hernández et al.	2004	agua subterránea y superficial	47	on-line SPE (cartucho polimérico)	ninguna	LC-MS/MS
Kolpin et al.	2004	agua subterránea	45	ninguno	ninguna	GC-MS y LC-MS
Rodríguez-Mozaz et al.	2004	agua potable, subterránea y superficial	5	SPE (cartucho LiChrolut RP-18)	ninguna	LC(API)-MS
El Atrache et al.	2005	agua superficial	12	SPE (cartucho C18)	ninguna	LC-MS/MS
Ibáñez et al.	2005	agua subterránea y superficial	3	on-line SPE (cartucho OASIS HLB)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Kampioti et al.	2005	agua potable, subterránea y superficial	20	on-line SPE (cartuchos de varios tipos)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Guzzella et al.	2006	agua subterránea	22	SPE (cartucho LiChrolut EN)	ninguna	LC-NPD y HPLC
Barata et al.	2007	agua superficial	15	on-line SPE (cartucho polimérico GP)	ninguna	LC-MS/MS
Hildebrandt et al.	2007	agua subterránea	30	SPE (cartucho OASIS HLB)	ninguna	GC-MS
Terrado et al.	2007	agua superficial	17	on-line SPE	ninguna	LC-MS/MS
Baugros et al.	2008	agua subterránea, superficial y residual tratada	17	SPE (cartucho Strata C-18)	ninguna	GC-MS/MS y LC-MS/MS
Carvalho et al.	2008	agua potable, subterránea y superficial	28	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Hildebrandt et al.	2008	agua subterránea y superficial	8	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	GC(EI)-MS
Kuster et al.	2008a	agua potable, superficial y residual	5	on-line SPE (cartucho polimérico GP)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Kuster et al.	2008b	agua superficial	17	on-line SPE (cartucho polimérico GP)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Cacho et al.	2009	agua subterránea y superficial	7	MISPE	ninguna	HPLC-DAD
Jordan et al.	2009	agua superficial	30	SPE (cartucho Bond Elut PPL)	ninguna	LC-MS/MS
Marin et al.	2009	agua potable, subterránea y superficial	37	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	UHPCL-MS/MS
Bueno et al.	2009	agua residual tratada	1	SPE (cartucho Oasis HLB)	filtración (0,45 µm)	LC-MS (QqLIT)
Bueno et al.	2009	agua residual tratada	1	SPE (cartucho Oasis HLB)	filtración (0,45 µm)	LC-MS (QqLIT)
Palma et al.	2009	agua superficial	16	on-line SPE (cartucho PLRPs)	ninguna	LC-MS/MS
van Pinxteren et al.	2009	agua superficial	10	MASE	ninguna	HPLC-MS/MS
van Pinxteren et al.	2009	agua superficial	10	SPE (cartucho C18)	ninguna	HPLC-MS/MS
Yu et al.	2009	agua superficial	4	SPE (cartucho Supelclean ENVI-18)	ninguna	RRLC(ESI)-MS/MS
Zamora et al.	2009	agua superficial	3	on-line MISPE	ninguna	HPLC-DAD
Kuster et al.	2010	agua subterránea y superficial	17	on-line SPE (cartucho PLRPs)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Loos et al.	2010	agua subterránea	23	SPE (Oasis HLB)	ninguna	LC-MS/MS
Morasch et al.	2010	agua potable y residual	13	SPE (cartuchos Oasis MCX y HLB)	ninguna	UPLC-MS/MS

APCI: ionización química a presión atmosférica (del inglés *atmospheric pressure chemical ionization*); API: ionización a presión atmosférica (del inglés *atmospheric pressure ionization*); DAD: detector de diodos en fila (del inglés *diode array detector*); DSPE: dispersión en fase sólida (del inglés *dispersive solid phase extraction*); ECD: detector de captura de electrones (del inglés *electron capture detector*); ESI: ionización por electropulverización (del inglés *electrospray ionization*); GC: cromatografía de gases (del inglés *gas chromatography*); HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución (del inglés *high performance liquid chromatography*); HRMS: espectrometría de masas de alta resolución (del inglés *high resolution mass spectrometry*); LC: cromatografía de líquidos (del inglés *liquid chromatography*); LLE: extracción líquido-líquido (del inglés *liquid liquid extraction*); MASE: extracción líquido-líquido asistida por membranas (del inglés *membrane assisted solvent extraction*); MIP: polímeros con impresión a nivel molecular (del inglés *molecularly imprinted polymers*); MISPE: SPE de impresión molecular (del inglés *molecularly imprinted solid phase extraction*); MS/MS: espectrometría de masas en tándem (del inglés *tandem mass spectrometry*); MS: espectrometría de masas (del inglés *mass spectrometry*); MSPE: SPE magnético (del inglés *magnetic solid phase extraction*) (continúa en la próxima página).

Tabla 1 - 4. (continuación).

Referencia	Año	Matriz ambiental	Plaguicidas	Pre-concentración / Extracción	Purificación	Separación / Detección
Pitarch et al.	2010	agua residual tratada	51	SPE (cartucho C18)	ninguna	GC-MS/MS
Pitarch et al.	2010	agua residual tratada	51	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	UHPLC-MS/MS
Postigo et al.	2010	agua subterránea	22	on-line SPE (cartucho PLRPs y GP)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Ricart et al.	2010	agua superficial	22	on-line SPE (cartucho PLRPs y GP)	ninguna	LC-MS/MS
Singer et al.	2010	agua superficial y residual	20	on-line SPE (cartucho Strata-X)	ninguna	LC-MS/MS
Brondi et al.	2011	agua superficial	3	QuEChERS	DSPE	GC-MS
Cahill et al.	2011	agua residual tratada	11	on-line SPE (columna de C18)	ninguna	LC-MS/MS
Fenoll et al.	2011	agua intersticial	48	sonicación	ninguna	LC-MS/MS
Lazaritiques et al.	2011	agua superficial	13	SPE (cartucho Strata X)	ninguna	LC-MS/MS
Zhao et al.	2011	agua subterránea	4	inyección directa (1mL)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Zhao et al.	2011	agua subterránea	4	SPE (disco C18)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Bono-Blay et al.	2012	agua subterránea	12	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	GC(ESI)-MS
Cappellini et al.	2012	agua superficial	4	SPE (cartucho C18)	ninguna	HPLC-DAD
Estévez et al.	2012	agua subterránea	4	SPE (cartucho C18)	ninguna	GC-MS
Estévez et al.	2012	agua subterránea	33	LLE	ninguna	LC-MS (QqToF)
Huntscha et al.	2012	agua subterránea	18	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	HPLC-MS/MS
Wang et al.	2012	agua subterránea, superficial y residual	43	on-line SPE (mezcla de 4 tipos)	ninguna	HPLC-DAD
Wode et al.	2012	agua potable y superficial	3	SDME	ninguna	UHPLC-HRMS
Wang et al.	2012	agua potable, superficial y residual tratada	40	on-line SPE (columna C18)	ninguna	GC-MS
Aydin et al.	2013	agua superficial	20	LLE	ninguna	GC-MS
Berho et al.	2013	agua subterránea	25	POCIS	ninguna	UPLC-MS/MS
Berho et al.	2013	agua subterránea	25	SPE (cartucho Oasis HLB)	ninguna	UPLC-MS/MS
Bonansa et al.	2013	agua subterránea	7	SPE (cartucho C18) y SPME	ninguna	GC-MS
Bonansa et al.	2013	agua potable y superficial	33	SPE (cartucho C18)	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Caldas et al.	2013	agua potable y superficial	12	SPE (cartucho Strata X)	ninguna	GC-MS
Fernández-Gómez et al.	2013	agua superficial	18	LLE	SPE (Silice)	GC-ECD
Hellar-Kihampa et al.	2013	agua subterránea y superficial	58	SPE (cartucho Oasis HLB)	filtración (0,45 µm)	LC(ESI)-MS
Herrero-Hernández et al.	2013	agua subterránea y superficial	43	SPE (cartucho Oasis HLB)	filtración (0,45 µm)	LC-MS/MS
Masiá et al.	2013	agua superficial y residual	63	SBSE	ninguna	GC-MS
Moreno-Gonzalez et al.	2013	agua superficial	3	on-line SPE (HTLC C18)	ninguna	UPLC(APCI)-MS/MS
Quinete et al.	2013	agua superficial	150	ninguno	filtración (0,45 µm)	LC(ESI)-MS/MS
Reemtsma et al.	2013	agua subterránea y superficial	3	SPME (gel polipirrol/sol)	ninguna	GC-NPD
Saraji et al.	2013	agua potable y subterránea	13	SPME (gel polipirrol/sol)	ninguna	GC-MS
Toan et al.	2013	agua potable y superficial	6	SPE (cartucho C18)	ninguna	GC-MS
Xie et al.	2013	agua potable y superficial	10	MSPE (adsorbente C18 modificado)	ninguna	GC-MS
Yang et al.	2013	agua superficial	10	LLE	SPE (Alúmina / Silice)	GC-ECD

(continuación) NPD: detector de nitrógeno-fósforo (del inglés nitrogen-phosphorus detector); POCIS: muestreador pasivo para compuestos orgánicos volátiles (del inglés Polar Organic Chemical Integrative Samplers); QqLIT: analizador híbrido cuadrupolo – trampa lineal de iones (del inglés linear ion trap); QqToF: analizador híbrido cuadrupolo – tiempo de vuelo (del inglés time of flight); QuEChERS: extracción rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura (del inglés Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe); RAM: Material de acceso restringido (del inglés restricted access material); RRLC: cromatografía de líquidos de rápida resolución (del inglés rapid resolution liquid chromatography); SBSE: extracción por sorción sobre barras magnéticas (del inglés stir bar sorptive extraction); SDB: Copolímero de estireno-divinilbenceno (del inglés styrene divinylbenzene copolymer); SPE: extracción en fase sólida (del inglés solid phase extraction); SPE-online: SPE en línea con la cromatografía; SPME: micro extracción en fase sólida (del inglés solid phase micro extraction); TFC: cromatografía de flujo turbulento (del inglés turbulent-flow chromatography); UHPLC: cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (del inglés ultra high performance liquid chromatography); UPLC: cromatografía de líquidos de ultra resolución (del inglés ultra performance liquid chromatography).

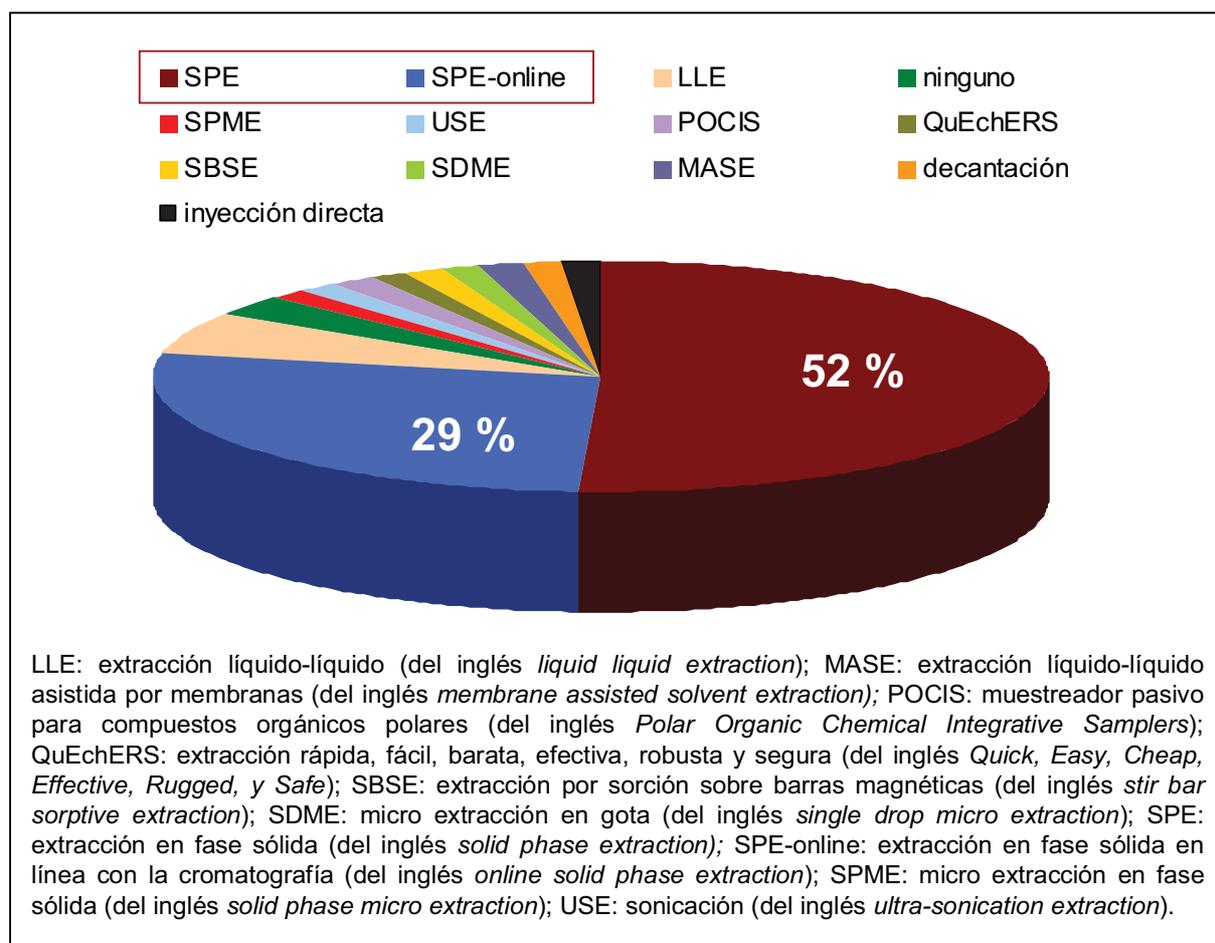


Figura 1 - 12. Resumen de las técnicas de extracción aplicadas a muestras de aguas en los estudios citados en la Tabla 1-4.

Los otros métodos (< 20%) se dividen en técnicas más convencionales, como la LLE y en técnicas más modernas que aportan selectividad, rapidez y eficacia a los métodos de extracción. Es el caso de la MAE, la micro extracción en fase sólida (SPME, del inglés *solid phase micro extraction*), la extracción con POCIS, la SBSE, la SDME, la extracción líquido-líquido asistida por membranas (MASE, del inglés *membrane assisted solvent extraction*) y la extracción QuEchERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*). Esta última técnica se dio a conocer bajo el nombre que atiende a las siglas de las palabras que significan Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro, y nació de la necesidad de crear un método simple, rápido, seguro y válido para llevar a cabo un análisis multi-residuo que proporcione unos resultados satisfactorios. Consiste en una extracción basada en el reparto de los analitos entre una fase acuosa y un disolvente, seguido de un paso de purificación de la fase orgánica mediante un proceso de extracción dispersiva en fase sólida (DSPE, del inglés *dispersive solid phase extraction*). Se aplica tanto en muestras acuosas (Brondi et al. 2011) como en muestras sólidas (Quinete et al. 2013). La técnica de extracción de plaguicidas de muestras acuosas aplicada en esta Tesis Doctoral es la extracción en fase

sólida en línea con la cromatografía de líquidos (SPE online) debido a su rapidez, selectividad y automatización, que permite la reducción de los errores asociados a la manipulación de la muestra.

La SPE es un proceso mediante el cual cantidades traza de un analito son selectivamente retenidas, separadas y concentradas a partir de volúmenes de muestra que pueden variar desde algunos mL (en el caso de SPE online) hasta litros, dependiendo de la matriz en estudio y de la técnica que se use. Las etapas consisten en: 1) acondicionado de la fase sólida del cartucho; 2) paso de la muestra por el cartucho (retención de los analitos); 3) lavado del cartucho; 4) secado del cartucho; 5) elución (extracción de los analitos del cartucho). En el caso de la SPE en línea con la cromatografía, los pasos son los mismos pero con pequeñas variaciones: los cartuchos son más pequeños y soportan altas presiones y el disolvente usado para eluir los analitos del cartucho es la propia fase móvil que llevará los analitos extraídos directamente a la columna cromatográfica.

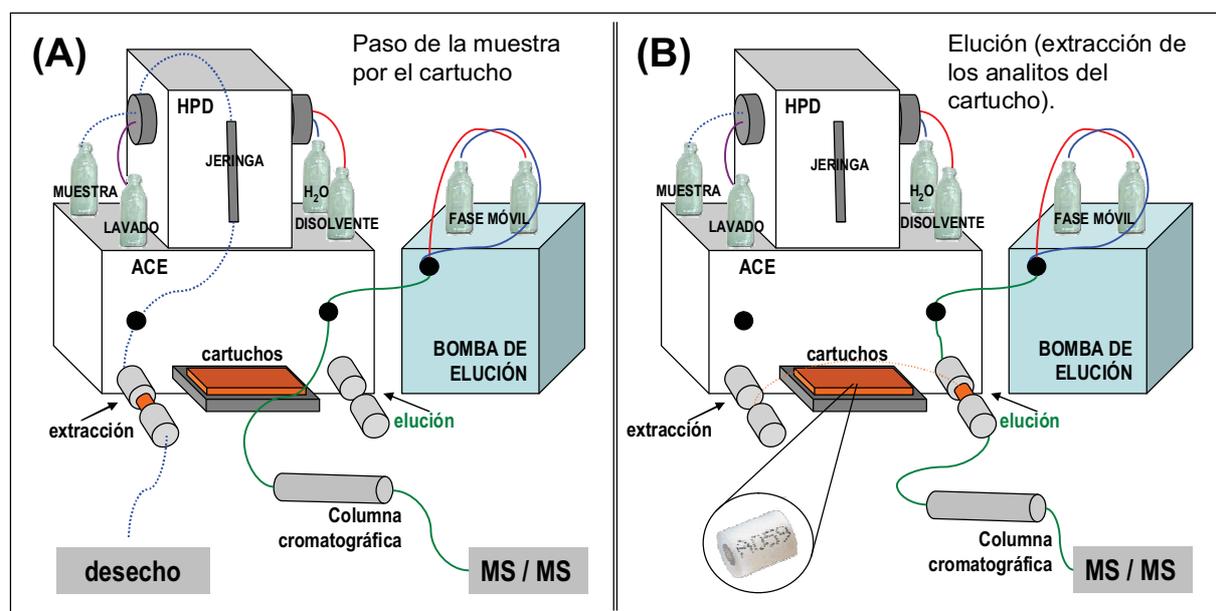


Figura 1 - 13. Esquema parcial de la extracción en fase sólida en línea con la cromatografía (SPE online): (A) paso de la muestra por el cartucho; (B) elución de los analitos hacia la columna cromatográfica.

La Figura 1-13 muestra los pasos de carga de muestra y elución de los analitos usando la técnica de SPE online aplicada en esta Tesis Doctoral. Esta técnica presenta varias ventajas entre las que destaca su sencillez y automatización. Las ventajas y también las limitaciones de esta técnica para el control de contaminantes emergentes (incluidos los plaguicidas) en aguas han sido discutidos por Mozaz y colaboradores (Mozaz-Rodríguez et al. 2007).

Para la SPE, los adsorbentes utilizados pueden ser no selectivos, como las fases con cadenas C8 (Garrido et al. 2000), con cadenas C18 (Toan et al. 2013) y diversos polímeros, o selectivos como los inmunoabsorbentes o los polímeros con impresión a nivel molecular (MIP, del inglés *molecularly imprinted polymers*) (Cacho et al. 2009).

Geiss y Gebert (Geiss y Gebert 2006) compararon el rendimiento de 21 cartuchos con diferentes materiales para la extracción de plaguicidas órganofosforados altamente polares de agua. Los resultados mostraron que los cartuchos poliméricos son los más eficaces en la extracción de los plaguicidas y también que los niveles de recuperación de los analitos usando este tipo de fase estacionaria están de acuerdo con los Kow de los mismos.

Como se observa en la Tabla 1-4, los cartuchos más usados por los investigadores para el análisis de plaguicidas en muestras de agua son los C18 y los OASIS HLB. Los últimos están preparados a base de un adsorbente de fase inversa polimérica universal que fue desarrollado para la extracción de una amplia gama de compuestos ácidos, básicos y neutros, permitiendo extraer compuestos tanto polares como apolares.

Hay que indicar que el análisis de los plaguicidas en matrices ambientales sólidas tales como suelos, fangos y sedimentos, se ha discutido en muchas menos ocasiones que en el agua, probablemente debido a la mayor complejidad de las matrices y a una menor legislación que en aguas.

En el caso de las muestras sólidas, el sistema de extracción más tradicional es la extracción sólido-líquido (SLE, del inglés *solid liquid extraction*), que incluye la extracción Soxhlet. Estas técnicas requieren el uso de grandes volúmenes de disolventes, en muchos casos son laboriosas, y en algunos casos lentas, como la extracción Soxhlet, que puede llegar a necesitar más de 24 h de tiempo de extracción. Con la finalidad de aplicar técnicas más rápidas y selectivas, en los últimos años han surgido nuevas técnicas, entre ellas, la USE, la extracción por simple agitación, la MAE, la dispersión en fase sólida de una matriz modificada (MMSPD, del inglés *modified matrix solid phase dispersion*), la extracción QuEChERS y la PLE. La Tabla 1-5 presenta un resumen de las metodologías de análisis aplicadas en diversos estudios para el análisis de plaguicidas en muestras sólidas, como sedimentos, suelos y fangos.

Tabla 1 - 5. Metodologías aplicadas en diversos estudios (orden cronológico) para el análisis de plaguicidas en muestras sólidas.

Referencia	Año	Matriz ambiental	Plaguicidas	Pre-concentración / Extracción	Purificación	Separación / Detección
Henriksen et al.	2002	suelo	5	PLE (ASE)	filtración (0,45 µm)	LC-MS/MS
Dagnac et al.	2005	suelo	12	PLE	ninguna	LC-MS y GC-MS/MS
Ibáñez et al.	2005	suelo	3	Agitación y centrifugación	filtración (0,45 µm)	LC(ESI)-MS/MS
Bermúdez-Couso et al.	2007	sedimento	6	SLE y USE	ninguna	GC-MS
Fuentes et al.	2007	suelo	6	MAEP	ninguna	GC-FPD y GC-MS/MS
Shen et al.	2007	suelo	5	MMSPD	ninguna	GC-NPD
Ghanem et al.	2008	fango	5	Agitación	SPE (cartucho Florisil)	LC(ESI)-MS/MS
Hladiz et al.	2008	sedimento / suelo	4	USE y filtración	SPE (cartucho Oasis HLB)	GC-MS
Lesueur et al.	2008	suelo	24	PLE (ASE)	filtración (0,45 µm)	GC-MS y LC-MS/MS
Villaverde et al.	2008	sedimento	28	PLE (ASE)	ninguna	GC-MS
Xue et al.	2008	sedimento	18	USE	SPE (cartucho Oasis HLB)	GC-ECD y MS
Baugros et al.	2009	fango	12	PLE (ASE)	SPE (cartucho Silice)	LC(ESI)-MS/MS
Drozdzyński et al.	2009	suelo	4	QuEChERS	DSPE (cartuchos PSA/C18)	UPLC-MS/MS
García-Valcarcel et al.	2009	fango	10	USE	DSPE (Bondesil-PSA)	LC(ESI)-MS/MS
Hildebrandt et al.	2009	suelo	22	PLE (ASE)	ninguna	GC-MS
Hutta et al.	2009	suelo	11	USE	ultrafiltración	LVI-HPLC-UV
Rosales-Contrado et al.	2009	suelo	1	Agitación y USE	ninguna	LC(ESI)-MS/MS
Navarro-Ortega et al.	2010	sedimento	26	PLE (ASE)	ninguna	GC-MS
Ricart et al.	2010	sedimento	22	PLE (ASE)	SPE (cartucho Carboxgraph)	LC-MS/MS
Abraham et al.	2011	sedimento	44	SLE	GPC	GC-MS
Brondi et al.	2011	sedimento	3	QuEChERS	DSPE	GC-MS
Gómez et al.	2011	sedimento	19	MAE	SPE	GC-ECD
Lazartiques et al.	2011	sedimento	13	SLE (centrifugación)	ninguna	LC-MS/MS
Sánchez-Ávila et al.	2011	sedimento	53	USE	SPE	GC(EI)-MS/MS
Wasswa et al.	2011	sedimento	16	SLE (agitación) y LLE	GPC	GC-ECD y GC-MS
Kvicalova et al.	2012	sedimento	9	QuEChERS	ninguna	LC-MS/MS
Liu et al.	2012	sedimento	21	USE	SPE (cartucho Silice)	GC-MS
Nomen et al.	2012	sedimento / suelo	10	Agitación	DSPE (20 g gel Sephadex)	GC-ECD y FPD
van Ael et al.	2012	sedimento	58	Soxhlet	SPE (cartucho de Silice)	GC-MS
Hellar-Kihampa et al.	2013	sedimento	18	Soxhlet	SPE (cartucho de Silice)	GC-ECD
Quinete et al.	2013	sedimento / suelo	3	QuEChERS	C18	LC(APCI)-MS/MS
Toan et al.	2013	sedimento	13	SLE (agitación) y LLE	SPE (cartucho C18)	GC-MS
Yang et al.	2013	sedimento	10	Soxhlet	Alumina / Silice	GC-ECD
Zhao et al.	2013	suelo	21	PLE (ASE)	gel de Silice / Alumina	GC-ECD

APCI: ionización química a presión atmosférica (del inglés *atmospheric pressure chemical ionization*); ASE: extracción acelerada por disolventes (del inglés *accelerated solvent extraction*); DSPE: dispersión en fase sólida (del inglés *dispersive solid phase extraction*); ECD: detector de captura de electrones (del inglés *electron capture detector*); ESI: ionización por electropulverización (del inglés *electrospray ionization*); FPD: detector fotométrico de llama (del inglés *flame photometric detector*); GC: cromatografía de gases (del inglés *gas chromatography*); GPC: cromatografía de permeación en gel (del inglés *gel permeation chromatography*); HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución (del inglés *high performance liquid chromatography*); LC: cromatografía de líquidos (del inglés *liquid chromatography*); LLE: extracción líquido-líquido (del inglés *liquid liquid extraction*); LVI: inyección de grandes volúmenes (del inglés *large volume injection*); MAEP: variación de la técnica MAE (con partición); MMSPD: dispersión en fase sólida de una matriz modificada (del inglés *modified matrix solid phase dispersion*); MS/MS: espectrometría de masas en tandem (del inglés *tandem mass spectrometry*); MS: espectrometría de masas (del inglés *mass spectrometry*); NPD: detector de nitrógeno-fósforo (del inglés *nitrogen-phosphorus detector*); PLE: extracción con líquidos presurizados (del inglés *pressurized liquid extraction*); QuEChERS: extracción rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura (del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe*); SLE: extracción sólido-líquido (del inglés *solid liquid extraction*); SPE: extracción en fase sólida (del inglés *solid phase extraction*); USE: sonicación (del inglés *ultra-sonication extraction*); UV: ultravioleta.

Al ordenar las técnicas de extracción aplicadas, se genera la Figura 1-14 en la que se observa claramente que la técnica más usada es la PLE y la USE. La USE es una técnica de extracción sólido-líquido que utiliza sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender los analitos de la matriz en que están retenidos. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, causando la transferencia de los analitos de la fase sólida al disolvente.

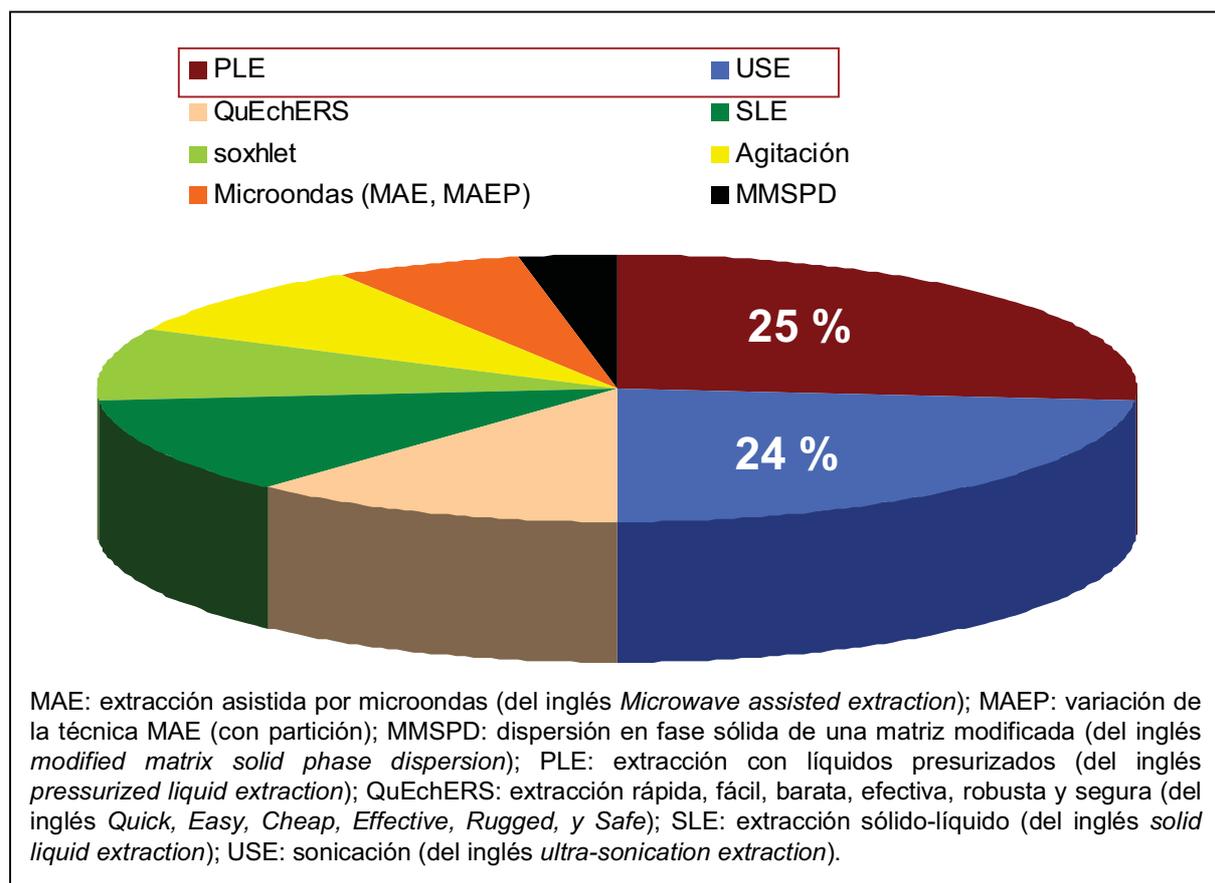


Figura 1 - 14. Resumen de las técnicas de extracción aplicadas a muestras sólidas en los estudios citados en la Tabla 1-5.

La técnica utilizada en esta Tesis Doctoral para la extracción de plaguicidas de muestras de sedimento es la de PLE y la purificación de los extractos se hizo mediante SPE. La PLE (ver Figura 1-15), también conocida por extracción con disolventes presurizados (PSE, del inglés *pressurized solvent extraction*) o por el nombre comercial extracción acelerada por disolventes (ASE, del inglés *accelerated solvent extraction*), se lleva a cabo a presiones elevadas, posibilitando trabajar con disolventes en fase líquida a temperaturas por encima de su punto de ebullición. La PLE consiste en los siguientes pasos: 1) carga de la celda de extracción con el material a extraer y con algún adsorbente (si se desea); 2) relleno de la celda con disolvente (0,5-1,0 min); 3) aumento de la temperatura y presión de la celda

(5 min); 4) extracción estática (5 min) (repetir en caso necesario); 5) purga de la celda con disolvente fresco (0,5 min); 6) purga de la celda con nitrógeno (1-2 min); 7) recogida del extracto. El proceso termina tras 12-18 min, dependiendo del tiempo asignado a cada paso (entre paréntesis se muestran los más habituales) y el número de ciclos estáticos aplicados (American Lab, 2013).

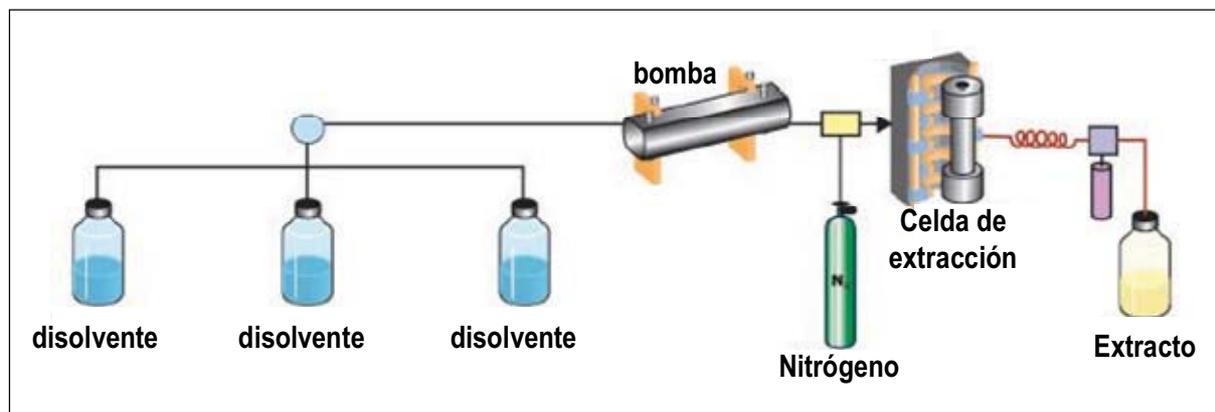


Figura 1 - 15. Esquema de la técnica de extracción por líquidos presurizados (PLE). Adaptación de American Lab, 2013.

Esta técnica permite el uso de volúmenes pequeños de disolventes generando de esa forma extractos menos diluidos. Es más, esta técnica se encuentra entre las catalogadas como “verdes” debido a su bajo consumo de disolventes orgánicos. Se trata de una técnica altamente automatizada que permite extraer muestras de forma rápida (< 30 min por muestra), por lo que es muy útil a la hora de realizar análisis de rutina, a pesar del alto coste del equipo

1.6.4. Análisis de las muestras

Las técnicas cromatográficas son la alternativa más viable para el análisis de residuos de plaguicidas, ya que son selectivas, sensibles, robustas y cubre un gran número de compuestos con diferentes propiedades físico-químicas (Ahumada y Guerrero, 2010). Las técnicas cromatográficas destacadas en los últimos años han sido la cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución y la cromatografía de gases de alta resolución.

La cromatografía de gases

Debido a la naturaleza más apolar de los primeros plaguicidas (por ejemplo, DDT), la cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*) ha sido históricamente la

técnica más empleada para el análisis de plaguicidas en matrices ambientales. Ésta es la técnica preferida para analizar diversos plaguicidas de polaridad relativamente baja, como los insecticidas órganoclorados endosulfan (Toan et al. 2013) y DDT (Yang et al. 2013), los órganofosforados famfur (Saraji et al. 2013) y paratión (Xie et al. 2013), y los piretroides como la cipermetrina (Toan et al. 2013). El uso intenso de la GC en el análisis de plaguicidas se observa claramente en las tablas 1-4 y 1-5, donde 27 y 62% de los estudios aplican esta técnica para el análisis de residuos de plaguicidas en aguas y en muestras sólidas, respectivamente. Sin embargo, compuestos polares, inestables térmicamente y con baja volatilidad no se analizan directamente por GC. En esos casos se requiere la derivatización de los analitos para formar compuestos más volátiles y estables, aumentando las etapas del proceso de análisis. Para esos casos la cromatografía de líquidos (LC, del inglés *liquid chromatography*) es más adecuada.

La cromatografía de líquidos

La LC tiene cada vez más adeptos debido a su amplia aplicación principalmente en el análisis de compuestos polares. Los carbamatos, las fenilureas, los órganofosforados, las triazinas, los compuestos de amonio cuaternario y los fenoxiácidos clorados son ejemplos de plaguicidas analizables por LC (Fernández-Alba 2005).

La Figura 1-16 muestra el diagrama de flujo de selección del modo de LC de acuerdo con las características del analito, destacando (en negrita) el modo adoptado para el análisis de plaguicidas en esta Tesis Doctoral.

Con todo, el tipo de fase estacionaria no es la única propiedad de la columna a tener en cuenta. El tamaño de poro, de partícula, y las dimensiones de la columna (longitud y diámetro interno) también deben escogerse con criterio, al igual que la fase móvil. Típicamente las moléculas pequeñas pueden difundirse fácilmente desde la entrada a la salida en rellenos de poros de 80 a 120 Å (Agilent 2009). El diámetro de la columna define cuánto material (masa) se puede inyectar en una columna; cuanto menor sea el diámetro, menor será la cantidad de material que se puede inyectar manteniendo una buena forma de pico. Las columnas de menor diámetro interno proporcionan mayor sensibilidad y, por lo tanto, se utilizan habitualmente para LC/MS y aplicaciones con muestra limitada. Sobre el tamaño de la partícula, para análisis convencionales de moléculas pequeñas y grandes, el tamaño estándar de partícula es de 5 µm, no obstante, hay disponibles tamaños de partícula más pequeños, los cuales proporcionan mayor eficacia y resolución siempre que el equipo cromatográfico esté en condiciones de trabajar a altas presiones (Agilent 2009). En esta Tesis Doctoral se usaron columnas de fase reversa (RP-LC, del inglés *reversed phase-liquid chromatography*) de tipo C18 de 125 mm de longitud, 2 mm de diámetro interno y 5 µm de

diámetro de las partículas. La fase móvil consistió en acetonitrilo (ACN) y agua en condiciones neutras.

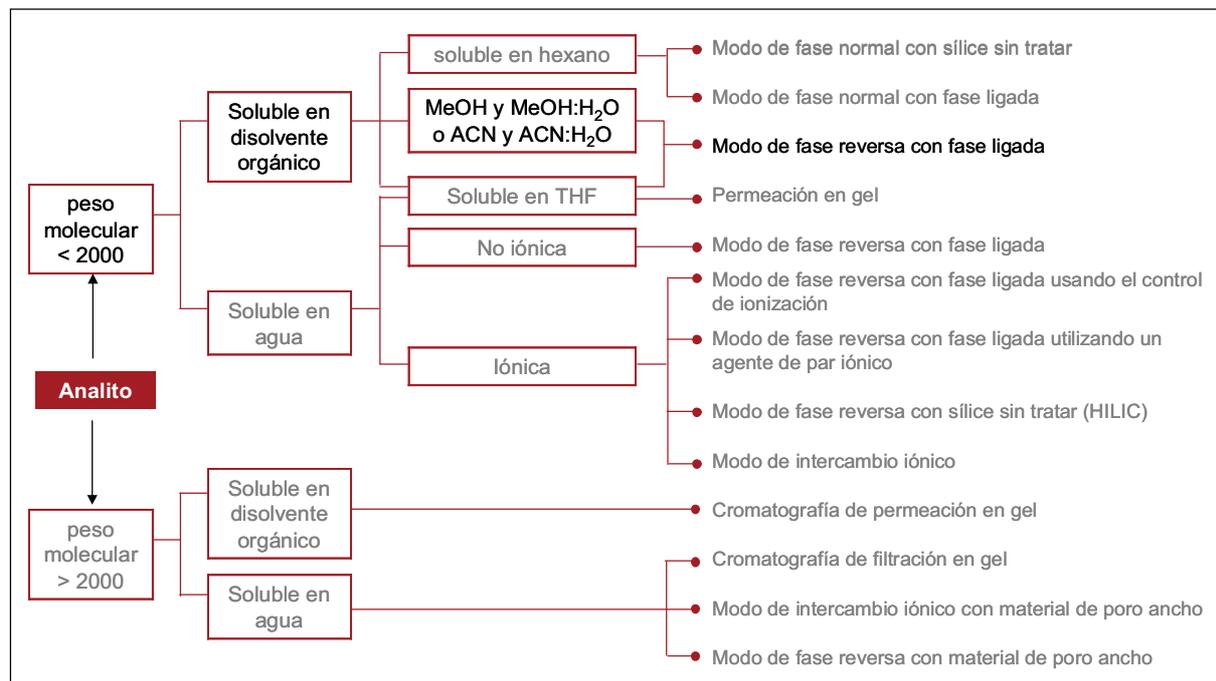


Figura 1 - 16. Diagrama de flujo de selección de modalidad de LC (adaptado de Bidlingmeyer, 1993).

La espectrometría de masas

La identificación y cuantificación de los plaguicidas se basa generalmente en el uso de GC o LC acopladas a espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS, respectivamente). La Figura 1-17 muestra que el 86% de los estudios presentados en la Tabla 1-4 (muestras de agua) se analizan haciendo uso de MS o MS/MS, al igual que el 71% de los estudios presentados en la Tabla 1-5 (muestras sólidas). El uso de plaguicidas cada vez más polares, fácilmente degradables, ha conducido a un aumento del desarrollo de métodos para la determinación de plaguicidas en muestras ambientales basados en LC-MS. La MS se puede usar para el análisis de muchos tipos de compuestos, desde unidades elementales hasta grandes proteínas y polímeros, en diferentes tipos de muestras (IBT-UNAM, 2013). Las metodologías de análisis LC-MS desarrolladas para el análisis de plaguicidas en agua han sido revisadas por Kuster y colaboradores en 2006 y nuevamente en 2009 (Kuster et al. 2006 y 2009). La aplicación de esta técnica de análisis en muestras biológicas ha sido revisada por Hernández y colaboradores (Hernández et al. 2005).

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa o líquida; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo

con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado (MNCN 2013). El espectrómetro consiste en: 1) un sistema de introducción de la muestra (generalmente a partir de un cromatógrafo), 2) una fuente de iones, 3) un analizador para la separación de los iones, y 4) un sistema de detección.

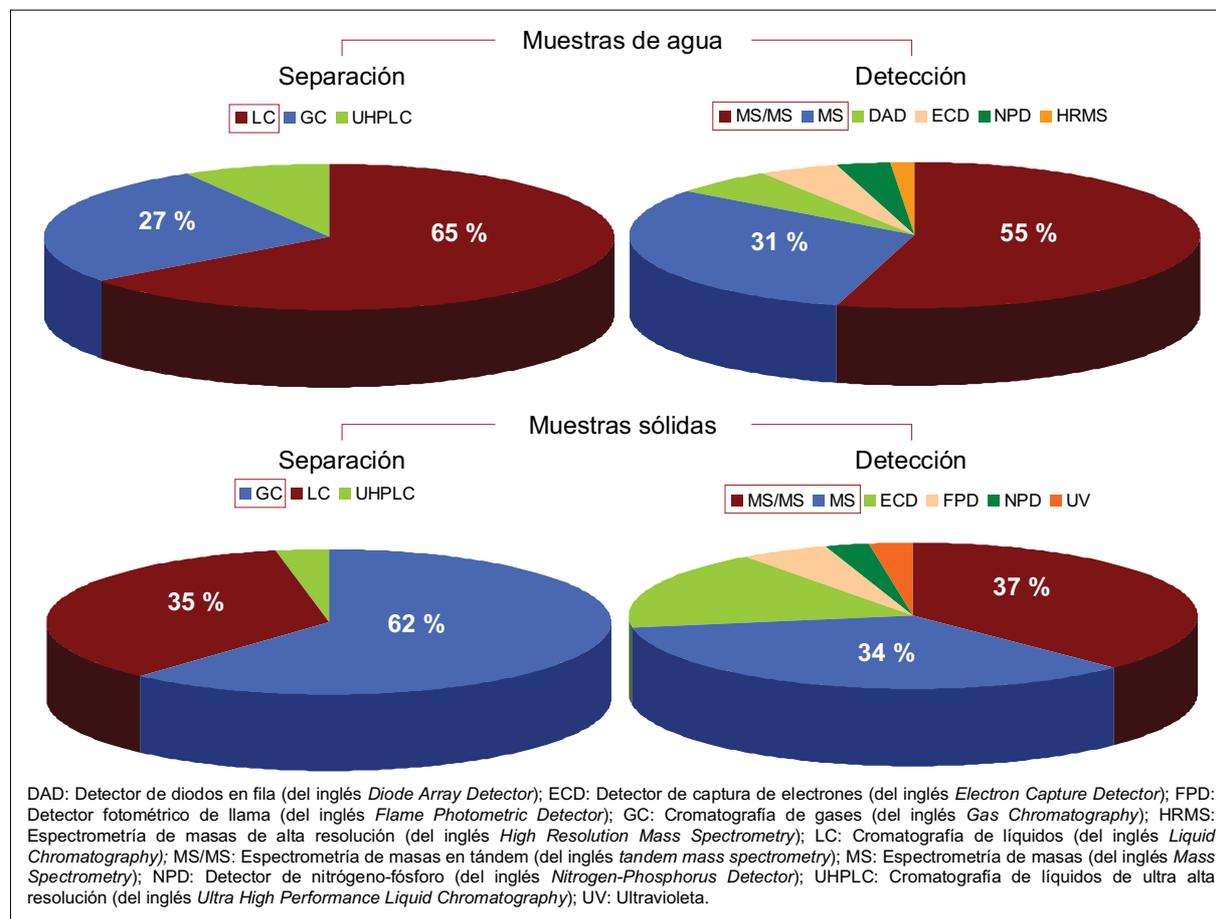


Figura 1 - 17. Resumen de las técnicas de separación y detección aplicadas a muestras de agua y muestras sólidas en los estudios citados en las tablas 1-4 y 1-5.

Fuentes de ionización

La ionización por impacto electrónico (EI, del inglés *electronic impact*), la ionización química a presión atmosférica (APCI, del inglés *atmospheric pressure chemical ionization*) y la ionización por electropulverización (ESI, del inglés *electrospray ionization*) son ideales para determinados grupos de compuestos: la de EI y la de APCI son ideales para el análisis de moléculas de peso molecular < 1000 Da, mientras que la de ESI se adapta fácilmente al análisis también de macromoléculas con pesos moleculares de hasta 100000 Da (MNCN 2013). Con relación a la polaridad de los analitos, la de EI resulta ideal para analizar moléculas de baja polaridad y por lo mismo suele acompañar métodos de GC (por ejemplo,

Sánchez-Ávila et al. 2011), a diferencia de la de ESI que se recomienda para el análisis de moléculas de polaridad media o alta, lo que la hace una técnica de ionización ideal para el análisis por LC (por ejemplo, Postigo et al. 2010). La técnica de APCI puede adaptarse a las dos técnicas cromatográficas, sin embargo su ionización selectiva la limita al análisis de cierto tipo de compuestos, con cierta volatilidad y con polaridad y peso molecular intermedios (por ejemplo, Rodríguez-Mozaz et al. 2004). En esta Tesis Doctoral, debido a la naturaleza semipolar y polar de los plaguicidas objeto de estudio, se aplicó la técnica de ESI para la ionización de los analitos.

Analizadores

Los analizadores en un espectrómetro de masas son los responsables de separar la mezcla de diversos iones a la salida de la fuente de iones con el fin de detectarlos de forma individual. Los más usados son los de tipo cuadrupolo (Q, del inglés *quadrupole*) y suelen estar en tándem (uso de una segunda etapa de análisis de masas en el mismo experimento). Esto se debe a que acoplado dos analizadores, separados por una cámara de colisiones, se puede obtener más información de la molécula. El más usado de ellos es el analizador de triple cuadrupolo (QqQ) seguido de los analizadores híbridos cuadrupolo – trampa lineal de iones (QqLIT) y cuadrupolo – tiempo de vuelo (QqToF). Las características intrínsecas de medición de alta exactitud de esta última técnica permite la identificación fiable de un gran número de productos de transformación en una sola etapa cromatográfica (Marín et al. 2009). Hace algunos años, Lacorte y Hernández (Hernández et al. 2008, Lacorte et al. 2006) publicaron revisiones sobre el uso de LC-ToF-MS en la investigación de metabolitos de plaguicidas, en agua y alimentos, respectivamente.

El analizador de QqQ se basa en dos cuadrupolos en línea separados por una cámara de colisión. Las primeras versiones del espectrómetro de triple cuadrupolo usaban otro cuadrupolo para la cámara de colisiones, y por eso el nombre de triple cuadrupolo (IBT-UNAM 2013). Cada uno de los cuadrupolos (Q) se basa en el uso de un campo eléctrico generado sobre cuatro barras metálicas paralelas por las cuales ocurre la separación de los iones de acuerdo con su relación masa-carga. Dependiendo del campo eléctrico producido, solamente ciertos iones (iones precursores, en inglés *precursor ions*) son dirigidos hacia la celda de colisión y posteriormente, tras su disociación, hacia el próximo Q donde hay una nueva selección de iones (iones producto, en inglés *product ions*) que son conducidos al detector, mientras que los demás iones son desviados hacia los polos.

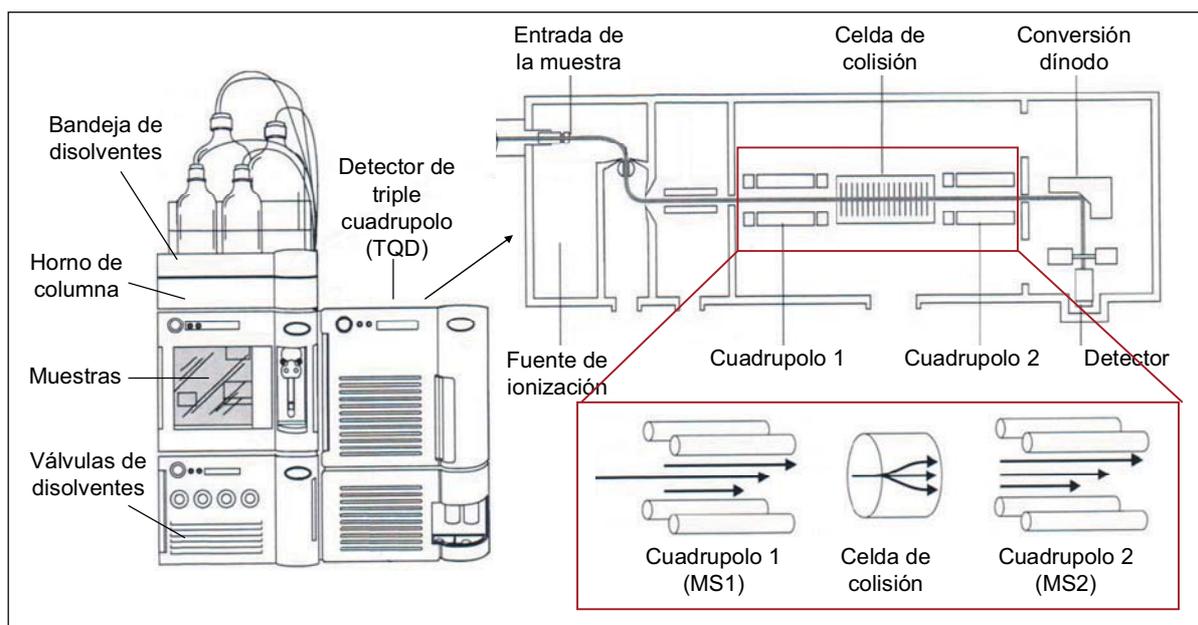


Figura 1 - 18. Esquema del sistema MS/MS de un ACQUITY® TQ Detector de la empresa Waters®.

Una de las desventajas de los analizadores cuadrupolares consiste en su poder de resolución relativamente pequeño y su limitado rango de utilización, ya que solo permite la separación de iones con relaciones m/e menores de 1.000. Por otro lado, sus principales ventajas residen en que los barridos pueden ser muy rápidos y la sensibilidad suele ser muy alta.

Esta Tesis Doctoral se llevó a cabo usando un espectrómetro de triple cuadrupolo (LC-ESI-MS/MS) como el representado en la Figura 1-18.

Básicamente todos los métodos de LC-MS recientemente publicados se basan en el uso de MS / MS (ver tablas 1-4 y 1-5). Esto se debe a que el patrón de fragmentación MS / MS es una herramienta poderosa para la obtención de confianza en la identificación de los compuestos. Además, el uso de la detección MS / MS añade sensibilidad y selectividad y permite el análisis sin separación cromatográfica completa entre los analitos y, por lo tanto, la reducción del tiempo de análisis (Borba da Cunha et al. 2004).

Efecto matriz

Uno de los problemas más comunes en el análisis de muestras del medio ambiente es que el extracto obtenido mediante las técnicas de extracción usuales contiene típicamente un gran número de componentes de la matriz, que pueden co-eluir con los analitos y comprometer el análisis cuantitativo (Petrovic et al. 2010). En el análisis de plaguicidas mediante cromatografía es común encontrarse, principalmente en la LC, con

variaciones en la respuesta inducidas por componentes de la matriz, resultando en aumentos o supresiones de la señal cromatográfica y consecuentemente en la pérdida de la exactitud, precisión y sensibilidad del método que conducen a cuantificaciones incorrectas y a una confirmación insegura (Marín et al. 2009).

A fin de corregir variaciones de la señal atribuidas en su gran mayoría a los efectos de la matriz resultante tras todo el proceso de extracción y purificación, los investigadores recurren principalmente a las siguientes técnicas:

- 1) a la dilución de la muestra o extracto, lo que reduce el contenido de materia indeseada pero conlleva en la mayoría de los casos a una disminución de la sensibilidad;
- 2) a la aplicación de métodos de extracción y purificación más selectivos y así reducir la co-extracción de materia indeseada;
- 3) al cambio de la fuente de ionización (cuando la ionización de los compuestos lo permite) a fuentes menos afectadas por materias indeseadas; por ejemplo, cambiar de ESI a APCI;
- 4) al uso de patrones internos (IS, del inglés *internal standard*).

La aplicación o no de las técnicas 1 a 3 está limitada por la naturaleza de las muestras y de los analitos. En algunos casos las características de la matriz son más relevantes para la evaluación del efecto sobre diversos plaguicidas que la cantidad presente de ella. Es lo que revelaron Ahumana y colaboradores al evaluar el efecto de diferentes matrices sólidas en la cuantificación de diversos plaguicidas por CG (Ahumana et al. 2010).

La técnica basada en el uso de IS está limitada tan solo por la disponibilidad comercial de esos patrones internos y consiste en adicionarle a las muestras (después de la extracción / purificación y antes de su análisis) IS, compuestos de la misma naturaleza que los analitos o en muchos casos los mismos analitos, pero marcados isotópicamente. Al no sufrir ninguno de los procesos previos al análisis cromatográfico, cualquier variación sufrida por estos IS se atribuye a los efectos de matriz, permitiendo la corrección de los mismos.

Sin embargo, el uso de estos IS (al finalizar los procesos de extracción y purificación) es eficiente pero no ideal. Si se usan como IS compuestos similares en estructura (por ejemplo, atrazina como IS para analizar simazina), el efecto que la matriz provoque sobre estos compuestos será similar a la causada sobre los analitos, pero no idéntica. Por otro lado, el uso de patrones internos marcados isotópicamente (SILIS, del inglés *stable isotopically labeled internal standard*) corregirá satisfactoriamente el efecto de la matriz, pero no los posibles errores cometidos previos a la detección de los analitos. Por ese motivo el uso de compuestos marcados isotópicamente del tipo ^2H (deuterio), ^{13}C , ^{15}N ó ^{17}O al inicio del proceso de extracción se ha transformado en una herramienta cada vez más aplicada por los científicos (a pesar de su alto coste) para el control de todos los efectos indeseados

causados durante todo el proceso de análisis. Tal y como se comenta en Marin et al. (2009), los SILIS permiten no solo corregir el efecto de la matriz, sino también otras posibles fuentes de errores durante todo el proceso de extracción y preparación de la muestra.

La aplicación de SILIS al inicio del proceso de análisis para la corrección de variaciones indeseadas de la señal es ideal para algunos autores (Nilsson, et al. 2012; Pailleux et al. 2012; Wode et al. 2012) y es particularmente importante en el análisis de muestras complejas, como los sedimentos de un río, donde los efectos de matriz suelen ser grandes y muy variables de una muestra a otra. Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Tudela y colaboradores, en el que estudiaron la supresión del efecto matriz al analizar muestras biológicas como la orina por LC-MS (Tudela et al. 2012). Sus resultados revelaron que los mejores recursos para corregir efectos de la matriz consisten en usar métodos de extracción más selectivos y el uso de SILIS al inicio del proceso de análisis.

Una modalidad de esta técnica consiste en el uso de la dilución isotópica (ID, del inglés *isotope dilution*), donde la señal de cada analito se corrige de forma individual por la señal resultante de la adición de su propio análogo marcado isotópicamente al inicio del proceso (por ejemplo, simazina d10 como IS para analizar simazina). Se trata de una técnica ideal, pero que exige la aplicación de un gran número de SILIS, lo que la transforma en una técnica de altísimo coste que no todos los laboratorios están en condiciones de utilizar. Esta Tesis Doctoral se llevó a cabo con el uso de la técnica de dilución isotópica, como herramienta en el control de las variaciones de señal de los analitos causadas por los efectos de matriz y por los posibles errores cometidos durante el tratamiento de las muestras.

1.7. Compuestos investigados

La Tabla 1-6 muestra los plaguicidas y productos de transformación investigados en los tres tipos de estudios llevados a cabo durante esta Tesis Doctoral: plaguicidas en aguas (residuales, superficiales y subterráneas), plaguicidas durante el proceso de recarga artificial de acuíferos (aguas superficiales, intersticiales, subterráneas, sedimentos), y plaguicidas en sedimentos de río.

Los compuestos investigados pertenecen a 7 grupos químicos diferentes y sus estructuras y propiedades físico-químicas se encuentran en la Tabla 1-7.

Ácidos: Esta familia de compuestos engloba aquellos plaguicidas derivados de ácidos, normalmente de tipo fenoxi. De ellos, el más conocido es el 2,4-D que, junto con el MCPA, ha sido usado intensamente durante años en todo el mundo. Estos herbicidas tienen complejos mecanismos de acción, afectando a la división celular, activando el metabolismo

del fosfato y modificando el metabolismo del ácido nucleico, afectando también a la síntesis de proteínas.

Anilidas y cloroacetanilidas: Son plaguicidas que inhiben la síntesis de proteínas afectando al crecimiento normal de la planta. Es por ello que se usan tanto en aplicaciones de pre-emergencia como de post-emergencia, incorporándolos al suelo desde donde se absorben por los brotes de las semillas germinadas o por vía radicular. Suelen ser bastante tóxicos, como en el caso del alacloro, incluido en la lista de las 33 sustancias prioritarias de la UE (Unión Europea).

Benzotiadiazinas: Son compuestos heterocíclicos, con al menos un átomo de nitrógeno. Uno de los herbicidas más conocidos de esta familia es la bentazona, que no presenta un comportamiento sistémico, sino más bien de contacto por lo que es de aplicación foliar. Este plaguicida ejerce su acción herbicida por inhibición de la síntesis de lípidos en la zona foliar de la planta, limitando su formación. La bentazona presenta una gran movilidad en suelo, por lo que no suele acumularse en el medio ambiente. Estos plaguicidas se usan tanto en la agricultura como a nivel doméstico.

Fenilureas: Estos compuestos se obtienen al sustituir tres de sus hidrógenos de la urea por diversos radicales. Son relativamente persistentes en los suelos en donde pueden permanecer durante un periodo de 3 a 6 meses bajo condiciones de humedad y temperatura favorables, con poca o ninguna lixiviación. Se aplican normalmente al suelo cultivable antes de la plantación, en forma de emulsiones líquidas o por fumigación. Su toxicidad es menor que la de los órganoclorados y órganofosforados y son generalmente muy persistentes en el medio.

Órganofosforados: Son sustancias sintéticas, normalmente ésteres, amidas o tioles, conocidos desde principios del siglo XIX. Se usan en distintas áreas y con multitud de aplicaciones. Su uso más importante y extendido se encuentra en la agricultura, como fitosanitarios, aplicados con fines herbicidas o fungicidas pero, sobre todo, nematicidas e insecticidas. La aplicación directa a los cultivos suele hacerse en forma de emulsiones, granulados o por fumigación. También es común el uso de estos compuestos en tratamiento de semillas. Los plaguicidas órganofosforados no suelen ser bioacumulables y se degradan rápidamente por reacciones de hidrólisis que dependen de factores como el pH del medio.

Tabla 1 - 6. Plaguicidas y productos de transformación investigados en esta Tesis Doctoral.

Plaguicida	Grupo químico	Estudios		
		En aguas	Durante recarga*	En sedimento
2,4-D	ácido			
MCPA	ácido			
Mecoprop (MECO)	ácido			
Propanil (PROP)	anilida			
Bentazona (BEN)	benzotiadiazina			
Alacloro (ALA)	cloroacetanilida			
Metolaclo (METO)	cloroacetanilida			
Clortolurón (CLO)	fenilurea			
Diurón (DIU)	fenilurea			
Isoproturón (ISO)	fenilurea			
Linurón (LINU)	fenilurea			
Clorfenvinfos (CFP)	organofosforado			
Clorpirifos (CPF)	organofosforado			
Diazinon (DIAZ)	organofosforado			
Dimetoato (DIME)	organofosforado			
Fenitrotión (FEN)	organofosforado			
Fenitrotión oxon (FOX)	organofosforado			
Malaoxón (MOX)	organofosforado			
Malatión (MALA)	organofosforado			
Molinato (MOLI)	tiocarbamato			
Atrazina (ATR)	triazina			
Cianazina (CIA)	triazina			
Deisopropilatrazina (DIA)	triazina			
Desetilatrazina (DEA)	triazina			
Simazina (SIMA)	triazina			
Hidroxi simazina (SOH)	triazina			
Terbutilazina (TER)	triazina			

* Muestras de agua y de sedimento.

Tiocarbamatos: Son derivados del ácido carbámico. Algunos productos de este grupo suelen ser herbicidas, otros son insecticidas o fungicidas. Suelen ser volátiles y se degradan bastante tanto en la planta como en el suelo. Uno de sus principales representantes es el herbicida molinato, usado intensamente en el cultivo del arroz.

Triazinas: Este grupo de herbicidas es uno de los más conocidos y utilizados desde hace más de 40 años. La estructura común de estas sustancias es un anillo aromático de seis miembros en el cual están presentes 3 nitrógenos. La mayoría de las triazinas presentan una baja solubilidad en agua (a diferencia de sus productos de transformación), lo que indica una alta estabilidad y una mayor solubilidad en medios orgánicos. Su uso más habitual se encuentra en la agricultura en donde se aplican como herbicidas para controlar malezas tanto de un modo preventivo como curativo. Una vez incorporadas en el suelo pueden ser absorbidas por las plantas o degradadas durante un periodo de días a meses aunque en general se puede afirmar que son altamente persistentes (algunas hasta un año), lo que puede provocar contaminación de las aguas subterráneas cercanas.

Todos estos plaguicidas se aplican o se aplicaban (en el caso de los plaguicidas actualmente prohibidos) en diversas áreas; en los cultivos agrícolas, en los centros urbanos y en los animales de uso en ganadería y domésticos. Las tablas 1-8 y 1-9 presentan en detalle el ámbito de uso de los insecticidas/fungicidas y de los herbicidas, respectivamente. Para ello, se consultaron las siguientes fuentes:

- Parasitipedia, Substancias activas. Disponible en Internet:
http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=category&id=85&Itemid=344, consultado en marzo de 2013.
- Terralia, Vademécum de productos fitosanitarios y nutricionales. Disponible en Internet:
http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php, consultado en marzo de 2013.
- Cheminova, Nueva formulación de dimetoato progress. Disponible en Internet:
<http://www.cheminova.es/sites/default/files/documentos/pdf/mt%20Danadim%20progress.pdf>, consultado en marzo de 2013.
- Tragusa, Catálogo de herbicidas. Disponible en Internet:
<http://www.tragusa.com/es/catalogo/ficha.php?producto=13>, consultado en marzo de 2013.
- FAO (1997). Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55). E.D. Ongley; Canadá. Disponible en Internet:
<http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s09.htm>, consultado en marzo de 2013.
- Césped, Plagas de césped. Disponible en Internet: <http://www.cesped.es/plagas-del-cesped-gusanos-rosquilla-hormigas-mariposas-insectos-lombrices-babosas.php>, consultado en marzo 2013.

Tabla 1 - 7. Plaguicidas y productos de transformación investigados en esta tesis: estructura molecular, número CAS, MM, solubilidad en agua, Pka, K_{oc} , K_{ow} , constante de Henry e índice GUS.

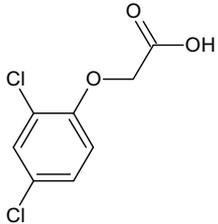
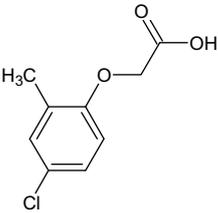
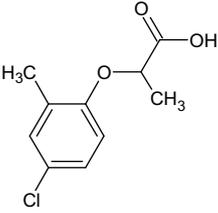
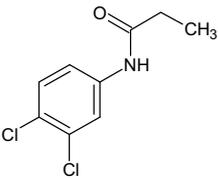
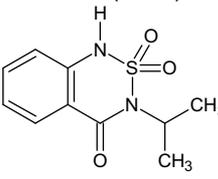
Plaguicida	No. CAS	MM (g/mol)	solubilidad (mg/L)	Pka	K_{oc} (mL/g)	K_{ow}	Cte. Henry (Pa m ³ /mol)	GUS
HERBICIDAS ÁCIDOS								
2,4-D 	94-75-7	221,04	23180	2,87	56	-0,83	$1,30 \times 10^{-05}$	2,25
MCPA 	94-74-6	200,62	29390	3,73	74	-0,81	$5,50 \times 10^{-05}$	2,51
Mecoprop (MECO) 	7085-19-0	214,65	250000	3,11	31	-0,19	$2,20 \times 10^{-04}$	2,29
ANILIDAS								
Propanil (PROP) 	709-98-8	218,08	225	n/d	400	2,29	$1,74 \times 10^{-04}$	0,42
BENZOTIAZINAS								
Bentazona (BEN) 	25057-89-0	240,28	570	3,28	51	-0,46	$7,20 \times 10^{-05}$	2,55

Tabla 1 - 7. (continuación).

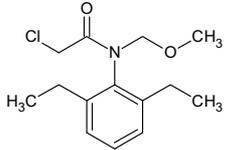
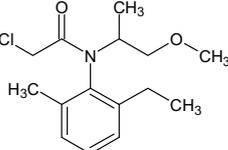
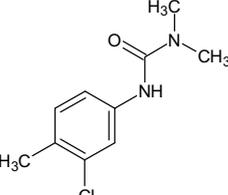
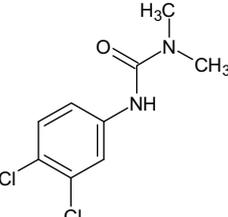
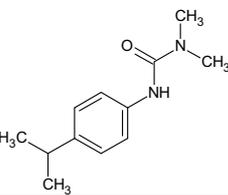
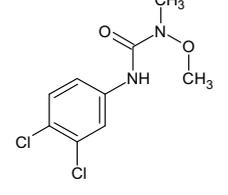
Plaguicida	No. CAS	MM (g/mol)	solubilidad (mg/L)	Pka	K _{oc} (mL/g)	K _{ow}	Cte. Henry (Pa m ³ /mol)	GUS
CLOROACETANILIDAS								
Alacloro (ALA)								
	15972-60-8	269,77	240	0,62	124	3,09	3,20 X 10 ⁻⁰³	2,19
Metolacloro (METO)								
	51218-45-2	283,80	530	n/d	200	3,4	2,40 X 10 ⁻⁰³	3,32
FENILUREAS								
Clortolurón (CLO)								
	15545-48-9	212,68	74	n/d	205	2,5	1,44 X 10 ⁻⁰⁵	2,79
Diurón (DIU)								
	330-54-1	233,10	35,6	-1	1067	2,87	2,00 X 10 ⁻⁰⁶	1,83
Isoproturón (ISO)								
	34123-59-6	206,29	70,2	n/d	122	2,5	1,46 X 10 ⁻⁰⁵	2,07
Linurón (LINU)								
	330-55-2	249,10	63,8	n/d	620	3	2,00 X 10 ⁻⁰⁴	2,03

Tabla 1 - 7. (continuación).

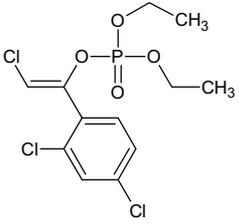
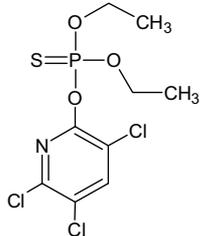
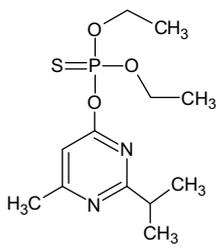
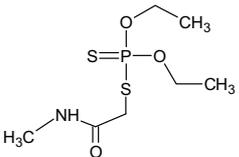
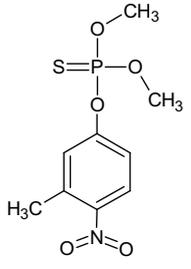
Plaguicida	No. CAS	MM (g/mol)	solubilidad (mg/L)	Pka	K _{oc} (mL/g)	K _{ow}	Cte. Henry (Pa m ³ /mol)	GUS
ÓRGANOFOSFORADOS								
Clorfenvinfos (CFP) 	470-90-6	359,58	145	n/d	680	3,8	3,24 X 10 ⁻⁰¹	1,87
Clorpirifos (CPF) 	2921-88-2	350,59	1,05	n/d	8151	4,7	4,78 X 10 ⁻⁰¹	0,15
Diazinón (DIAZ) 	333-41-5	304,35	60	2,6	643	3,69	6,09 X 10 ⁻⁰²	1,14
Dimetoato (DIME) 	60-51-5	229,26	39800	n/d	30	0,70	1,42 X 10 ⁻⁰⁶	1,05
Fenitrotión (FEN) 	122-14-5	277,24	19	7,20	322	3,32	9,86 X 10 ⁻⁰³	0,64

Tabla 1 - 7. (continuación).

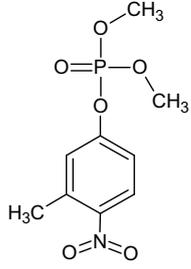
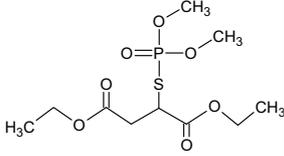
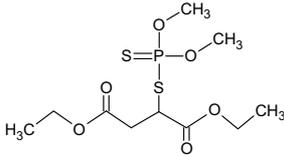
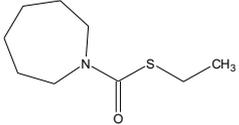
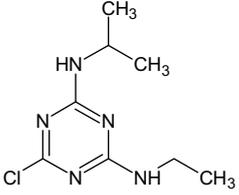
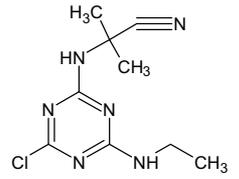
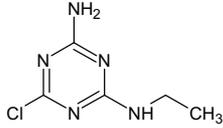
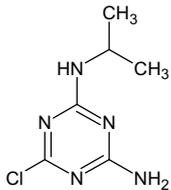
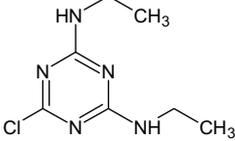
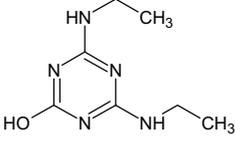
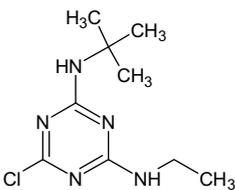
Plaguicida	No. CAS	MM (g/mol)	solubilidad (mg/L)	Pka	K _{oc} (mL/g)	K _{ow}	Cte. Henry (Pa m ³ /mol)	GUS
Fenitrotión oxon (FOX) 	2255-17-6	261,17	301	n/d	n/d	1,69	n/d	n/d
Malaoxon (MOX) 	1634-78-2	314,30	7500	n/d	n/d	0,52	n/d	n/d
Malatión (MALA) 	121-75-5	330,36	148	n/d	217	2,75	1,00 X 10 ⁻⁰³	-1,28
TIOCARBAMATOS								
Molinato (MOLI) 	2212-67-1	187,31	1100	n/d	190	2,86	6,87 X 10 ⁻⁰¹	2,49
TRIAZINAS								
Atrazina (ATR) 	1912-24-9	215,68	35	12,3	100	2,7	1,50 X 10 ⁻⁰⁴	3,75
Cianazina (CIA) 	21725-46-2	240,69	171	12,9	190	2,1	6,60 X 10 ⁻⁰⁶	2,07

Tabla 1 - 7. (continuación).

Plaguicida	No. CAS	MM (g/mol)	solubilidad (mg/L)	Pka	K _{oc} (mL/g)	K _{ow}	Cte. Henry (Pa m ³ /mol)	GUS
Deisopropilatrazina (DIA) 	1007-28-9	173,61	670	n/d	142	1,15	1,52 X 10 ⁻⁰⁵	n/d
Desetilatrazina (DEA) 	6190-65-4	187,63	3200	n/d	72	1,51	1,55 X 10 ⁻⁰⁴	3,54
Simazina (SIMA) 	122-34-9	201,66	5	1,62	130	2,3	5,60 X 10 ⁻⁰⁵	3,35
Hidroxi simazina (SOH) 	2599-11-3	183,21	32,8	n/d	n/d	1,67	n/d	n/d
Terbutilazina (TER) 	5915-41-3	229,71	6,6	2	231	3,4	4,18 X 10 ⁻⁰³	3,07

CAS: número de identificación numérica única para compuestos químicos (del inglés Chemical Abstracts Service registry number); Cte. Henry: relación entre la concentración de una sustancia en aire y su concentración en agua en equilibrio; GUS: estimación del potencial de lixiviación de un plaguicida hacia aguas subterráneas (del inglés *groundwater ubiquity score*); MM: masa molecular; K_{oc}: coeficiente de partición del carbono orgánico; K_{ow}: coeficiente de partición octanol-agua; Pka: constante de ionización ácido-base; n/d: no disponible. Fuentes: 1) Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K. and Lee, S.C., 2006. Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals, Taylor & Francis Group, LLC, Florida, 4182 pp. 2) Agriculture & Environment Research Unit (AERU). The PPDB, Pesticide Properties Database. University of Herfordshire, UK. Disponible en: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>, consultado en 2010.

Tabla 1 - 8. Ámbito de aplicación de los insecticidas/fungicidas objeto de estudio. Celdas en amarillo indican plaguicidas que se formulan en conjunto para un uso dado.

USO DE LOS ÓRGANOFOSFORADOS	CFP*	CPF	DIAZ*	DIME	FEN*	MALA
ANIMALES (ganadería / domésticos)	X	X	X		X	X
ácaros	X		X		X	X
chinches			X		X	
cucarachas		X	X		X	
garrapatas	X	X	X		X	
gusaneras	X					
hormigas					X	
insectos		X	X		X	X
miasis	X	X				
moscas	X	X	X		X	X
mosquitos			X			X
piojos	X	X	X			X
polillas	X	X				
pulgas	X	X	X		X	X
sarna	X		X			X
tábanos			X			
termitas		X				
USO URBANO		X	X	X	X	X
almacenaje de granos					X	
árboles de sombra					X	
áreas no cultivadas		X				
caminos, pistas ferroviarias						
césped		X	X		X	
parques y jardines			X	X		X
plantas ornamentales (preservación)					X	
CULTIVOS		X	X	X	X	X
azucarera		X				
→ caña de azúcar o remolacha		X				
cereales		X			X	
→ arroz				X	X	X
→ avena						
→ cebada						
→ centeno						
→ maíz		X				
→ sorgo						
→ trigo						
→ triticale						
plantas ornamentales		X		X		
→ claveles				X		

Tabla 1 - 8. (continuación).

USO DE LOS ÓRGANOFOSFORADOS	CFP*	CPF	DIAZ*	DIME	FEN*	MALA
→ palmáceas		X				
→ solanáceas		X				
hortalizas de fruto		X	X			
→ berenjena		X				
→ calabaza						
→ fresa y fresón		X				
→ melón						
→ pimiento		X				
→ sandía						
→ tomate		X				
hortalizas de flor		X				
→ alcachofa		X				
hortalizas de hoja		X		X		
→ col		X				
→ espárrago		X				
→ repollo		X		X		
hortalizas de raíces y bulbos		X	X			
→ ajo						
→ cebolla		X				
→ rábano		X				
→ zanahoria		X				
hortalizas leguminosas		X	X			
→ guisantes						
→ habas						
→ judías verdes		X				
leguminosas grano		X		X		
→ garbanzos				X		
→ guisantes						
→ habas						
→ judías		X				
plantas oleaginosas		X		X	X	
→ algodón (semilla)		X		X	X	
→ girasol		X				
→ lino textil (semilla)						
→ soja						
plantas textiles		X		X	X	
→ algodón (bruto)		X		X	X	
→ lino textil (fibra)						
raíces y tubérculos		X		X		
→ remolacha		X		X		

Tabla 1 - 8. (continuación).

USO DE LOS ÓRGANOFOSFORADOS	CFP*	CPF	DIAZ*	DIME	FEN*	MALA
→ patata		X				
plantas industriales varias		X	X			
→ tabaco		X	X			
gramíneas						
→ pastos de gramíneas						
→ prados de gramíneas						
→ césped de gramíneas						
leguminosas forrajeras		X				
→ alfalfa		X				
→ márgenes de cultivo						
→ trévol						
→ pastizales		X				
frutales cítricos		X		X	X	X
→ naranjas, limones, otros		X		X		
frutales carnosos		X				X
→ frambuesa		X				
→ grosella		X				
→ piña						
→ plátano		X				
frutales de hueso		X	X		X	X
→ albaricoque						
→ cereza		X				
→ ciruelas		X				
→ melocotón		X				
→ nectarina						
frutales de pepita		X	X	X	X	X
→ manzana						
→ pera		X				
→ avellanas		X				
→ olivas		X		X		
→ viñas		X				

* Sustancia prohibida (status en marzo de 2013)

Tabla 1 - 9. Ámbito de aplicación de los herbicidas objeto de estudio. Celdas en amarillo indican plaguicidas que se formulan en conjunto para un uso dado.

USO DE LOS HERBICIDAS**	ácidos				fenilureas				anilida			triazinas				tioc.
	2,4-D	BEN	MCPA	MECO	CLOR	DIU	ISO	LIN	ALA*	METO*	PROP*	ATR*	CIA*	SIMA*	TBA	MOLI
USO URBANO			X	X		X							X	X	X	
almacenaje de granos																
árboles de sombra																
áreas no cultivadas			X										X		X	
caminos, pistas ferroviarias						X								X		
césped	X		X	X										X	X	
parques y jardines														X		
plantas ornamentales (preservación)														X		
CULTIVOS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
azucarera												X				
→ caña de azúcar o remolacha												X				
cereales	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
→ arroz		X	X								X					X
→ avena	X		X	X												
→ cebada	X	X	X	X	X	X	X									
→ centeno	X	X	X	X												
→ maíz	X	X	X	X		X		X	X	X		X	X	X	X	
→ sorgo			X			X						X				
→ trigo	X	X	X	X	X	X	X						X			
→ triticale	X		X													
plantas ornamentales																
→ claveles																
→ palmáceas																
→ solanáceas																
hortalizas de fruto	X		X													
→ berenjena			X													
→ calabaza																
→ fresa y fresón	X		X													
→ melón																
→ pimiento																
→ sandía			X													
→ tomate			X													
hortalizas de flor								X								
→ alcachofa								X								
hortalizas de hoja						X	X							X		

Tabla 1 - 9. (continuación).

USO DE LOS HERBICIDAS**	ácidos				fenilureas				anilida			triazinas				tioc.
	2,4-D	BEN	MCPA	MECO	CLOR	DIU	ISO	LIN	ALA*	METO*	PROP*	ATR*	CIA*	SIMA*	TBA	MOLI
→ col																
→ espárrago						X		X						X		
→ repollo																
hortalizas de raíces y bulbos																
→ ajo								X								
→ cebolla								X								
→ rábano																
→ zanahoria								X								
hortalizas leguminosas		X						X								
→ guisantes		X														
→ habas								X								
→ judías verdes		X														
leguminosas grano		X				X	X	X								
→ garbanzos																
→ guisantes		X														
→ habas								X								
→ judías		X														
plantas oleaginosas		X	X			X		X	X	X		X			X	
→ algodón (semilla)						X			X						X	
→ girasol								X	X	X						
→ lino textil (semilla)			X									X				
→ soja		X							X							
plantas textiles			X			X									X	
→ algodón (bruto)						X									X	
→ lino textil (fibra)			X													
raíces y tubérculos		X				X		X	X	X						
→ remolacha									X							
→ patata		X				X		X	X	X						
plantas industriales varias																
→ tabaco																
gramíneas	X		X	X												
→ pastos de gramíneas	X		X													
→ prados de gramíneas	X		X	X												
→ césped de gramíneas			X	X												
leguminosas forrajeras		X	X			X								X		
→ alfalfa		X				X								X		
→ márgenes de cultivo			X													

Tabla 1 - 9. (continuación).

USO DE LOS HERBICIDAS**	ácidos				fenilureas				anilida			triazinas				tioc.
	2,4-D	BEN	MCPA	MECO	CLOR	DIU	ISO	LIN	ALA*	METO*	PROP*	ATR*	CIA*	SIMA*	TBA	MOLI
→ trévol		X														
→ pastizales																
frutales cítricos	X		X			X						X		X	X	
→ naranjas, limones, otros	X		X			X						X		X	X	
frutales carnosos						X						X				
→ frambuesa																
→ grosella																
→ piña						X						X				
→ plátano						X										
frutales de hueso	X															
→ albaricoque	X															
→ cereza																
→ ciruelas																
→ melocotón	X															
→ nectarina	X															
frutales de pepita	X		X			X								X	X	
→ manzana																
→ pera	X		X											X		
→ avellanas																
→ olivas	X		X			X									X	
→ viñas						X								X	X	

* Sustancia prohibida (status en marzo de 2013)

Para finalizar, la Tabla 1-10 resume el estatus legal actual de cada plaguicida, basado en las leyes citadas anteriormente, en el apartado 1.5 (Tabla 1-3) de este capítulo.

Tabla 1 - 10. Estatus legal de los plaguicidas objeto de estudio.

Plaguicida	Reg.(CE) No. 1107/2009				Directiva 2013/39/CE
	Status	Fecha de aprobación	Fecha de expiración de la aprobación	Legislación relacionada	Substancia prioritaria (CMA)**
2,4-D*	√	01/10/2002	31/12/2015	Dir.2001/103/CE & Reg.(CE) No 540/2011 & Dir.2010/77/CE	
Alacloro*	x			Dec.2006/966/CE	√ (700 ng/L)
Atrazina*	x			Dec.2004/248/CE	√ (2000 ng/L)
Bentazona*	√	01/08/2001	31/12/2015	Dir.2000/68/CE & Reg.(CE) No 540/2011 & Dir.2010/77/CE	***
Cianazina*	x			Reg.(CE) No 2002/2076	
Clorfenvinfos*	x			Reg.(CE) No. 2002/2076 & Reg. (CE) No. 835/2004	√ (300 ng/L)
Clorpirifos*	√	01/07/2006	30/06/2016	Dir.2005/72/CE & Reg.(CE) No 540/2011	√ (100 ng/L)
Clortolurón*	√	01/03/2006	28/02/2016	Dir.2005/53/CE & Reg.(CE) No 540/2011	
Deisopropilatrazina	producto de transformación				
Desetilatrazina	producto de transformación				
Diazinon*	x			Dec.2007/393/CE	
Dimetoato*	√	01/10/2007	30/09/2017	Dir.2007/25/CE & Reg.(CE) No 540/2011	
Diurón*	√	01/10/2008	30/09/2018	Dir.2008/91/CE & Reg.(CE) No 540/2011	√ (1800 ng/L)
Fenitrotión*	x			Dec.2007/379/CE	
Fenitrotión oxon	producto de transformación				
Isoproturón*	√	01/01/2003	31/12/2015	Dir.2002/18/CE & Reg.(CE) No 540/2011 & Dir.2010/77/CE	√ (1000 ng/L)
Linurón*	√	01/01/2004	31/07/2016	Dir.2003/31/CE & Reg.(CE) No 540/2011 & Reg.(CE) No 823/2012	
Malaoxón	producto de transformación				
Malatión*	√	01/05/2010	30/04/2020	Dir.2010/17/CE & Reg.(CE) No 540/2011 & Dec.2007/389/CE & Reg.(CE) No. 33/2008	
MCPA*	√	01/05/2006	30/04/2016	Dir.2005/57/CE & Reg.(CE) No 540/2011	
Mecoprop*	√	01/06/2004	31/01/2017	Dir.2003/70/CE & Reg.(CE) No 540/2011 & Reg.(CE) No 823/2012	***
Metolacloro*	x			Reg.(CE) No 2002/2076 & Reg.(CE) No. 33/2008	
Molinato*	√	01/08/2004	31/07/2014	Dir.2003/81/CE & Reg.(CE) No 540/2011	
Propanil*	x			Reg.(CE) No 1078/2011 & Dec.2008/769/CE & Reg.(CE) No. 33/2008	
Simazina*	x			Dec.2004/247/CE & Reg.(CE) No. 835/2004	√ (4000 ng/L)
Hidroxi simazina	producto de transformación				
Terbutilazina	√	01/01/2012	31/12/2021	Reg. (CE) No 820/2011 & Dec.2008/934/CE	

* Plaguicidas catalogados como muy peligrosos por Pesticide Action Network (PAN) International (Neumeister y Weber 2009).

** CMA: concentración máxima admisible.

*** Substancias sujetas a revisión por su posible identificación como substancias prioritarias o sustancias peligrosas prioritarias.



2.1. Introducción y objetivos

La técnica preferida en esta Tesis Doctoral para la extracción y concentración de plaguicidas en muestras de agua es la SPE, debido a su gran selectividad, precisión y robustez. Además, la automatización de esta técnica permite mejorar notablemente el rendimiento del análisis e incrementar la calidad de éste al reducir considerablemente las etapas de manipulación de la muestra. Por su parte, para matrices sólidas, la PLE ha demostrado ser una técnica precisa, robusta y rápida (< 30 min por muestra), lo que la ha convertido en una de las más aplicadas en los últimos años (Tabla 1-5, Capítulo 1).

Por último, para el análisis de compuestos de polaridad media-alta y media-baja volatilidad la técnica de LC-ESI-MS/MS aparece como la más adecuada para obtener la máxima selectividad y sensibilidad en el análisis y, por tanto, resultados cuantitativos fiables.

En este contexto, los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron:

- Desarrollar una metodología analítica basada en SPE-LC-ESI-MS/MS para el determinación de 22 plaguicidas (incluyendo 2 productos de transformación) pertenecientes a 7 familias químicas diferentes, en distintos tipos de aguas (residuales, continentales, superficiales y subterráneas).
- Desarrollar una metodología analítica basada en PLE, seguida de purificación de los extractos mediante SPE, y análisis por LC-ESI-MS/MS para la determinación de los 26 plaguicidas seleccionados en sedimentos.
- Desarrollar dos metodologías analíticas, una para aguas y otra para sedimentos, para la determinación simultánea de 4 plaguicidas, un estrógeno y varios fármacos seleccionados en muestras líquidas y sólidas, procedentes de un sistema de recarga artificial de acuíferos.

La metodología desarrollada según estos objetivos para el análisis de 22 plaguicidas en aguas se describe a continuación; seguidamente, en la publicación científica #1, la desarrollada para el análisis de 26 plaguicidas en sedimentos, y, por último, en el apartado 2.2.3, las desarrolladas para el cocktail de contaminantes orgánicos en muestras de agua y sedimento del sistema de recarga artificial.

2.2. Resultados

2.2.1. Análisis de 22 plaguicidas en aguas

2.2.1.a. Antecedentes

En 2004 Borba da Cunha y colaboradores publicaron (Borba da Cunha et al. 2004) un método LC-ESI-MS/MS para la detección de 20 plaguicidas polares. Un año más tarde Kampioti y colaboradores (Kampioti et al. 2005) completaron el método de análisis de los mismos 20 plaguicidas optimizando un método de extracción y concentración de las muestras basado en SPE acoplada online al análisis por LC-ESI-MS/MS. En la optimización se probaron cinco cartuchos de extracción, dos volúmenes de muestra (20 y 40 mL) y tres pH diferentes de muestra (5, 7, 9), y el método optimizado se validó para el análisis de aguas continentales superficiales y tratadas. Sin embargo, el volumen de 20 mL de muestra utilizado por Kampioti y colaboradores mostró un efecto matriz importante en el estudio de aguas más contaminadas llevado a cabo más tarde por Kuster y colaboradores (Kuster et al. 2008). Este efecto matriz llevó a Kuster a utilizar volúmenes de muestra aun más bajos (20, 10 y 5 mL), siempre buscando un compromiso aceptable entre efecto matriz y sensibilidad. Finalmente, el volumen escogido fue 10 mL.

Más tarde, el mismo método fue adaptado para el análisis de 22 plaguicidas en aguas subterráneas usando un QqLIT en lugar de un QqQ. La mayor sensibilidad proporcionada por el equipo 4000 QqLIT permitió a Postigo y colaboradores (Postigo et al. 2010) bajar aún más el volumen de muestra, lo que resultó en un método de análisis de plaguicidas en aguas subterráneas con tan sólo 5 mL de muestra.

Como se puede observar tras el recuento de estos estudios, el efecto causado por la matriz es uno de los principales problemas a la hora de analizar aguas continentales superficiales. Como ya se ha comentado en el Capítulo 1 (apartado 1.6.4), hay varias formas posibles de corregir tales efectos, sin embargo, una de las mejores consiste en el uso de patrones internos marcados isotópicamente (SILIS) al inicio del proceso de análisis (dilución isotópica). Esta metodología permite no sólo corregir el efecto que compuestos indeseados presentes en las muestras pueden causar, sino también otras posibles fuentes de errores durante todo el proceso de extracción y preparación de la muestra.

Por estas razones, el método desarrollado y presentado a continuación incluye la técnica de dilución isotópica en el análisis de plaguicidas en muestras de agua mediante online-SPE-LC-ESI-MS/MS y la validación del mismo en aguas continentales superficiales, subterráneas y residuales. Esta técnica permite la cuantificación de los analitos objeto de estudio con calibración interna, a diferencia de las técnicas citadas anteriormente, llevadas a cabo por calibración externa, siendo por tanto un método de mayor precisión y exactitud.

La validación de este nuevo método en cada una de las matrices de agua estudiadas se encuentra descrita al final del presente capítulo y en las correspondientes publicaciones científicas incluidas en capítulos posteriores:

- Publicación científica #2 (Capítulo 3): validación en aguas residuales
- Publicación científica #5 (Capítulo 4): validación en agua superficial
- Publicación científica #6 (Capítulo 4): validación en agua subterránea.

Patrones analíticos, soluciones y preparación de la muestra

Los patrones analíticos de los 22 plaguicidas y los 20 compuestos deuterados usados como SILIS eran de una alta pureza (96-99,9%) y fueron adquiridos a Fluka o Dr. Ehrenstorfer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

Todas las soluciones de patrones de plaguicidas y compuestos deuterados se prepararon en metanol y se guardaron protegidas de la luz a -20°C. La curva de calibración se preparó en agua ultra pura (grado HPLC) el mismo día del análisis de las muestras. Para ello, se prepararon 9 soluciones de plaguicidas en agua a distintas concentraciones, entre 0,1 ng/L y 1000 ng/L, mediante la dilución de 100 µL de soluciones madre de los mismos en metanol (soluciones Mezcla) con concentraciones entre 0,1 ng/mL y 1000 ng/mL, en 100 mL de agua de grado HPLC. En el caso de los compuestos deuterados, se preparó una solución madre de 200 ng/mL de todos los SILIS para su futura dilución en los diferentes puntos de la curva y en las muestras (100 µL de Mezcla en 100 mL de agua o muestra).

La preparación de las muestras de agua continental superficial, subterránea y residual consistió en su filtración a través de filtros de fibra de vidrio de 0,7 µm de poro seguidos de filtros de nylon de 0,45 µm de poro con la finalidad de retirar la mayor parte del material sólido particulado.

SPE online

El proceso de SPE se llevó a cabo con un sistema Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, Holanda) que permite la extracción de las muestras y su posterior análisis de forma completamente automatizada. 16 de los 22 plaguicidas analizados con esta técnica se detectaron utilizando la fuente de ESI en el modo de ionización positivo y para su extracción se utilizaron cartuchos PLRP-s (Spark Holland). Los 6 plaguicidas restantes se ionizaron en modo negativo y se preconcentraron con cartuchos Hysphere Resin GP (Spark Holland).

El sistema Prospekt-2 consiste en dos módulos. El módulo ACE (Figura 2-1) gestiona los cartuchos de extracción y contiene dos bandejas de 96 cartuchos cada una. Además consta de dos abrazaderas encargadas de la extracción y de la elución de los analitos, respectivamente. El segundo módulo (HPD) es un dispensador de alta presión para la gestión de los disolventes y de las muestras por medio de una jeringa de alta presión de 2 mL. Este módulo tiene 24 canales para la dispensación de disolventes y muestras.

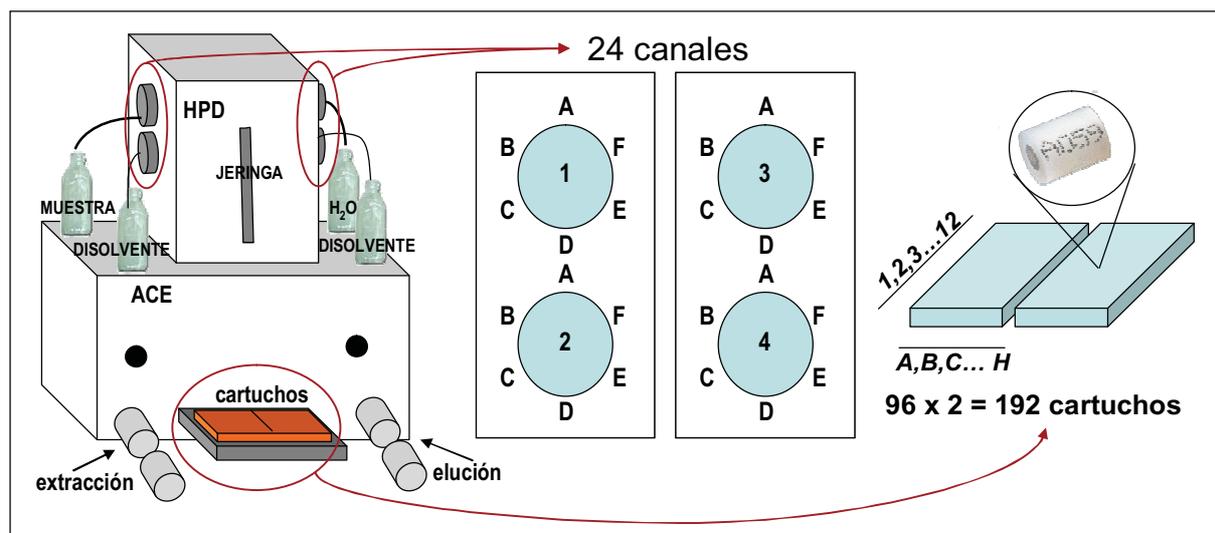


Figura 2 - 1. Sistema de extracción en fase sólida automatizada: Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, Holanda).

Al igual que en una SPE convencional, los pasos del sistema automatizado consisten en el condicionamiento de los cartuchos con un disolvente orgánico (*Solvation*) y luego con agua (*Equilibration*), el paso de la muestra por el cartucho (*Sample application*), el lavado del mismo para eliminar compuestos interferentes y sales inorgánicas (*Wash*), y finalmente la elución de los analitos con ayuda de la fase móvil (*Elution*). Los detalles del método se pueden observar en la Figura 2-2.

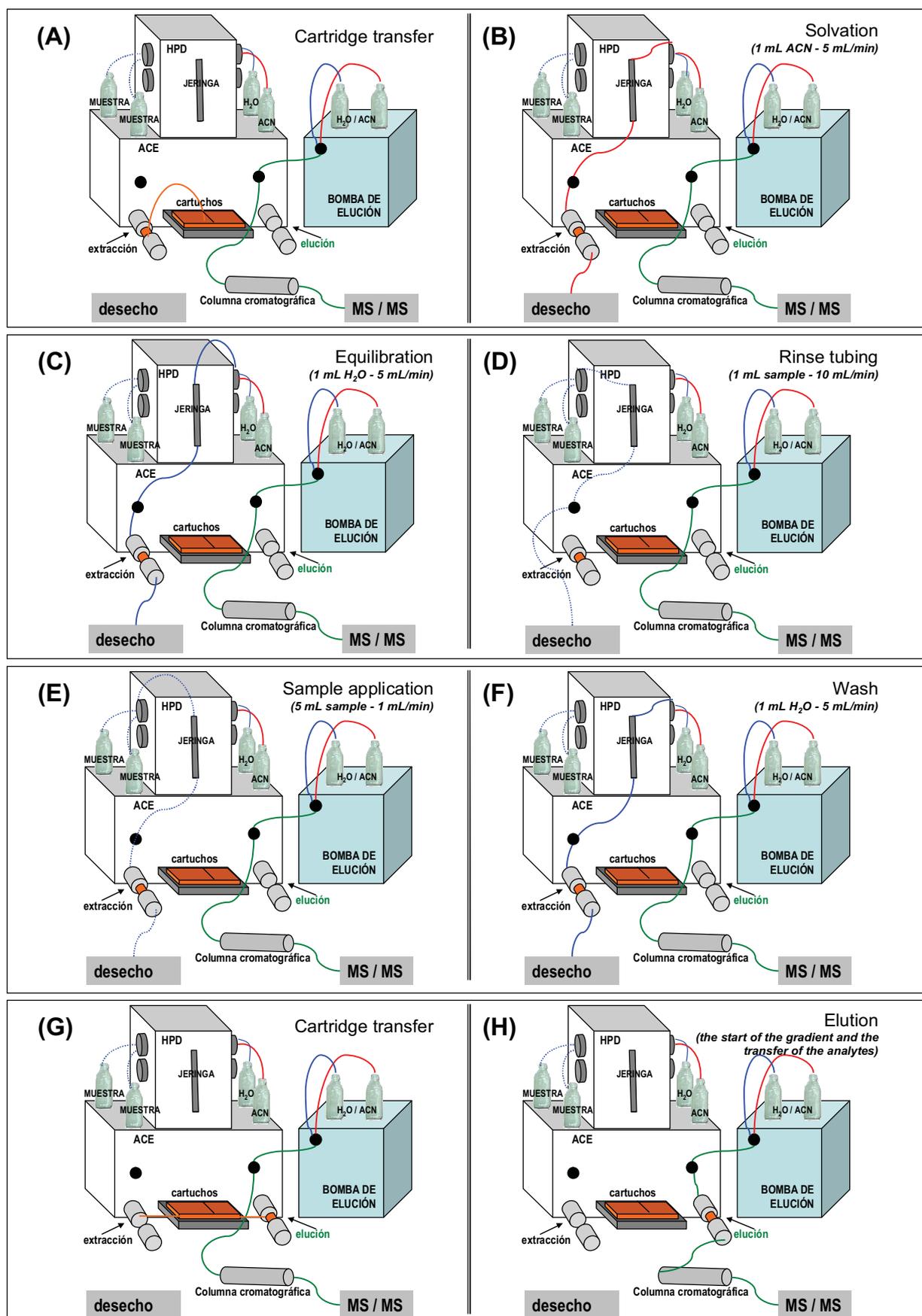


Figura 2 - 2. Etapas del método de extracción de plaguicidas por SPE online usando un Prospekt-2.

Análisis por LC-ESI-MS/MS**Cromatografía**

Los analitos retenidos en el cartucho son transportados a la columna analítica con ayuda de una bomba binaria de LC modelo 1525 de Waters (Milford, MA, EEUU). La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna Purospher STAR RP-18e (125x2 mm, 5 μ m) de Merck (Darmstadt, Alemania) utilizando como fase móvil un gradiente de ACN/H₂O en condiciones neutras a un flujo de 0,2 mL/min durante 40 min. La programación de la fase móvil se muestra en la Figura 2-3.

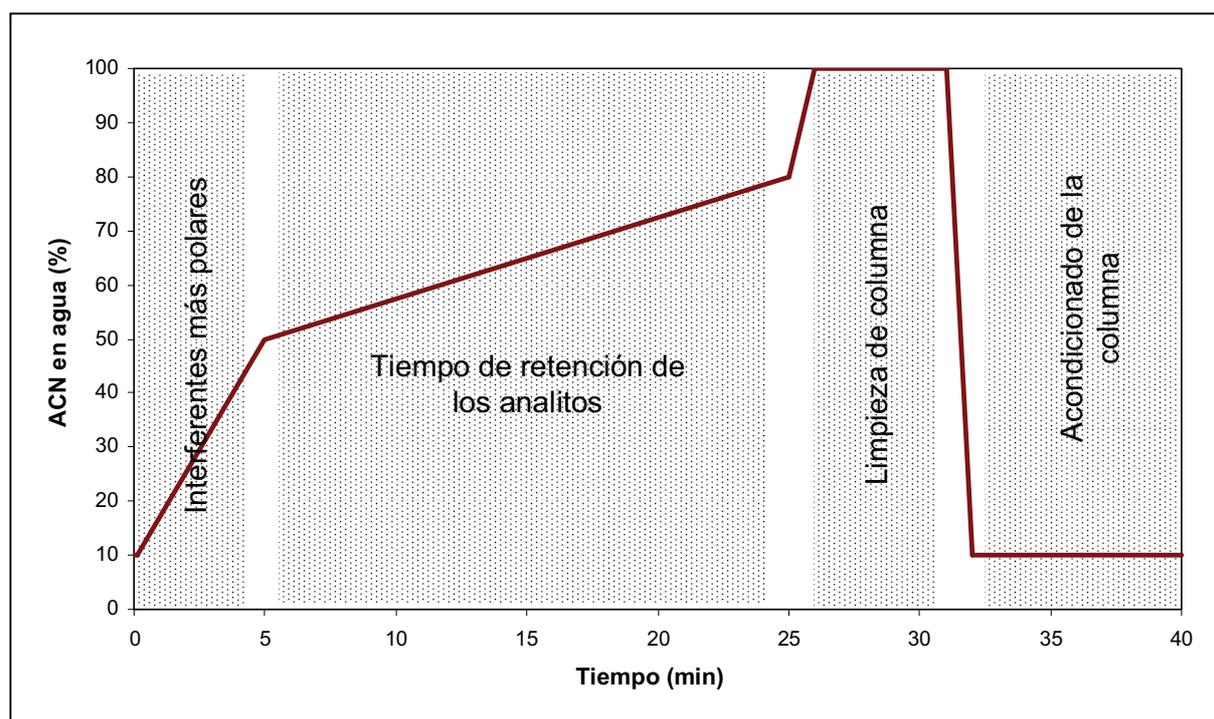


Figura 2 - 3. Gradiente de la fase móvil aplicado en el análisis cromatográfico.

Espectrometría

La ionización, separación y detección de los analitos se llevó a cabo con un espectrómetro de masas TQD de Waters (Mildford, USA). Se utilizó una fuente de electrospray (ESI) para la ionización positiva de 16 plaguicidas y negativa de los 6 plaguicidas restantes.

Además de los parámetros específicos relacionados con los diferentes analitos objeto de estudio (iones padre e hijo y energías de cono y colisión), se optimizaron otros parámetros generales del espectrómetro de masas: temperatura de la fuente (100, 120 y 150 °C), temperatura de desolvatación (350, 400 y 450 °C) y flujo de gas de desolvatación (600, 650, 680 L/h). Las condiciones experimentales generales finales del sistema MS/MS se muestran en la Tabla 2-1.

Tabla 2 - 1. Condiciones experimentales finales del MS/MS.

Parámetro	
Modo de ionización	ESI
Voltaje del capilar	3,5 kV (+/-)
Temperatura de la fuente	150 °C
Temperatura de desolvatación	450 °C
Voltaje del extractor	3 V
RF lens	0,1 V
Gas	N ₂

Para escoger la mejor energía de ionización del ion precursor de cada analito, se trabajó en modo *MS Scan* (Figura 2-4a), donde el primer cuadrupolo (MS1) se configuró para escanear iones desde 50 hasta 370 m/e a diferentes energías (cono de 5 a 45 V). Finalizada la selección del ion precursor y la energía de cono óptima para su formación, a cada uno de estos iones se les aplicaron diferentes energías de colisión (de 5 a 40 eV) con el fin de escanear su fragmentación y seleccionar los iones producto (*en inglés product ions*) más abundantes y selectivos. Esta etapa se realizó en modo *Daughter Scan* (escaneo de hijos) como muestra la Figura 2-4b. Habiendo escogido los fragmentos más abundantes con sus respectivas energías de colisión, se procedió a trabajar en modo de registro de reacciones seleccionadas (SRM, del inglés *Selected Reaction Monitoring*) donde cada fragmento proveniente de un ion precursor específico se forma a una energía de colisión predeterminada (Figura 2-4c). A cada par de ion precursor / fragmento se le atribuye el nombre de transición.

La detección final de los analitos se realizó en el modo SRM registrando dos transiciones por compuesto. La transición más abundante es la que se usó para la cuantificación (SRM1) y la segunda más abundante para la confirmación (SRM2). En el caso de los compuestos deuterados (SILIS) sólo se registró una transición por compuesto.

La Tabla 2-2 resume las condiciones MS/MS (transiciones y energías de cono y colisión) seleccionadas para el análisis de cada analito y la abundancia relativa de las señales obtenidas, que se utiliza como criterio de confirmación de la identidad del compuesto.

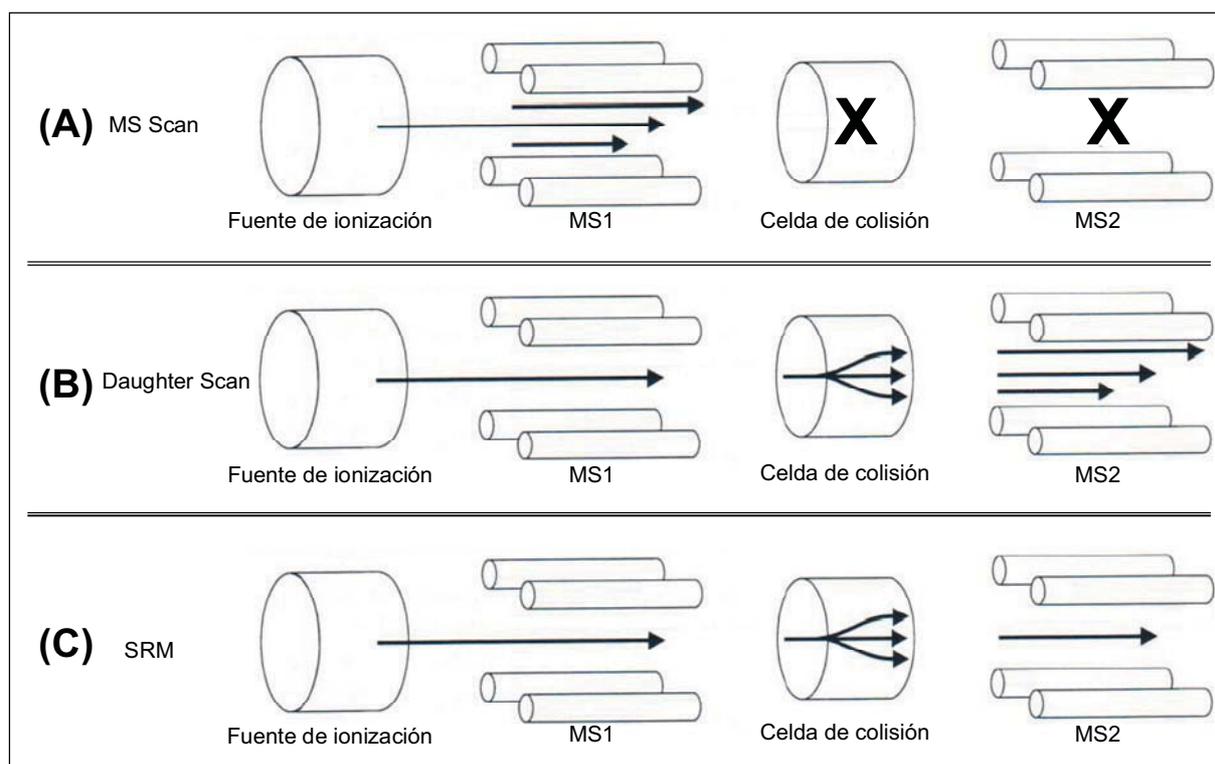


Figura 2 - 4. Modos de espectrometría operados durante la optimización del método MS/MS.

Calibración

En la construcción de la curva de calibrado se emplearon 9 niveles de concentración (0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 ng/L). La regresión lineal utilizada es la de los mínimos cuadrados y la calidad de la regresión se evaluó por medio del coeficiente de determinación (r^2). El intervalo de trabajo lineal para cada compuesto fue del Ldet (de cada analito) a 1000 ng/L. Se cuantificó todo por calibración interna, es decir, se usaron las intensidades relativas de las áreas de los analitos en relación a la de los respectivos SILIS (área analito / área SILIS) y de forma análoga, las intensidades relativas de las concentraciones de los analitos en relación a la de los respectivos SILIS ([analito] / [SILIS]).

Tabla 2 - 2. Condiciones MS/MS seleccionadas para el análisis en modo SRM de los 22 plaguicidas objeto de estudio.

Plaguicida	TR ⁽¹⁾ (min)	MM ⁽²⁾ (g/mol)	SRM1 (m/e)	SRM2 (m/e)	Cono SRM1/SRM2 (V)	EC ⁽³⁾ SRM1/SRM2 (eV)	IRI ⁽⁴⁾
Ionización en modo negativo							
Bentazona	6,72	240,28	239>132	239>197	35/35	25/20	2,2
Bentazona d6		246,28	245>132		35	25	
MCPA	7,21	200,62	199>141	199>155	20/15	15/15	2,4
MCPA d3		203,64	204>146		25	20	
2,4-D	7,23	221,04	219>161	219>125	15/15	10/30	12
2,4-D d3		224,06	224>127		20	25	
Mecoprop	7,34	214,65	213>141	213>71	15/15	15/15	2,6
Mecoprop d3		217,67	218>146		25	15	
Propanil	15,36	218,08	216>160	218>162	30/30	15/15	1,5
Fenitrotión d6		283,27	265>152		30	15	
Fenitrotión	19,96	277,24	262>152	262>122	25/25	30/20	15,9
Fenitrotión d6		283,27	265>152		30	15	
Ionización en modo positivo							
DIA	7,98	173,61	174>132	174>104	30/30	20/25	1,3
DIA d5		178,64	179>137		35	20	
DEA	8,88	187,63	188>146	188>79	30/30	15/25	3,2
DEA d6		193,63	194>147		25	20	
Dimetoato	9,08	229,26	230>125	230>199	25/25	15/15	1,5
Dimetoato d6		235,29	236>131		30	15	
Cianazina	10,75	240,69	241<214	241<174	30/30	15/20	9,3
Cianazina d5		245,73	246<219		30	20	
Simazina	10,78	201,66	202<124	202<71	30/30	20/25	1,1
Simazina d10		211,72	212<137		35	15	
Clortolurón	11,92	212,68	213<72	213<140	25/25	15/30	29,8
Clortolurón d6		218,68	219<78		35	15	

Tabla 2 - 2. (continuación).

Plaguicida	TR ⁽¹⁾ (min)	MM ⁽²⁾ (g/mol)	SRM1 (m/e)	SRM2 (m/e)	Cono SRM1/SRM2 (V)	EC ⁽³⁾ SRM1/SRM2 (eV)	IRI ⁽⁴⁾
Isoproturón	12,28	206,29	207<72	207<165	35/35	20/15	7,1
Isoproturón d6		212,32	213<171		30	20	
Atrazina	12,55	215,68	216<174	216<132	35/35	15/20	5,7
Atrazina d5		220,71	221<179		35	15	
Diurón	12,78	233,1	233<72	235<72	25/25	15/15	1,6
Diurón d6		239,13	239<78		25	25	
Terbutilazina	15,34	229,71	230<174	230<96	25/25	15/25	4,5
Terbutilazina d5		234,74	235<179		30	20	
Linurón	15,94	249,1	249<160	249<182	25/25	15/15	1,2
Linurón d6		255,1	255<184		30	30	
Molinato	17,47	187,31	188<126	188<83	30/30	15/20	2,4
Linurón d6		255,1	255<184		30	30	
Metolacoloro	18,21	283,8	284,8<176	284,8<73	25/25	25/25	6,4
Metolacoloro d6		289,83	290<258		25	15	
Malatión	18,31	330,36	353<195	353<227	30/30	15/15	1,8
Malatión d6		336,39	360<228		35	15	
Alacloro	18,61	269,77	270<238	270<162	30/30	15/15	2,2
Alacloro d13		282,85	283<251		15	10	
Diazinón	22,16	304,35	305<153	305<97	35/35	20/30	1,8
Diazinón d10		314,4	315 <170		35	20	

(1) Tiempo de retención; (2) Masa molecular; (3) Energía de colisión; (4) Intensidad relativa de iones (SRM1/SRM2).

2.2.2. Análisis de 26 plaguicidas en sedimento

Publicación científica #1:

“Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry”

Por:

Marianne Köck-Schulmeyer, Mar Olmos, Maria Jose López de Alda y Damià Barceló

Publicada en *“Journal of Chromatography A”*



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry

Marianne Köck-Schulmeyer^a, Mar Olmos^a, Miren López de Alda^{a,*}, Damià Barceló^{a,b}^a Dept. Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, c/ Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain^b Catalan Institute for Water Research (ICRA), Emili Grahit, 101, Edifici H2O, Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, 17003 Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 March 2013
Received in revised form 1 July 2013
Accepted 9 July 2013
Available online 13 July 2013

Keywords:

Pesticides
Sediment
Analysis
Isotope dilution
LC–MS/MS

ABSTRACT

Because of the complexity of the sediment matrix, selective methods are necessary to identify and quantify different kinds of pesticides at a time. In this context, a multiresidue method based on isotope dilution and final analysis by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS) was developed for the determination of 26 pesticides and transformation products in sediment. The method developed comprises pressurized liquid extraction (PLE) and further purification of the extract by solid phase extraction (SPE) prior to analysis. In the process of method optimization various SPE cartridges as well as PLE and SPE elution solvents were evaluated. Due to the relatively high volatility of some compounds (e.g., propanil), special attention was paid to the evaporation step. Experiments comparing different pressures and times during solvent evaporation were performed with the aim to improve the recovery of these compounds. Matrix effects were also studied even though they were corrected through the use of 23 deuterated compounds as surrogate standards for quantification. The analytical method developed showed good validation parameters in terms of linearity, sensitivity (limits of detection in the pg g^{-1} or low ng g^{-1} range and limits of determination below 80 ng g^{-1}), accuracy (relative recoveries between 92 and 118%, except for malaoxon (66.5%)), and repeatability (relative standard deviations between 1.5 and 17%, for all compounds except the acidic herbicides). Its main advantage is the simultaneous analysis of pesticides with a large variety of physical–chemical properties, as well as its improved accuracy due to the use of the isotope dilution method. Application of the method to the analysis of 5 real samples from 4 different Spanish rivers revealed the presence of 5 of the 26 target compounds, being chlorpyrifos, diuron and diazinon the most ubiquitous, as expected, due to their high bioaccumulation and low mobility features.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Monitoring of the chemical status of rivers in terms of pesticides pollution has been based in most instances on their analysis in the aqueous compartment. However, sediments are also important and should be included in environmental studies in order to have a more comprehensive picture about the quality status of the rivers since they are the result of the integration of all processes (biological, physical and chemical) that occur in an aquatic ecosystem [1]. In addition, river sediments are unique at providing historical contamination information [2] and identifying pollution episodes [3].

In 2000 the Water Framework Directive (WFD) approved by the European Commission (EC) with the objective to establish a common framework for Community action in the field of water policy [4] addressed for the first time the issue of sediments though no specific environmental quality standards (EQS) were proposed. Four years later, the Working Group on Analysis and Monitoring of Priority Substances (AMPS) considered the technical implications of sediment monitoring and gave technical expert advice to the EC on analysis and monitoring aspects, including the suggestion to monitor some WFD priority substances like alachlor, isoproturon, chlorpyrifos, and chlorfenvinphos in sediment samples [5]. Later on, in 2008 the EC approved the Directive 2008/105/EC that established that Member States should, inter alia, monitor sediment (and biota), as appropriate, at an adequate frequency to provide sufficient data for a reliable long-term trend analysis of those priority substances that tend to accumulate in sediment (and/or biota), and the results of this monitoring should be made available in order

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 6100; fax: +34 93 204 5904.
E-mail address: mldam@cid.csic.es (M. López de Alda).

Table 1
Review of the last 10 years studies analyzing pesticides in sediments and/or soils.

Reference	Year	Analytes	In common ^a	Matrix	Amount (g) ^b	Extraction	Clean-up	Detection	Limits (ng g ⁻¹)
Hennicken et al.	2002	1 pesticide + 4 metab	None	Soil	30	PLE (ASE)	Filtration (0.45 mm nylon)	LC-MS/MS	LOD: 1.25–12.5
Dagnac et al.	2005	12 pesticides	9	Soil	15 (<2 mm)	PLE	None	LC-MS and GC-MS/MS	LOQ: 0.5–5
Ibáñez et al.	2005	3 pesticides	None	Soil	5	Shake and cent ^f	Filtration (0.45 mm nylon)	LC(ESI)-MS/MS	LOD: 5
Fuentes et al.	2007	6 organophosphates	2	Soil	20 (<2 mm)	MAEP	None	GC-ECD and GC-MS/MS	LOD: 4–12
Shen et al.	2007	5 pesticides	1	Soil	10	MMSPD	None	GC-NPD	LOD: 0.2–2.0
Bermúdez-Couso et al.	2007	6 fungicides	None	Sed	10 mL	SLE+US	None	GC-MS	LOD: 1–3; LOQ: 4–6
Ghanem et al.	2008	5 pesticides	4	Sludge	25	Shake	SPE (Florisil)	LC(ESI)-MS/MS	LOD: 0.3–1.5
Hladiz et al.	2008	1 pesticide + 3 metab	None	Soil/sed	10	USE + filtration	SPE (Oasis HLB 200 g)	GC-MS	LOD: 1–5
Villaverde et al.	2008	31 pesticides	9	Sed	1 (<100 mm)	PLE (ASE) ^g	SPE (Oasis HLB 500 mg)	GC-MS	LOD: <0.04 mg L ⁻¹
Xue et al.	2008	22 pesticides	3	Sed	20 (wet)	USE	None	GC-ECD and MS	LOD: 0.0005–0.0015
Lesueur et al.	2008	23 pesticides	9	Soil	5	PLE (ASE) ^h	filtration (0.45 mm)	GC-MS and LC-MS/MS	LOQ: 0.08–292
Baugros et al.	2009	12 pesticides	1	Sludge	1.5	PLE (ASE)	SPE (silica)	LC(ESI)-MS/MS	LOD: 5.2–634
García-Valkarcel et al.	2009	10 pesticides	2	Sludge	2	USE	DSPE (Bondesil-PSA)	LC(ESI)-MS/MS	LOD: 0.3–4.2
Hutta et al.	2009	11 pesticides	4	Soil	2.5	USE	ultrafiltration	LVI-HPLC-UV	LOD: 5–6
Hilibrandt et al.	2009	22 organochlorines, 16 PAHs	None	Soil	1 (<120 mm)	PLE (ASE)	None	GC-MS	LOD: 0.19–7.38
Rosalés-Contrado et al.	2009	1 insecticide	None	Soil	10 (<2 mm)	Shake+USE	None	LC(ESI)-MS/MS	LOD: 15–18; LOQ: 50–60
Drozdzynski et al.	2009	4 insecticides	None	Soil	5	QuEChERS	dSPE (cartridges PSA & C18)	UPLC-MS/MS	LOD: 1.8–2.7; LOQ: 6–9
Navarro-Ortega et al.	2010	69 pollutants (polar pest, PAHs, PPs)	14	Sed	1 (<120 mm)	PLE (ASE)	None	GC-MS	LOD: 0.03–56.33
Ricart et al.	2010	22 pesticides	22	Sed	5 (<0.125 mm)	PLE (ASE)	SPE (Carbograph)	LC-MS/MS	LOD: 0.02–6.70
Gómez et al.	2011	19 organochlorine	None	Sed	2 (<63 mm)	MAE	SPE (EPA 3620B)	GC-ECD	LOD: 0.02–0.21; LOQ: 0.11–0.38
Abraham et al.	2011	44 pesticides (OC, PAHs, PCBs, DDT)	6	Sed	NR ^e	SLE	GPC (EPA 3640)	GC-MS	LOQ: 5
Lazarigues et al.	2011	13 pesticides	1	Soil/sed	4	SLE	None	LC-MS/MS	LOQ: 0.1–57.7
Wasswa et al.	2011	16 organochlorines	None	Sed	200	Solid dispersion method	GPC	GC-ECD and GC-MS	LOD: 0.0014–0.0082
Brondi et al.	2011	3 pesticides	1	Sed	10	QuEChERS	dSPE	GC-MS (SIM)	LOD: 3–20; LOQ: 10–50
Sánchez-Avila et al.	2011	53 org. micropollutants	None	Sed	1 (<120 mm)	USE	SPE	GC(EI)-MS/MS	LOD: 1–150
Kivalova et al.	2012	9 pesticides	None	Sed	4 (<1 mm)	QuEChERS	None	LC-MS/MS	LOD: 0.1–2; LOQ: 1–6
Van Ael et al.	2012	58 org. pollutants	None	Sed	3	soxhlet	SPE (8 g silica)	GC-MS	LOQ: 1–4
Liu et al.	2012	21 organochlorines	None	Sed	10	USE	SPE (silica)	GC-MS	LOD: 0.2–100 pg g ⁻¹
Nomen et al.	2012	10 OC/organophosphates	None	Sed/soil	10	Shake-flask	dSPE (20 g gel sephadex)	GC-ECD and PPD	LOQ: 18–46.6
Hellar-Kihampa et al.	2013	18 pesticides	None	Sed	2	Soxhlet	Silica	GC-ECD	LOQ: 0.1
Quinere et al.	2013	3 pesticides	None	Sed/soil	20	QuEChERS	C18	LC(APCI)-MS/MS	LOD: 1–16
Toan et al.	2013	13 pesticides	1	Sed	20 (<2 mm)	SLE (Shake) and LLE	SPE (C18)	GC-MS	NR ^e
Yang et al.	2013	10 organochlorines	None	Sed	10	Soxhlet	Alumina/silica	GC-ECD	NR ^e
Zhao et al.	2013	21 organochlorines	None	Soil	10	PLE (ASE)	Alumina/silica	GC-ECD	LOD: 0.01–1.07

dSPE, dispersive solid phase extraction; EPA, Environmental Protection Agency; GC, gas chromatography; GPC, gel permeation chromatography; LC, liquid chromatography; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; LVI, large volume injection; MAE, microwave assisted extraction; MAEP, microwave assisted extraction and partitioning; MMSPD, modified matrix solid-phase dispersion; OC, organochlorine compound; PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs, polychlorinated biphenyls; PLE, pressurized liquid extraction; PPs, polar pesticides; PSA, primary secondary amine; QuEChERS, Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe; sed, sediment; SLE, solid-liquid extraction; SPE, solid phase extraction; USE, ultrasonic solvent extraction.

^a Number of pesticides in common with this work.

^b Sieving pore size between parentheses.

^c Soxhlet and USE were also tested.

^d USE, Shake-flask and QuEChERS were also tested.

^e NR, not reported.

^f Centrifugation.

to inform future Commission proposals. Furthermore, according to this directive, Member States should be able to establish EQS for sediment and/or biota at national level and apply those EQS instead of the EQS set out for water. More recently, the Commission has issued a proposal for a Directive amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, which would establish for the first time EQS in biota [6,7]. However, this proposal that is still pending approval again does not include EQS in sediments.

This historical lack of EQS for organic pollutants, including pesticides, in sediments explains the very low number of publications that deal with this issue.

Most of the analytical methods developed so far for this purpose are based on gas chromatography (GC) analysis (see Table 1) and focus on low polarity compounds with high soil organic carbon–water partition coefficient constants (Koc) and hence high affinity for sediments. However, compounds with low Koc values have also been found in sediments, e.g., isoproturon [8] and molinate [9], probably because Koc values below $500 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ indicate little or no adsorption of the pesticide to the soil but high possibility of runoff which in turn justifies their presence in river water and/or sediment. In this context, the main objective of the present work was to develop a new multi-residue method for the determination of a large variety of pesticides with different polarities and Koc values in sediments. Compared to previously published methods, which address only a few compounds or compounds classes, the method developed, based on PLE, SPE clean-up, and analysis by LC–MS/MS, allows the analysis of a large number of pesticides from different chemical classes, namely, triazines, phenylureas, organophosphates, anilines, thiocarbamates, acidic pesticides, and metabolites/transformation products of some of them, at the low ng or pg per gram level, and in a highly accurate and reliable manner due to the use of isotopically labelled compounds for quantification, in compliance with the technical specifications set by the European legislation for chemical analysis and monitoring of water status (Directive 2009/90/EC [10]).

2. Experimental

2.1. Standards and solvents

High purity (96–99.9%) standards of the selected 26 pesticides and 23 isotopically labelled compounds used as surrogate standards (see Table 2) were purchased from Fluka or Dr. Ehrenstorfer (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany). Stock standard solutions of the individual analytes were prepared in methanol and were stored in amber glass bottles in the dark at -20°C . Working solutions of the individual standards and of mixtures of all of them were prepared at various concentrations by appropriate dilution of the stock solutions in methanol. Pesticide-grade solvents methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), hexane (HEX), acetone (ACE) and LC-grade water were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Activated alumina was purchased from Merck and Ottawa Sand from Applied Separations (Allentown, PA).

2.2. Sample collection and pre-treatment

Sediment samples (for both method validation and its further application to real samples) were collected from 5 different sites from four river basins distributed throughout Spain: Ebro, Guadalquivir, Júcar and Llobregat.

Samples were collected with a Van Veen drag and placed in an aluminium tray or in a glass bottle (depending on the consistency of the sediment). After collection, the samples were transported refrigerated at 4°C to the laboratory where they were subsequently

frozen at -20°C , lyophilized, ground with a mortar, sieved through $125 \mu\text{m}$ mesh to obtain a homogenous sediment material, and stored at -20°C until analysis.

2.3. Extraction

Prior to extraction the freeze-dried river sediment samples (5 g) were spiked with the surrogate standards at a concentration of $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ($125 \mu\text{L}$ of a standard mixture containing $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of each deuterated compound) and were left overnight for 12 h. Next, the samples were mixed with 6 g of alumina (to reduce the extraction of matrix interferences and thus make the process more selective) and were placed into 22 mL cells, filling the end portions with sand such that the sample remains in the central part of the cell. Extraction was then performed with a pressurized solvent extraction PSE *One* system from Applied Separations (Allentown, PA, USA) using a mixture of acetone:dichloromethane (ACE:DCM, 1:1) acidified with formic acid (FA, 1%, v/v) as extracting solvent under the following conditions: temperature, 100°C ; pressure, 100 bar; 2 cycles; and static time, 5 min. The so-obtained extracts were evaporated under nitrogen to almost dryness and reconstituted to 20 mL with 1 mL of MeOH followed by 19 mL of reagent water for subsequent SPE clean-up.

2.4. SPE clean-up

Purification of the extracts was carried out by SPE with Oasis HLB cartridges (500 mg, 6 mL) from Waters (Milford, MA, USA) conveniently conditioned with 5 mL of methanol:dichloromethane (MeOH:DCM, 1:1) and 5 mL of reagent water. After sample loading, the cartridges were washed with 5 mL of water, dried, and further eluted with 4 mL of MeOH:DCM (1:1). The eluates were then blown down to approximately 2 mL using a stream of nitrogen and finally reconstituted in 5 mL of methanol for subsequent LC–MS/MS analysis.

2.5. LC–MS/MS analysis

Chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC pump from Waters using a Purospher STAR RP-18e column ($125 \times 2 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ particle diameter, from Merck, Darmstadt, Germany) preceded by a guard column ($4 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) of the same packing material from Merck (Darmstadt, Germany) and gradient elution with ACN and water as mobile phase at a flow rate of $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The 40 min gradient started with 10% ACN in water, increased to 50% ACN in 5 min, and continued to 80% in 25 min and to 100% in 26 min. During the following 5 min the column was cleaned with 100% ACN, and then readjusted to the initial conditions in 1 min, and equilibrated for further 8 min. The injection volume was set to $20 \mu\text{L}$.

MS/MS detection was carried out in the selected reaction monitoring (SRM) mode acquiring 2 SRM transitions per compound and 1 SRM transition per surrogate using a TQD triple-quadrupole mass spectrometer from Waters equipped with an electrospray (ESI) interface working in both positive and negative ion modes along the analytical run. Table 2 lists the target analytes (ordered by their LC retention time), some of their main physical-chemical properties, and the most relevant MS/MS parameters of the method. Other detection conditions were as follows: capillary voltage, 3500 V; source temperature, 150°C ; desolvation temperature, 450°C ; extractor voltage, 3 V; RF lens, 0.1 V. Nitrogen was used as both nebulizing and desolvation gas. Instrument control, data acquisition and evaluation were performed by Masslynx 4.1 software (Micromass, Manchester, UK). Quantitation was carried out by the isotope dilution method using the deuterated compounds listed in Table 2 as surrogate standards.

Table 2
Target compounds (ordered by retention time), main physical–chemical properties, and MS/MS determination conditions.

Pesticides surrogate	MM (g mol ⁻¹)	K _{oc} ^a (ml g ⁻¹)	K _{ow} ^b logP	Henry's law constant at 25 °C (Pa m ³ mol ⁻¹)	RT (min)	ESI mode	SRM1/SRM2 (m/z)	Ratio SRM1/SRM2	Cone (V) SRM1/SRM2	CE (eV) SRM1/SRM2
Deisopropylatrazine (DIA)	173.61	142	1.15	1.52 × 10 ⁻⁰⁵	4.82	+	174 > 132/174 > 104	1.3	30/30	20/25
Deisopropylatrazine d5 (DIA d5)	178.64					+	179 > 137		35	20
Bentazone (BEN)	240.28	51	-0.46	7.20 × 10 ⁻⁰⁵	5.24	-	239 > 132/239 > 197	2.2	35/35	25/20
Bentazone d6 (BEN d6)	246.28					-	245 > 132		35	25
MCPA	200.62	74	-0.81	5.50 × 10 ⁻⁰⁵	5.51	-	199 > 141/199 > 155	2.4	20/15	15/15
MCPA d3	203.64					-	204 > 146		25	20
2,4-D	221.04	56	-0.83	1.30 × 10 ⁻⁰⁵	5.61	-	219 > 161/219 > 125	1.2	15/15	30/10
2,4-D d3	224.06					-	224 > 127		20	25
Mecoprop (MECO)	214.65	31	-0.19	2.20 × 10 ⁻⁰⁴	5.80	-	213 > 141/213 > 71	2.6	15/15	15/15
Mecoprop d3 (MECO d3)	217.67					-	218 > 146		25	15
Desethylatrazine (DEA)	187.63	72	1.51	1.55 × 10 ⁻⁰⁴	5.85	-	188 > 146/188 > 79	3.2	30/30	15/25
Desethylatrazine d6 (DEA d6)	193.63					+	194 > 147		25	20
Dimethoate (DIME)	229.26	30	0.704	1.42 × 10 ⁻⁰⁶	6.08	+	230 > 125/230 > 199	1.5	25/25	15/15
Dimethoate d6 (DIME d6)	235.29					+	236 > 131		30	15
Cyanazine (CYA)	240.69	190	2.1	6.60 × 10 ⁻⁰⁶	7.46	+	241 > 214/241 > 174	9.3	30/30	15/20
Cyanazine d5 (CYA d5)	245.73					+	246 > 219		30	20
Simazine (SIMA)	201.66	130	2.3	5.60 × 10 ⁻⁰⁵	7.46	+	202 > 124/202 > 71	1.1	30/30	20/25
Simazine d10 (SIMA d10)	211.72					+	212 > 137		35	15
Malaoxon (MOX)	314.30	-	0.52	-	7.71	+	315 > 99/315 > 127	1.2	20/20	25/15
Malathion (MALA)	336.39	-	1.69	-	8.05	+	360 > 228		35	15
Fenitrothion oxon (FOX)	261.17	-				+	262 > 104/262 > 216	1.7	30/30	20/20
Fenitrothion oxon d6 (FOX d6)	267.21					+	268 > 222		30	20
Chlorfenthiol (CHLO)	212.68	205	2.5	1.44 × 10 ⁻⁰⁵	8.34	+	213 > 72/213 > 140	29.8	25/25	15/30
Chlorfenthiol d6 (CHLO d6)	218.68					+	219 > 78		35	15
Isoproturon (ISO)	206.29	122	2.5	1.46 × 10 ⁻⁰⁵	8.70	+	207 > 72/207 > 165	7.1	35/35	20/15
Isoproturon d6 (ISO d6)	212.32					+	213 > 171		30	20
Atrazine (ATR)	215.68	100	2.7	1.50 × 10 ⁻⁰⁴	8.91	+	216 > 174/216 > 132	5.7	35/35	15/20
Atrazine d5 (ATR d5)	220.71					+	221 > 179		35	15
Difluron (DIU)	233.10	1067	2.87	2.00 × 10 ⁻⁰⁶	9.07	+	233 > 72/233 > 72	1.6	25/25	15/15
Difluron d6 (DIU d6)	239.13					+	239 > 78		25	25
Propanil (PROP)	218.08	400	2.29	1.74 × 10 ⁻⁰⁴	10.76	-	216 > 160/218 > 162	1.5	30/30	15/15
Fenitrothion d6 (FEN d6)	283.27					-	265 > 152		30	15
Terbutylazine (TER)	229.71	231	3.4	4.18 × 10 ⁻⁰³	11.34	+	230 > 174/230 > 96	4.5	25/25	15/25
Terbutylazine d5 (TER d5)	234.74					+	235 > 179		30	20
Linuron (LINU)	249.10	620	3	2.00 × 10 ⁻⁰⁴	11.75	+	249 > 160/249 > 182	1.2	25/25	15/15
Linuron d6 (LINU d6)	255.10					+	255 > 185		30	30
Molinate (MOLI)	187.31	190	2.86	6.87 × 10 ⁻⁰¹	12.96	+	188 > 126/188 > 83	2.4	30/30	15/20
Linuron d6 (LINU d6)	255.10					+	255 > 184		30	30
Malathion (MALA)	330.36	217	2.75	1.00 × 10 ⁻⁰³	13.98	+	353 > 195/353 > 227	1.8	30/30	15/15
Malathion d6 (MALA d6)	336.39					+	360 > 228		35	15
Metolachlor (METO)	283.80	200	3.4	2.40 × 10 ⁻⁰³	14.05	+	284.8 > 176/284.8 > 73	6.4	25/25	25/25
Metolachlor d6 (METO d6)	289.83					+	290 > 258		25	15
Alachlor (ALA)	269.77	124	3.09	3.20 × 10 ⁻⁰³	14.17	+	270 > 238/270 > 162	2.2	30/30	15/15
Alachlor d13 (ALA d13)	282.85					+	283 > 251		15	10
Fenitrothion (FEN)	277.24	322	3.32	9.86 × 10 ⁻⁰³	14.39	-	262 > 152/262 > 122	15.9	25/25	30/20
Fenitrothion d6 (FEN d6)	283.27					-	265 > 152		30	15
Chlorfenvinphos (CFP)	359.58	680	3.8	-	15.06	-	359 > 155/359 > 170	1.9	25/25	15/40
Chlorfenvinphos d10 (CFP d10)	369.60					+	369 > 101		25	30
Diazinon (DIAZ)	304.35	643	3.69	6.09 × 10 ⁻⁰²	17.78	+	305 > 153/305 > 97	1.8	35/35	20/30
Diazinon d10 (DIAZ d10)	314.40					+	315 > 170		35	20
Chlorpyrifos (CPP)	350.59	8151	4.7	4.78 × 10 ⁻⁰¹	24.17	+	352 > 97/352 > 200	1.7	20/20	30/20
Chlorpyrifos d10 (CPP d10)	360.64					+	362 > 131		25	20

^a Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2011. The PPDB, Pesticide Properties Database. University of Herfordshire, UK. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/index2.htm>.
CE: collision energy; ESI: electrospray ionization; K_{oc}: organic carbon partition coefficient; K_{ow}: octanol–water partition coefficient; MM: molecular mass; RT: retention time; SRM: selected reaction monitoring.

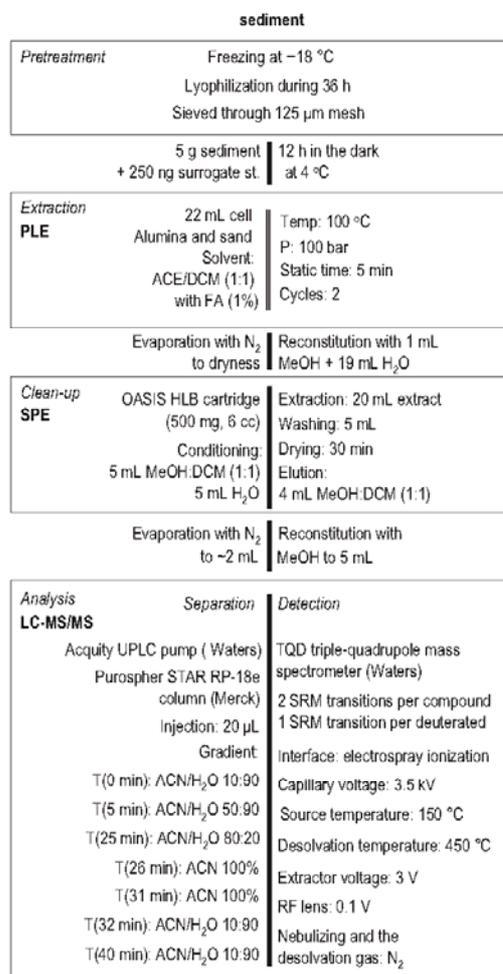


Fig. 1. Scheme of the optimized analytical method.

Fig. 1 shows the scheme of the complete analytical procedure and Fig. 2 representative chromatograms from the analysis of a standard mixture of the analytes at a concentration of 100 ng mL^{-1} (corresponding to 100 ng g^{-1} of sediment).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the analytical procedure

The development of multi-residue analytical methods for determination of compounds with a wide variety of physical–chemical properties is a challenge. It requires the careful optimization of each step of the analytical method, from extraction to analysis, in order to achieve an overall acceptable method performance for the whole set of target compounds. In general the optimization process and the analytical procedure follow reverse order in the sense that the first optimized step is usually the last one in the analytical procedure, in this case the LC–MS/MS conditions, and the last one is the extraction (the first step in the analytical procedure), leaving in the middle the intermediate steps. The processes followed in the

present study for optimization of each of them are described in the following sections.

3.1.1. Optimization of the LC–MS/MS conditions

The LC–MS/MS method employed has its origin in a method published in 2004 for analysis of 20 pesticides [11] that has been continuously upgraded and improved through the years to include an increasing number of analytes, introduce the use of deuterated compounds for quantification, make use of newer, more advanced instrumentation, etc. The conditions used in the present study have been recently set up in the context of the optimization of a method for analysis of pesticides in wastewater samples [12] and, as previously mentioned, they include the acquisition of 2 SRM transitions per compound. According to the Commission Decision 2002/657/EC [13] on the performance of analytical methods and the interpretation of results (of application to the analysis of residues in live animals and animal products) this mode of operation affords 4 identification points (IPs, one per precursor ion and 1.5 for each of the 2 transition products), which is the minimum number of IPs required in the analysis of banned compounds.

Attending to this regulation [13] and that concerning the technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status [10], the following two criteria were adopted for compound identification and confirmation criteria:

- (1) the LC retention must be within 2% the retention time of the standard compound (in cases when this limit has been occasionally surpassed, the identification/confirmation has been deemed positive if the corresponding IS showed similar retention time deviation),
- (2) the relative abundance of the two SRM transitions in the sample should not differ by more than 20% (ratio: 1–2), 25% (ratio: 2–5), 30% (ratio: 5–10) or 50% (ratio: 10–100) from that in the previously injected standard.

3.1.2. Optimization of the SPE clean-up step

In the optimization of the SPE clean-up step, which was deemed necessary after a few preliminary experiments to reduce matrix effects and improve method sensitivity and robustness, 4 different cartridges, well suited in principle for the extraction of medium to polar compounds with a wide margin of octanol–water partition coefficients, were evaluated: Oasis HLB ($50\text{--}65\text{ }\mu\text{m}$, 500 mg, 6 mL, from Waters), Evolute ABN ($50\text{ }\mu\text{m}$, 200 mg, 6 mL, from Biotage, Uppsala, Sweden), LiChrolut EN ($40\text{--}120\text{ }\mu\text{m}$, 200 mg, 3 mL, from Merck), and Carbograph ($35\text{--}125\text{ }\mu\text{m}$, 1000 mg, 15 mL, from Alltech, Sabadell, Spain). For this purpose, $50\text{ }\mu\text{L}$ of a standard mixture of the analytes at $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ was added to 20 mL of a water:MeOH (95:05) solution giving a final concentration of 25 ng mL^{-1} (equivalent to 100 ng g^{-1} of sediment considering the previous PSE step). This solution was passed through the various cartridges to be tested, previously conditioned with 5 mL of DCM:MeOH (9:1), 5 mL of MeOH, and 5 mL of reagent water using a Baker vacuum system (J.T. Baker, The Netherlands). The cartridges were then washed with 5 mL of water, dried for 30 min under pressure, and sequentially eluted with 4 mL of MeOH (eluent 1), followed by 4 mL of DCM:MeOH (9:1) (eluent 2), and 4 mL of DCM:MeOH (9:1) acidified with formic acid to pH 2–3 (eluent 3). Each resulting eluate was evaporated to dryness under nitrogen and reconstituted with 1 mL of MeOH. In parallel, $50\text{ }\mu\text{L}$ of the standard mixture of the analytes at $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ was added to a vial and brought to 1 mL with MeOH as a control. Table 3 shows the results of the analysis of these eluates as percentages of those obtained in the LC–MS/MS analysis of the control solution. As it can be seen for most compounds the best recoveries were achieved with the Oasis HLB cartridge using methanol as elution solvent. Notably better recoveries with

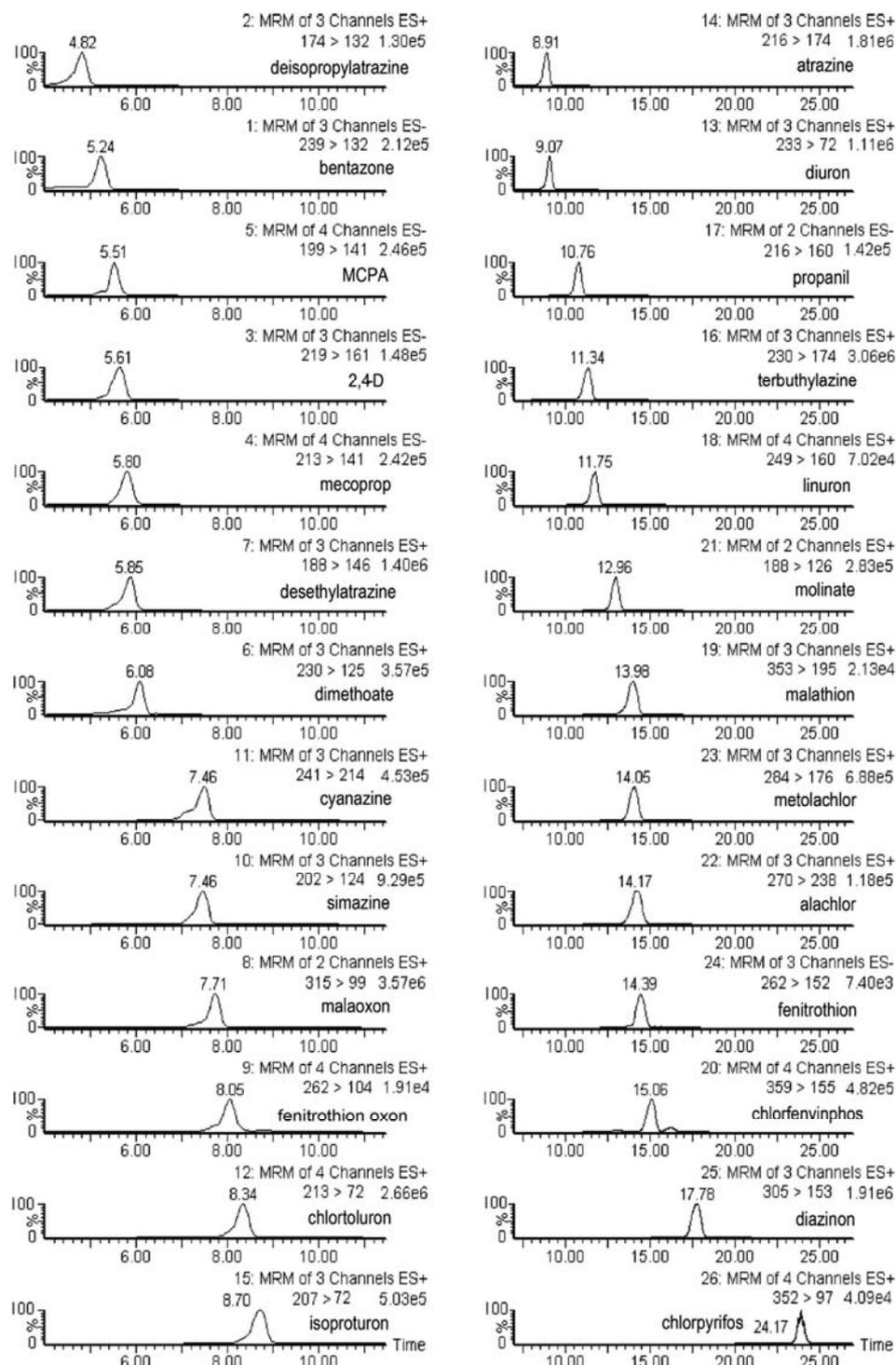


Fig. 2. SRM chromatograms corresponding to the analysis of a sediment sample spiked with the analytes at 100 ng mL⁻¹.

Table 3
Recoveries (%) obtained in the SPE step with different cartridges after sequential elution with 4 mL MeOH (eluent 1), 4 mL DCM:MeOH 9:1 (eluent 2), and 4 mL DCM:MeOH 9:1 acidified with formic acid (eluent 3).

Pesticide	ESI	Oasis HLB			Evolute ABN			Lichrolut EN			Alltech carbograph		
		Eluent 1	Eluent 2	Eluent 3	Eluent 1	Eluent 2	Eluent 3	Eluent 1	Eluent 2	Eluent 3	Eluent 1	Eluent 2	Eluent 3
Deisopropylatrazine	+	103.1	1.3	0.0	118.6	0.5	0.1	54.1	0.1	0.0	0.0	63.7	0.6
Bentazone	-	111.9	0.7	1.8	49.3	0.4	0.5	140.4	0.3	0.9	0.0	0.0	62.0
MCPA	-	111.7	0.6	1.3	48.2	0.9	2.1	83.6	1.5	40.6	0.0	0.2	54.9
2,4-D	-	93.5	0.5	1.8	39.4	0.8	2.1	75.7	1.4	39.1	0.0	0.2	24.5
Mecoprop	-	108.6	0.6	1.5	65.7	0.8	2.2	142.7	2.0	26.0	0.0	0.0	61.5
Desethylatrazine	+	114.7	1.8	0.1	95.5	1.0	0.1	54.8	0.1	0.0	1.1	70.0	0.2
Dimethoate	+	75.9	0.1	0.1	29.8	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	31.2	0.0	0.0
Cyanazine	+	91.8	2.0	0.1	81.7	1.2	0.1	54.2	0.3	0.0	0.1	56.8	0.1
Simazine	+	96.4	2.8	0.1	92.3	1.6	0.1	84.6	0.3	0.0	0.0	89.0	0.3
Chlortoluron	+	90.4	2.4	0.1	87.9	1.2	0.1	90.0	0.5	0.0	0.0	69.4	5.3
Isoproturon	+	85.6	1.8	0.1	74.7	1.0	0.0	86.6	0.5	0.0	0.0	76.2	0.3
Atrazine	+	90.3	2.5	0.1	81.8	1.3	0.1	72.2	0.3	0.0	0.0	82.4	0.2
Diuron	+	91.3	3.4	0.1	87.5	1.3	0.1	83.9	0.8	0.0	0.0	10.2	54.1
Propanil	-	74.3	4.0	0.1	39.1	0.8	0.0	180.0	1.8	0.1	0.0	0.3	0.1
Terbutylazine	+	87.2	3.9	0.2	77.6	1.4	0.1	64.0	0.8	0.0	1.3	88.5	0.3
Linuron	+	81.9	9.8	0.1	83.0	2.0	0.1	81.4	4.1	0.1	0.0	62.0	7.6
Molinate	+	3.2	1.6	0.2	108.6	9.6	0.2	173.1	8.0	0.2	4.2	11.3	0.9
Malathion	+	23.5	0.1	0.4	3.3	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.9
Metolachlor	+	61.9	4.3	0.2	41.6	0.2	0.0	21.0	2.8	0.0	9.2	10.0	0.4
Alachlor	+	44.1	0.7	0.0	20.5	0.0	0.1	11.0	0.3	0.0	6.6	7.5	0.3
Fenitrothion	-	19.9	16.0	0.5	25.2	0.5	0.1	8.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0
Diazinon	+	39.4	23.1	1.0	51.8	3.3	0.2	54.0	7.7	0.1	0.0	91.5	2.2

other cartridges were only observed in the case of diazinon with the Carbograph cartridge (91.5% recovery in the second eluate) and in the case of molinate with the ABN cartridge (108.6% recovery in the methanolic fraction).

On the other hand, subsequent elution of the Oasis HLB cartridge with DCM:MeOH (9:1) only improved appreciably the recovery of diazinon and fenitrothion (23.1 and 16.0% recoveries in eluate 2, respectively). In order to refine the elution process and achieve maximum recovery and selectivity Oasis HLB cartridges prepared in the same way as above were eluted with different solutions with decreasing polarity (each cartridge was eluted with a single different solution): MeOH (ELU1), MeOH:DCM 9:1 (ELU2), MeOH:DCM 1:1 (ELU3), MeOH:DCM 1:9 (ELU4), acetone (ELU5), and acetone:hexane 1:1 (ELU6). As it is shown in Fig. 3 the best recoveries for most compounds were achieved with the selected MeOH:DCM 1:1 solution. The use of more apolar solutions with theoretically higher eluting power like ELU4, ELU5, and ELU6 only improved the recovery of alachlor and made the recovery of the most polar compounds like bentazone, MCPA and 2,4-D

considerably worse; meanwhile dimethoate, molinate and malathion showed somewhat inconsistent results.

3.1.3. Evaporation step

In the case of molinate the poor recovery results obtained in all tested conditions, together with its high Henry's law constant, suggested the possibility of its loss during the evaporation step. In order to examine this possibility further, not only for the case of molinate but also for other compounds showing also quite unsatisfactory recoveries and fairly high Henry's law constants, a specific evaporation experiment was conducted. For this purpose, 1 mL of a standard mixture of the analytes at 0.5 µg mL⁻¹ in methanol was evaporated using a stream of nitrogen under different pressure and time conditions: 0.067 psi for 1 h (P1T1), 0.067 psi for 2 h (P1T2), 0.133 psi for 0.5 h (P2T1), and 0.133 psi for 1.5 h (P2T2). The same standard mixture without evaporation was used as a control and all tests were run in triplicate.

Fig. 4 shows the results of the evaporation test. As expected, various compounds resulted lost during the process to different

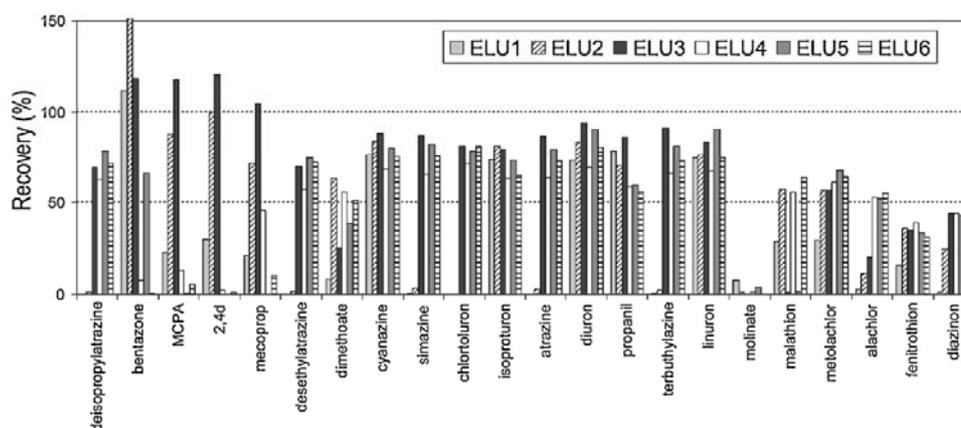


Fig. 3. Recoveries obtained in the SPE step with Oasis HLB cartridges when using different solvents for elution: MeOH (ELU1); MeOH:DCM 9:1 (ELU2); MeOH:DCM 1:1 (ELU3); DCM:MeOH 9:1 (ELU4); ACE (ELU5); ACE:HEX 1:1 (ELU6).

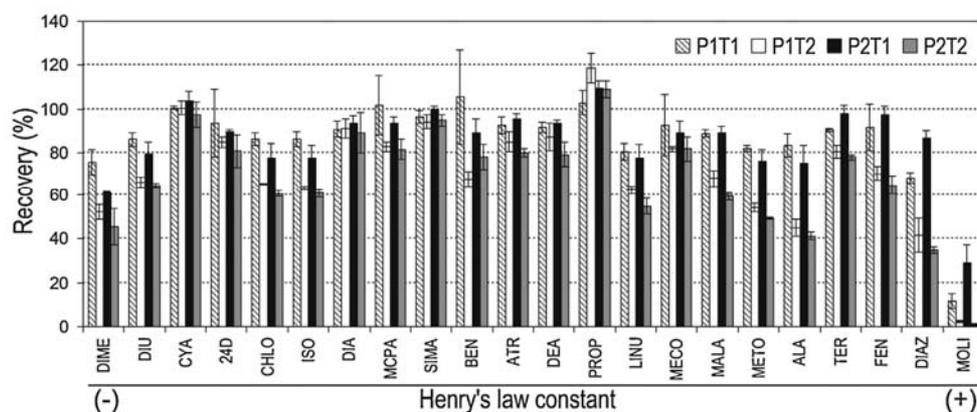


Fig. 4. Recoveries of the analytes (ordered according to their Henry's law constant) after evaporation under different pressure and time conditions: 0.067 psi for 1 h (P1T1), 0.067 psi for 2 h (P1T2), 0.133 psi for 0.5 h (P2T1), and 0.133 psi for 1.5 h (P2T2).

extents, mainly, molinate, diazinon, alachlor, metolachlor and malathion, which are among the compounds with the highest Henry's law constants. The results also show that the evaporation time has a more pronounced effect on the evaporation of the compounds than the pressure. This means that the evaporation step shall be avoided as far as possible or at least optimized and controlled to the maximum in order to obtain better and more reproducible recoveries and results, by using, for instance, higher pressures but for a shorter period of time (as in P2T1) instead of long evaporation times at low pressure (as in P1T2). This means also that the SPE clean-up process optimized performs better than shown in Table 3 for some of the most volatile compounds. In the light of these results and in order to minimize the losses due to evaporation, the SPE extract was blown down under nitrogen just to the point to ensure the removal of the DCM (more volatile than methanol) fraction making it up afterwards to an exact volume (5 mL) with MeOH. Since this involves dilution of the extract (from the 1 mL volume originally planned to 5 mL), the sample amount initially selected (1 g) was 5-fold increased (to 5 g) in order to maintain the sensitivity of the method within acceptable limits.

3.1.4. Optimization of the PLE process

In the optimization of the PLE procedure (as well as in the method validation process and in the analysis of real samples), the addition of the corresponding analytes and/or surrogate standards to the samples was performed 12 h in advance to the subsequent sample manipulation. This time was selected on the basis of the results obtained by Bermudez-Couso et al. [14] who evaluated the influence of the residue residence time (30 min, 3, 5, 7 and 12 h) on fungicide recoveries and found no differences in the pesticides extracted after 7 h of equilibration. In our studies, to ensure equilibrium, samples were left overnight at 4°C for 12 h.

Extraction of pesticides from sediments or soils has been performed with a variety of techniques, including, Soxhlet, ultrasonic solvent extraction (USE), shake-flask extraction, microwave assisted extraction (MAE), the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method, that is becoming increasingly popular in the area of multi-residue pesticide analysis in food and agricultural products, and pressurized liquid extraction (PLE) (see Table 1). The latter, selected for the present study, is probably the most commonly used for extraction of organic contaminants from solid environmental samples due to its well-known advantages (basically short extraction time and low solvent consumption).

A typical PLE procedure comprises four main steps: (1) filling the cell with solvent and heating; (2) a static soaking of the sample in the heated solvent; (3) flushing the sample with fresh solvent; and (4) purging the sample with nitrogen forcing the remaining solvent out of the cell [15]. On the basis of the methods published for pesticides in solid environmental samples like, for instance, the 3545A pressurized fluid extraction method established by the Environmental Protection Agency (EPA) [45], the extraction temperature, which has varied in the literature between 50°C [16] and 140°C [23], with predominance of 100°C [3,27,30,45], was set to 100°C. In accordance with the EPA method and those of other authors who have worked at pressures close to 100 bars [3,27,30], this value was selected for our experiments. The static time has varied between 5 min [3] and 20 min [23], but the most used value, as recommended by the EPA, is 5 min (selected). Finally, cycles have been between 1 [15] and 3 [16,23], and the EPA method [45] recommends just 1 cycle. However, to ensure the elution of the pesticides 2 cycles with a solvent flush step of 15 s and the pass of N₂ during 1 min after each of them were selected.

Under the above conditions, the following solvent mixtures, chosen to cover a wide range of polarity compounds, were tested for extraction: ACE:MeOH 1:1 (EXT1), ACE:DCM 1:1 (EXT2), ACE:DCM 1:1 with 1% formic acid (EXT3) and ACE:HEX 1:1 (EXT4). The recoveries obtained after PLE with each of these solvent mixtures and subsequent SPE clean-up (experiments performed in triplicate with 5 g sediment samples spiked with the analytes at 1 µg g⁻¹) are shown in Fig. 5. To eliminate potential matrix effects from the computation, these extraction recoveries were calculated in reference to sample extracts obtained in the same way but spiked with the analytes right before injection in the LC-MS/MS system instead of at the beginning of the process. As it can be seen, the best results were obtained with the solvent mixtures containing DCM (EXT2 and EXT3), however, only ACE/DCM 1:1 with 1% formic acid was capable of extracting the acidic pesticides MCPA, 2,4-D and mecoprop and was hence selected. In an attempt to avoid the use of DCM, well known for being a hazardous, not environmentally friendly solvent, extraction of the compounds with acidic ACE:HEX was further tested but with less satisfactory results. These findings are in the line of the 3545A EPA method which recommends ACE:HEX (1:1) or ACE:DCM (1:1) for organochlorine pesticides, DCM or ACE:DCM 1:1 for organophosphorus pesticides, and ACE:DCM with phosphoric acid (250:125:15) or trifluoroacetic acid (250:125:1) for chlorinated herbicides.

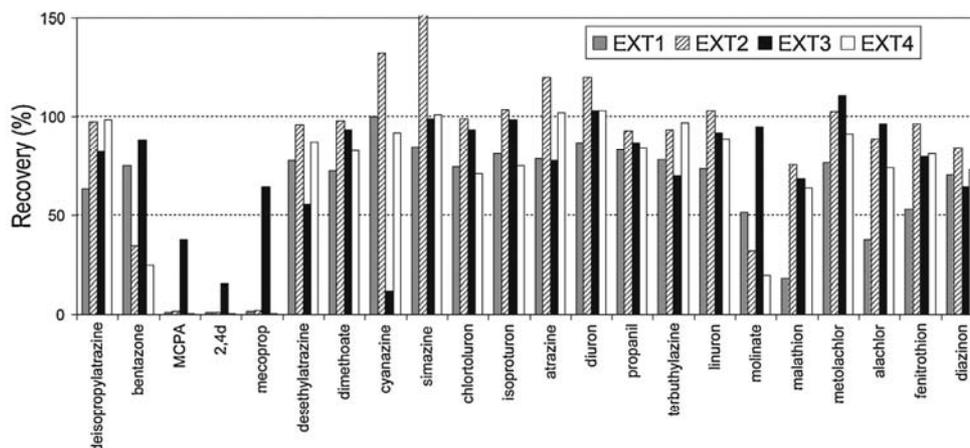


Fig. 5. Recoveries of the analytes after PLE (and SPE clean-up) with different extraction solvents: ACE/MeOH 1:1 (EXT1), ACE/DCM 1:1 (EXT2), ACE/DCM 1:1 with 1% FA (EXT3), ACE/HEX 1:1 (EXT4).

Table 4
Method performance parameters.

Pesticides	Linearity r^2	Recovery ($n=6$, 50 ng g^{-1})			LOD (ng g^{-1})	Ldet (ng g^{-1})
		Absolute (%)	Relative (%)	RSD (%)		
Deisopropylatrazine	0.9989	36.3	93.7	6.4	0.51	1.68
Bentazone	0.9992	1.5	105.3	21.3	3.74	12.46
MCPA	0.9997	0.2	110.0	76.4	16.98	76.60
2,4-D	0.9989	0.3	118.2	244.9	2.53	17.68
Mecoprop	0.9992	0.5	111.0	55.0	4.17	13.90
Desethylatrazine	0.9994	33.0	96.4	3.1	0.15	0.50
Dimethoate	0.9994	78.1	94.1	12.6	0.06	0.20
Cyanazine	0.9999	63.8	104.9	3.5	0.08	0.26
Simazine	0.9993	38.9	102.1	10.5	0.08	0.28
Malaoxon	0.9991	63.8	66.5	12.2	0.05	0.16
Fenitrothion oxon	0.9989	39.0	102.4	16.5	0.88	3.09
Chlortoluron	0.9998	69.7	92.1	2.7	0.03	0.21
Isoproturon	0.9999	75.5	100.0	2.4	0.02	0.22
Atrazine	0.9999	54.5	111.5	5.3	0.05	0.16
Diuron	0.9991	66.1	98.9	2.6	0.06	0.21
Propanil	0.9991	107.5	97.2	6.7	0.22	0.74
Terbutylazine	0.9999	54.0	99.8	1.5	0.04	0.13
Linuron	0.9989	72.8	92.8	5.1	1.87	6.24
Molinate	0.9930	66.0	101.8	5.9	0.71	2.37
Malathion	0.9993	48.2	114.7	11.3	2.06	6.87
Metolachlor	0.9999	80.4	100.2	2.7	0.08	0.31
Alachlor	0.9994	80.4	102.6	2.8	0.36	1.18
Fenitrothion	0.9996	96.5	108.7	5.0	2.12	25.75
Chlorfenvinphos	0.9998	80.0	96.0	2.6	0.19	0.63
Diazinon	0.9994	70.1	92.7	5.4	0.16	0.54
Chlorpyrifos	0.9989	59.1	100.6	4.2	3.23	10.76

LOD: limit of detection; Ldet: limit of determination; RSD: relative standard deviation.

3.2. Validation

The factors considered in the validation included determination coefficient (r^2), limit of detection (LOD), limit of determination (Ldet), recovery (absolute and relative), and precision (relative

standard deviation – RSD). EQS for pesticides in sediments, and hence of guidelines about the fortification levels to be used in the recovery studies, the last two parameters were evaluated through the replicate analysis ($n=6$) of a sediment sample spiked at three different concentrations: 25, 50 and 100 ng g^{-1}

Table 5
Sampling: river basin, location, coordinates, and percentage of total organic carbon of the sediment samples analyzed.

Basin	Location	UTM coordinates (datum etrs89)	TOC (% org)
Ebro (EBR)	Segre River in Torres de Segre (Lleida)	X: 292482 Y: 4601301	4.86
Guadalquivir (GUA)	Guadalquivir River in Lebrija (Sevilla)	X: 751405 Y: 4094029	1.14
Jucar (JUC)	Jucar river in Sueca	X: 729360 Y: 4343192	2.55
Llobregat (LLO1)	Llobregat river in Martorell	X: 411036 Y: 4592524	0.65
Llobregat (LLO2)	Llobregat river in Sant Joan Despí	X: 420247 Y: 4577928	2.14

Table 6
Levels of pesticides (in ng g⁻¹) in the sediment samples analyzed and comparison with previously published values.

	[18] Chile	[22] Beijing, China	[3] Portugal	[30] Ebro, Spain	[32] Lerma, Spain	[33] Lorraine, France	[1] Brazil	This study Ebro, Spain	This study Guadalquivir, Spain	This study Júcar, Spain	This study Lobregat, Spain
2,4-D											
Alachlor		0.059–0.241 (100%)	nd	7.17 (2%)	nd		nd	nd	nd	nd	nd
Atrazine			nd	nd				nd	nd	nd	nd
Bentazone								nd	nd	nd	nd
Chlorfenvinphos		0.072–0.237 (86%)	nd	nd				66	nd	15	nd
Chlorpyrifos								nd	nd	nd	nd
Chlorotoluron								nd	nd	nd	nd
Cyanazine								nd	nd	nd	nd
Deisopropylatrazine								nd	3.1	nd	nd; 5.2
Desethylatrazine								nd	nd	nd	nd
Diazinon	nd		11.5–192 (8%)	7.61–72.08 (12%)	nd			nd	nd	nd	0.7; 4.6
Dimethoate				nd	nd			nd	2.6	nd	nd
Duron								nd	nd	1.7	nd
Fenitrothion			7.48–55.6 (33%)	nd				nd	nd	nd	nd
Fenitrothion oxon	nd							nd	nd	nd	nd
Isoproturon					nd			nd	nd	nd	nd
Limuron						9.5 (100%)		nd	nd	nd	nd
Malaoxon								nd	nd	nd	nd
Malathion								nd	nd	nd	nd
MCPA			nd	nd				nd	nd	nd	nd
Mecoprop								nd	nd	nd	nd
Metolachlor		0.376–0.627 (100%)	nd	nd				nd	nd	nd	nd
Molinate				3.45 (2%)				nd	nd	nd	nd
Propanil				6.89 (2%)				nd	nd	nd	nd
Simazine			7.01–15.7 (12%)	nd	nd			nd	nd	nd	nd
Terbutylazine			nd	nd	nd			0.8	0.3	nd	1.0; 1.4

nd; below LOD; [18] Fuentes et al. (2007), [31] Villaverde et al. (2008), [32] Abrahao et al. (2011), [1] Brondi et al. (2011).

nq; below Ldet; [22] Xue et al. 2008, [30] Navarro-Ortega et al. 2010, [33] Lazarigues et al. 2011.

Values between parentheses indicate percentage of positive samples.

(surrogate standards at 50 ng g^{-1}), selected on the basis of the most recent occurrence data published in the literature [1,14,34,35]. In the final validation step of the above described method, previously optimized for 22 pesticides, four additional compounds were considered: chlorfenvinphos, chlorpyrifos, malaoxon (malathion transformation product) and fenitrothion oxon (fenitrothion transformation product), for which chlorfenvinphos d_{10} , chlorpyrifos d_{10} , malathion d_6 and fenitrothion oxon d_6 were used as surrogate standards, respectively. Thus, the validation of the method was carried out with 26 instead of 22 analytes.

Ten-point calibration curves were constructed using least-squares linear regression analysis at concentrations ranging from 0.01 ng mL^{-1} (or the limit of quantification – LOQ – if higher) to 500 ng mL^{-1} (equivalent to $0.01\text{--}500 \text{ ng g}^{-1}$ of sediment). The LOD and LOQ were defined as the concentration of analyte that produced in the sediment matrix a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. Besides that, the Ldet is the minimum concentration of a compound that can be quantified with the first transition ($>\text{LOQ}$, SRM1) and confirmed with the second one ($>\text{LOD}$, SRM2). As it can be seen in Table 4 results were good in terms of linearity (with $r^2 > 0.99$ for all compounds), sensitivity (with LOD in the pg/g or low ng g^{-1} range for basically all analytes, and Ldet below 80 ng g^{-1}), accuracy (with relative recoveries – comparison of the absolute recoveries of the analytes with those of their surrogates – between 92.1 and 118.2%, except for malaoxon (66.5%), at the intermediate spiking level of 50 ng g^{-1}), and repeatability (with RSD between 1.3 and 17%, for all compounds except the acidic herbicides, again at 50 ng g^{-1}). Results for the other spiking levels can be found in the supplementary information. The acidic herbicides bentazone, MCPA, 2,4-D and mecoprop, that after optimization of the various analytical steps had shown absolute recoveries between 15 and 88% (see Fig. 5), in the validation study (carried out with a different sediment sample and hence matrix) showed very poor results in terms of absolute recovery ($<2\%$) and RSD (between 21 and 245%), even though relative recoveries (between 105 and 118%) and LOD (between 2.3 and 17 ng g^{-1}) were acceptable.

Comparison of the LOD and Ldet achieved with those listed for LC-MS-based methods in Table 1 shows values in the same range or slightly better in the present study with the difference that the number of pesticides measured with the present method is considerably larger (26 vs maximum 13 in the published methods [33]) and covers different chemical classes, namely, triazines, phenylureas, organophosphates, anilines, thiocarbamates, acidic pesticides, and metabolites/transformation products of some of them.

Another additional advantage with respect to most of the previously published methods is the use of isotopically labelled compounds analogues to the target pesticides for basically all of them (all 26 analytes except malaoxon, propanil, molinate). The use of deuterated compounds as surrogate standards for quantification by the isotope dilution method is critical to correct for potential analyte losses (e.g., during extract evaporation), matrix interferences and/or sensitivity variations in the LC-MS/MS equipment (even within a single sequence), and hence to obtain accurate, reliable results. This is particularly important in the analysis of complex samples such as river sediments where matrix effects can be pronounced and very variable from one sample to another. It also contributes to improve the precision of the method obtaining RSD below 50% ($<36\%$) that thus comply with the technical specifications set by the European legislation for chemical analysis and monitoring of water status (Directive 2009/90/EC [10]).

3.3. Application to real samples

As a part of the validation procedure, the analytical method developed was used to monitor the presence of the target pesticides in different sediment samples collected from various Spanish rivers. The location, coordinates and percentage of total organic carbon of the samples are detailed in Table 5. The results obtained, together with others reported in the literature, are listed in Table 6. As it can be seen, only 5 pesticides, out of the 26 analyzed, were detected: chlorpyrifos, desiopropylatrazine, diazinon, diuron, and terbuthylazine. The first 3 compounds were measured in 2 samples and the last 2 pesticides in 4 (out of the 5 analyzed) samples.

The compound showing the highest concentration was chlorpyrifos (66 ng g^{-1} in the Ebro River), which according to the physical-chemical properties listed in Table 2, is also the compound with the highest probability to be found in sediments, in the light of its high potential for bioaccumulation ($\text{Kow} > 3$) and extremely low mobility ($\text{Koc} > 4000$). According to the EPA chlorpyrifos is one of the most widely used organophosphate insecticides used in agriculture.

Following the same reasoning, the second compound most likely to be found in sediments would be diuron, which was in fact the second most abundant pesticide determined in our study (21.9 ng g^{-1} in sediment from the Llobregat River). Diuron is a pre-emergence residual herbicide used for total control of weeds and mosses, and its finding at the Llobregat River is not surprising since the sampling site here is just after the discharge of the so-called “Canal de la derecha”, which is a channel that provides irrigation water for several agriculture fields in the area and also captures runoff.

On the other hand, diazinon (as well as chlorpyrifos) is among the pesticides most used at home [46]. It was also found in the sediments from the Llobregat River at the Barcelona region (an important urban area), and its presence here is related to its occurrence in urban raw wastewaters and its poor removal in wastewater treatment plants [12]. In the other previous studies reviewed (see Table 6), diazinon was the pesticide showing the highest concentration (72 ng g^{-1} in the Ebro River).

Finally, the other 2 compounds detected, the triazine herbicide terbuthylazine and the triazine transformation product desio-propylatrazine, were measured at levels up to 1.4 and 5.2 ng g^{-1} , respectively.

4. Conclusions

The analytical method developed, based on PLE, SPE clean-up, and LC-MS/MS analysis showed good performance parameters in terms of sensitivity, repeatability and accuracy, enabling the determination of a wide spectrum of pesticides coming from many different families, correcting for any loss, interference or sensitivity variations in the equipment. Its application to real samples revealed the presence of only a few pesticides (5 out of the 26 analyzed) in sediments from different Spanish rivers, though at fairly low levels (up to 66 ng g^{-1}). This limited occurrence, however, should not be considered irrelevant, since many of these compounds show high toxicity to the aquatic environment as, for instance, chlorpyrifos and diazinon for aquatic invertebrates, and diuron for algae.

Acknowledgements

The work was financially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the projects SCARCE (Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065) and CEMAGUA (CGL2007-64551/HID). Merck is acknowledged for the gift of the LC columns and the Lichrolut EN SPE cartridges, and Biotage for the gift of the Evolute ABN cartridges. Marianne Köck Schulmeyer

acknowledges the European Social Fund and AGAUR (Generalitat de Catalunya, Spain) for their economical support through the FI pre-doctoral grant.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.036>.

References

- [1] S.H.G. Brondi, A.N. de Macedo, G.H.L. Vicente, A.R.A. Nogueira, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86 (2011) 18.
- [2] S. Gomez, D. Gorri, A. Irabien, *Environ. Monit. Assess.* 176 (2011) 385.
- [3] J. Villaverde, A. Hildebrandt, E. Martinez, S. Lacorte, E. Morillo, C. Maqueda, P. Viana, D. Barcelo, *Sci. Total Environ.* 390 (2008) 507.
- [4] Council of the European Communities, *Off. J. Eur. Community L* 327 (2000) 1.
- [5] J. Stronkhorst, J. Brils, J. Batty, M. Coquery, M. Gardner, J. Mannio, C. O'Donnell, J. Steenwijk, P. Frintrop, Discussion document on Sediment Monitoring Guidance for the EU Water Framework Directive, Version 2, EU Water Framework Directive Expert Group on Analysis and Monitoring of Priority Substances, 2004.
- [6] Council of the European Communities, COM(2011) 875 final, Commission of the European Communities, Brussels, 2012.
- [7] Council of the European Communities, COM(2011) 876, Commission of the European Communities, Brussels, 2012.
- [8] K. Jaglal, *Water Environ. Res.* 81 (2009) 1957.
- [9] A.K. Chopra, M.K. Sharma, S. Chamoli, *Environ. Monit. Assess.* 173 (2011) 905.
- [10] Council of the European Communities, Directive 2009/90/EC, *Off. J. Eur. Community L* 201 (2009) 36.
- [11] A.C. Borba da Cunha, M.J. Lopez de Alda, D. Barcelo, T.M. Pizzolato, J.H.Z. dos Santos, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 940.
- [12] M. Köck-Schulmeyer, M. Villagrasa, M. López de Alda, R. Céspedes-Sánchez, F. Ventura, D. Barceló, *Sci. Total Environ.* 458–460 (2013) 466.
- [13] Council of the European Communities, Decision 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Community L* 221 (2002) 8.
- [14] A. Bermudez-Couso, M. Arias-Estevéz, J.C. Novoa-Munoz, E. Lopez-Periago, B. Soto-Gonzalez, J. Simal-Gandara, *Water Res.* 41 (2007) 4515.
- [15] T. Hemiksen, B. Svensmark, R.K. Julier, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 79.
- [16] T. Dagnac, S. Bristeau, R. Jeannot, C. Mouvet, N. Baran, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 225.
- [17] M. Ibañez, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. Lopez, F. Hernandez, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 145.
- [18] E. Fuentes, M.E. Baez, R. Labra, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 40.
- [19] X. Shen, Q. Su, X. Zhu, Y. Gao, *Anal. Chim.* 97 (2007) 647.
- [20] A. Ghanem, P. Bados, F. Perreau, R. Benabdallah, C. Plagellat, L.F. de Alencastro, J. Einhorn, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 345.
- [21] M.I. Hladik, K.M. Kuivila, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 2310.
- [22] N. Xue, F. Li, H. Hou, B. Li, *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (2008) 1055.
- [23] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [24] J.B. Baugros, C. Cren-Olive, B. Giroud, J.Y. Gauthier, P. Lanteri, M.F. Grenier-Loustalot, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4941.
- [25] A.I. Garcia-Valcarcel, J.L. Tadeo, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 117.
- [26] M. Hutta, M. Chalanyova, R. Halko, R. Gora, S. Dokupilova, I. Rybar, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2034.
- [27] A. Hildebrandt, S. Lacorte, D. Barcelo, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 57 (2009) 247.
- [28] N. Rosales-Conrado, *Chemosphere* 77 (2009) 821.
- [29] D. Drozdzyński, J. Kowalska, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 2241.
- [30] A. Navarro-Ortega, R. Tauler, S. Lacorte, D. Barcelo, *J. Hydrol.* 383 (2010) 5.
- [31] M. Ricart, H. Guasch, D. Barcelo, R. Brix, M.H. Conceicao, A. Geiszinger, M.I.L. de Alda, J.C. Lopez-Doval, I. Munoz, C. Postigo, A.M. Romani, M. Villagrasa, S. Sabater, *J. Hydrol.* 383 (2010) 52.
- [32] R. Abrahao, J. Sarasa, J. Causape, I. Garcia-Garizabal, J.L. Ovelleiro, *Span. J. Agric. Res.* 9 (2011) 124.
- [33] A. Lazartigues, C. Fratta, R. Baudot, L. Wiest, C. Feidt, M. Thomas, C. Cren-Olive, *Talanta* 85 (2011) 1500.
- [34] J. Wasswa, B.T. Kiremire, P. Nkedi-Kizza, J. Mbabazi, P. Ssebugere, *Chemosphere* 82 (2011) 130.
- [35] J. Sanchez-Avila, M. Fernandez-Sanjuan, J. Vicente, S. Lacorte, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6799.
- [36] M. Kvicálová, P. Doubravová, R. Jobanek, M. Jokesová, V. Ocenásková, H. Suessenkova, A. Svobodova, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89 (2012) 21.
- [37] E. Van Ael, A. Covaci, R. Blust, L. Bervoets, *Environ. Int.* 48 (2012) 17.
- [38] G. Liu, J. Li, L. Yin, L. Liu, H. Qi, Y. Wu, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 2681.
- [39] R. Nomen, J. Sempere, F. Chavez, N. Amaya de Lopez, M. Dolores Rovira, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19 (2012) 3547.
- [40] H. Hellar-Kihampa, K. De Wael, E. Lugwisha, G. Malarvannan, A. Covaci, R. Van Grieken, *Sci. Total Environ.* 447 (2013) 186.
- [41] N. Quinete, J. Wang, A. Fernandez, J. Castro, P.R. Gardinali, *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 1.
- [42] P.V. Toan, Z. Sebesvari, M. Bläwing, I. Rosendahl, F.G. Renaud, *Sci. Total Environ.* 452–453 (2013) 28.
- [43] D. Yang, S. Qi, J. Zhang, C. Wu, X. Xing, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89 (2013) 59.
- [44] Z. Zhao, H. Zeng, J. Wu, L. Zhang, *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15 (2013) 608.
- [45] Environmental Protection Agency, EPA Method 3545, 1996, p. 9.
- [46] J.K. Bass, L. Ortega, C. Rosales, N.J. Petersen, R.M. Philen, *Rev Panam Salud Publ* 9 (2001) 138.

DEVELOPMENT OF A MULTIRESIDUE METHOD FOR ANALYSIS OF PESTICIDES IN SEDIMENTS BASED ON ISOTOPE DILUTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

Marianne Köck-Schulmeyer¹, Mar Olmos¹, Miren López de Alda¹, Damià Barceló^{1,2},

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. Detailed results of the recovery and precision studies carried out at three different spiking levels.

Pesticides	Linearity r^2	Recovery (n=6, 25 ng/g)			Recovery (n=6, 50 ng/g)			Recovery (n=6, 100 ng/g)		
		absolute (%)	relative (%)	RSD (%)	absolute (%)	relative (%)	RSD (%)	absolute (%)	relative (%)	RSD (%)
Deisopropylatrazine	0.9989	37.3	98.7	6.9	36.3	93.7	6.4	36.2	101.3	7.4
Bentazone	0.9992	1.5	102.0	32.1	1.5	105.3	21.3	2.1	95.3	6.2
MCPA	0.9997	0.4	144.7	142.3	0.2	110.0	76.4	0.4	187.3	104.2
2,4-D	0.9989	0.8	161.7	94.2	0.3	118.2	244.9	0.4	324.0	78.4
Mecoprop	0.9992	0.6	77.3	139.0	0.5	111.0	55.0	0.6	139.3	52.6
Desethylatrazine	0.9994	32.7	96.4	5.6	33.0	96.4	3.1	39.8	96.7	4.3
Dimethoate	0.9994	65.2	98.9	5.2	78.1	94.1	12.6	77.2	103.4	4.3
Cyanazine	0.9999	63.6	103.5	4.8	63.8	104.9	3.5	87.0	100.7	9.6
Simazine	0.9993	44.9	99.1	4.7	38.9	102.1	10.5	67.7	97.7	5.8
Malaonox	0.9991	67.3	81.1	12.1	63.8	66.5	12.2	54.7	95.2	8.7
Fenitrothion oxon	0.9989	59.6	91.5	14.1	39.0	102.4	16.5	52.0	99.7	7.0
Chlortoluron	0.9998	73.6	93.1	5.4	69.7	92.1	2.7	93.9	98.8	9.8
Isoproturon	0.9999	77.5	96.9	2.7	75.5	100.0	2.4	96.4	98.7	6.7
Atrazine	0.9999	60.9	102.4	5.6	54.5	111.5	5.3	79.0	101.0	8.6
Diuron	0.9991	70.1	95.4	7.4	66.1	98.9	2.6	92.0	97.4	7.6
Propanil	0.9991	78.8	130.4	12.7	107.5	97.2	6.7	101.3	87.1	10.3
Terbutylazine	0.9999	61.5	97.5	4.0	54.0	99.8	1.5	83.2	94.2	6.8
Liuron	0.9989	85.9	83.5	8.7	72.8	92.8	5.1	77.1	111.8	12.5
Molinate	0.9930	59.8	124.1	12.0	66.0	101.8	5.9	23.5	384.1	1.3
Malathion	0.9993	73.3	112.9	3.3	48.2	114.7	11.3	50.2	99.2	7.6
Metolachlor	0.9999	90.8	97.0	2.9	80.4	100.2	2.7	92.6	99.1	8.2
Alachlor	0.9994	92.5	96.8	3.6	80.4	102.6	2.8	91.1	98.7	7.4
Fenitrothion	0.9996	95.9	104.5	11.9	96.5	108.7	5.0	89.5	98.2	8.9
Chlorfenifphos	0.9998	88.8	96.2	4.3	80.0	96.0	2.6	83.7	97.8	7.9
Diazinon	0.9994	86.3	95.8	3.1	70.1	92.7	5.4	73.4	96.6	7.5
Chlorpyrifos	0.9989	80.6	96.0	5.1	59.1	100.6	4.2	59.9	92.7	7.9

2.2.3. Análisis de un cocktail de contaminantes orgánicos seleccionados, incluyendo varios plaguicidas, en aguas y sedimentos

Los siguientes métodos se desarrollaron en el marco del proyecto europeo LIFE “ENSAT: *Enhancement of Soil Aquifer Treatment*”, cuyo objetivo era evaluar la eficacia de los sistemas de recarga artificial de acuíferos para la eliminación de contaminantes orgánicos y su posible mejora a través de una capa reactiva en el fondo de la balsa de infiltración. Para ello, se seleccionaron una serie de compuestos representativos de diversas clases de microcontaminantes y se desarrollaron las metodologías que se presentan a continuación para su control a lo largo del proceso de recarga en distintas muestras de agua (continental superficial, intersticial y subterránea) y de sedimento. La selección de los compuestos se hizo en base a su abundancia en las aguas continentales superficiales y subterráneas, su tasa de eliminación en las plantas de tratamiento de agua y su relevancia en términos de riesgo para el medio ambiente y/o la salud humana, e incluyó:

- 4 plaguicidas (diuron y simazina, incluidos ambos en la Directiva de aguas superficiales 2008/105/CE), y los productos de transformación de la simazina hidroxisimazina y deisopropilatrazina,
- un estrógeno (estrona), y
- 6 fármacos (el analgésico ibuprofeno, el antiepiléptico carbamazepina y su producto de transformación carbamazepina epoxi, el regulador de lípidos gemfibrozilo, el β -bloqueante atenolol, y el antibiótico sulfametoxazol).

Las metodologías para su análisis se basaron, al igual que en el caso de los plaguicidas anteriores, en un método online SPE-LC-MS/MS para el análisis de agua y en PLE, SPE y LC-MS/MS para el análisis en sedimento. Esta última, sin embargo, sólo incluyó el análisis del diurón y la simazina (no sus productos de transformación), la estrona, y 5 de los fármacos anteriores (todos menos la carbamazepina epoxi). A continuación se presentan los métodos desarrollados y los parámetros de validación obtenidos para los plaguicidas incluidos en este estudio.

Patrones analíticos, soluciones y preparación de las muestras

Los patrones analíticos de los 4 plaguicidas y los 3 SILIS (diurón d6, simazina d10, DIA d5), todos de alta pureza (96-99,9%), eran de calidad Fluka o Dr. Ehrenstorfer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Todas las soluciones de patrones de plaguicidas y deuterados se prepararon en metanol y se guardaron a -20°C.

La curva de calibración para el análisis de plaguicidas en agua se preparó en agua

ultra pura (grado HPLC) el mismo día del análisis de las muestras. Para ello, se prepararon 9 soluciones patrón con la mezcla de los plaguicidas a concentraciones entre 0,1 ng/L y 1000 ng/L en agua por dilución 1:1000 de soluciones patrón de la misma mezcla de compuestos en metanol a concentraciones 1000 veces (entre 0,1 ng/mL y 1000 ng/mL). En el caso de los SILIS, se preparó una solución madre de todos los ellos a 200 ng/mL en metanol para su futura dilución en los diferentes puntos de la curva y en las muestras (100 μ L de Mezcla en 100 mL de agua o muestra).

Para el análisis de plaguicidas en sedimento, la curva de calibración se preparó a partir de las soluciones patrón en metanol anteriormente especificadas (con concentraciones de los plaguicidas entre 1 ng/mL y 1000 ng/mL). Para ello, se mezclaron 900 μ L de cada una de estas soluciones con 100 μ L de la mezcla de patrones internos a 1 ng/ μ L dando lugar a 7 soluciones patrón (1 mL cada una) con concentraciones variables de los plaguicidas entre 0,9 y 900 ng/mL y una concentración constante de los SILIS de 100 ng/mL.

La preparación de las muestras de agua superficial, intersticial y subterránea consistió en su filtración a través de filtros de nylon de 0,45 μ m de poro con la finalidad de retirar la mayor parte del material sólido particulado. Las muestras de sedimento se congelaron, se liofilizaron (-40 °C, 0,044 bar) y se tamizaron (< 125 μ m), y antes de su análisis las muestras se dejaron atemperar y se doparon con una solución de los SILIS a una concentración de 100 ng/g.

Análisis

Extracción de muestras de agua

La extracción de las muestras de agua se realizó mediante SPE online con un sistema similar al descrito previamente en el apartado 2.2.1, pero en condiciones ligeramente diferentes optimizadas para adaptarse al conjunto de los analitos objeto de estudio.

En este caso, la extracción online se realizó con cartuchos Oasis® HLB Prospekt™, previamente acondicionados con 1 mL de MeOH y 1 mL de H₂O. Tras la preconcentración de la muestra (5 mL), los cartuchos se lavaron con 1 mL de H₂O/MeOH (95:5 v/v) y los compuestos retenidos se eluyeron posteriormente hacia el sistema cromatográfico con la fase móvil. Las etapas de extracción siguen la misma secuencia presentada en la Figura 2-2 del apartado 2.2.1 de este capítulo.

Las diferencias más relevantes, por tanto, con respecto a la metodología desarrollada para los plaguicidas tienen que ver con el cartucho (se probaron los cartuchos PLRP-s pero los rendimientos obtenidos no fueron tan buenos como con los Oasis) y con la etapa de lavado (se probó H₂O (100%) y H₂O/MeOH (95:5 v/v) y se obtuvieron mejores

resultados con esta última solución).

Extracción y purificación de muestras de sedimento

Al igual que en el método presentado en el apartado 2.2.2 para plaguicidas, las muestras de sedimento se extrajeron mediante PLE, aunque de nuevo las condiciones variaron respecto de las anteriores para ajustarse al cocktail de compuestos a analizar en este caso. La extracción por PLE se realizó con 1g de sedimento, fortificado con 100 µL de la mezcla de SILIS a 1 ng/µL. El sedimento, previamente homogeneizado con hidromatrix, se introdujo en una celda de bajo volumen (11 mL) y se extrajo en las siguientes condiciones:

- disolvente de extracción: MeOH/H₂O (1:2)
- temperatura: 100 °C
- presión: 1500 psi
- precalentamiento: 5 min
- ciclos estáticos: 3 de 5min cada uno
- volumen de descarga: 100%
- purga: 60 seg

Los extractos obtenidos (aproximadamente 40 mL) se diluyeron con agua de grado HPLC hasta alcanzar un volumen de 500 mL y se purificaron mediante SPE utilizando cartuchos Oasis HLB (200mg, 6cc) previamente acondicionados con metanol (5 mL) y agua (5 mL), siguiendo una metodología previamente desarrollada en el grupo de trabajo para 43 fármacos. La elución de los analitos se llevó a cabo con 8 mL de MeOH y los extractos obtenidos se concentraron a sequedad con una corriente de nitrógeno para después reconstituirlos en 1mL de MeOH para su posterior análisis por LC-ESI-MS/MS.

En este caso, las diferencias con relación al método desarrollado para 26 plaguicidas son más numerosas e incluyen el volumen de muestra (que pasa de 5g a 1g), el disolvente de extracción (de acetona/diclorometano a metanol/agua), el disolvente de elución de los cartuchos (de metanol/diclorometano a metanol 100%), entre otros.

Análisis por LC-ESI-MS/MS

La separación cromatográfica se llevó a cabo en ambos casos (aguas y sedimentos) con una columna Purospher STAR RP-18e (125x2 mm, 5 µm) de Merck y con una fase móvil de MeOH/H₂O. La programación de la fase móvil fue: 5 min a 5% de MeOH, aumento lineal de MeOH alcanzando el 100% en 15 min, luego 5 min de MeOH 100%, vuelta a las condiciones iniciales en 2 min y acondicionado de la columna (5% de MeOH) durante 8 min totalizando 30 min de gradiente.

Los parámetros generales del espectrómetro de masas fueron similares a los adoptados para el análisis de tan sólo plaguicidas (ver Tabla 2-3). El volumen de inyección para el análisis de sedimentos fue de 5 μ L y para el análisis de aguas fue de 5 mL.

Tabla 2 - 3. Condiciones experimentales finales del MS/MS.

Parámetro	
Modo de ionización	ESI
Voltaje del capilar	2,11 kV (+/-)
Temperatura de la fuente	120 °C
Temperatura de desolvatación	340 °C
Voltaje del extractor	3 V
RF lens	0,1 V
Gas	N ₂

Los 4 plaguicidas analizados se ionizaron en modo positivo. La Tabla 2-4 presenta las condiciones óptimas de SRM para cada uno de los analitos estudiados y sus respectivos SILIS.

Tabla 2 - 4. Condiciones MS/MS seleccionadas para el análisis en modo SRM de los analitos objeto de estudio (en negrita las correspondientes a los plaguicidas).

Analitos	ESI	TR ⁽¹⁾ (min)	MM ⁽²⁾ (g/mol)	SRM1 (m/e)	SRM2 (m/e)	Cono SRM1/SRM2 (V)	EC ⁽³⁾ SRM1/SRM2 (eV)	IRI ⁽⁴⁾
SMZ	+	8,8	253,31	254>156	254>92	35/35	15/25	0,8
SMZ d4	+		257,30	258>160		30	15	
DIA	+	11,62	173,61	174 > 132	174 > 104	30/30	20/25	1,5
DIA d5	+		178,64	179 > 137		35	20	
Atenolol	+	11,63	266,34	267>145	267>190	45/45	25/20	1,5
Atenolol d7	+		273,38		274>145	35	25	
Simazina OH	+	11,85	183,21	184 > 114	184 > 97	40/40	20/20	3,0
Simazina d10	+		211,72	212 > 137		35	20	
Carbamazepina epoxi	+	12,94	252,27	253>180	253>236	35/35	30/10	1,7
Carbamazepina d10	+		246,33	247>204		35	20	

Tabla 2 - 4. (continuación).

Analitos	ESI	TR ⁽¹⁾ (min)	MM ⁽²⁾ (g/mol)	SRM1 (m/e)	SRM2 (m/e)	Cono SRM1/SRM2 (V)	EC ⁽³⁾ SRM1/SRM2 (eV)	IRI ⁽⁴⁾
Carbamazepina	+	14,03	236,26	237>194	237>192	45/45	20/20	4,0
Carbamazepina d10	+		246,33	247>204		35	20	
Simazina	+	14,07	201,66	202 > 132	202 > 124	30/30	20/20	1,1
Simazina d10	+		211,72	212 > 137		35	20	
Diurón	+	14,96	233,10	233 > 72	235 > 72	35/35	15/15	1,6
Diurón d6	+		239,13	239 > 78		35	15	
Estrona	-	15,42	270,37	269>145	269>143	60/60	40/60	4,2
Estrona d4	-		274,39	273>147		60	40	
Ibuprofeno	-	15,36	206,27	205>161	205>205	30/5	5/5	2,5
Ibuprofeno d3	-		209,30	208>164		25	10	
Gemfibrozilo	-	16,57	250,35	249>121	249>127	25/25	15/10	12,8
Gemfibrozilo d6	-		256,37	255>121		25	20	

(1) Tiempo de retención; (2) Masa molecular; (3) Energía de colisión; (4) Intensidad relativa de iones (SRM1/SRM2); SMZ: sulfametoxazol; DIA: deisopropilatrazina.

2.3. Discusión de los resultados

En la Figura 2-5 se observan los cromatogramas de los analitos objeto de estudio tras su análisis por online SPE-LC-MS/MS en 5 mL de agua de grado HPLC fortificada a 100 ng/L.

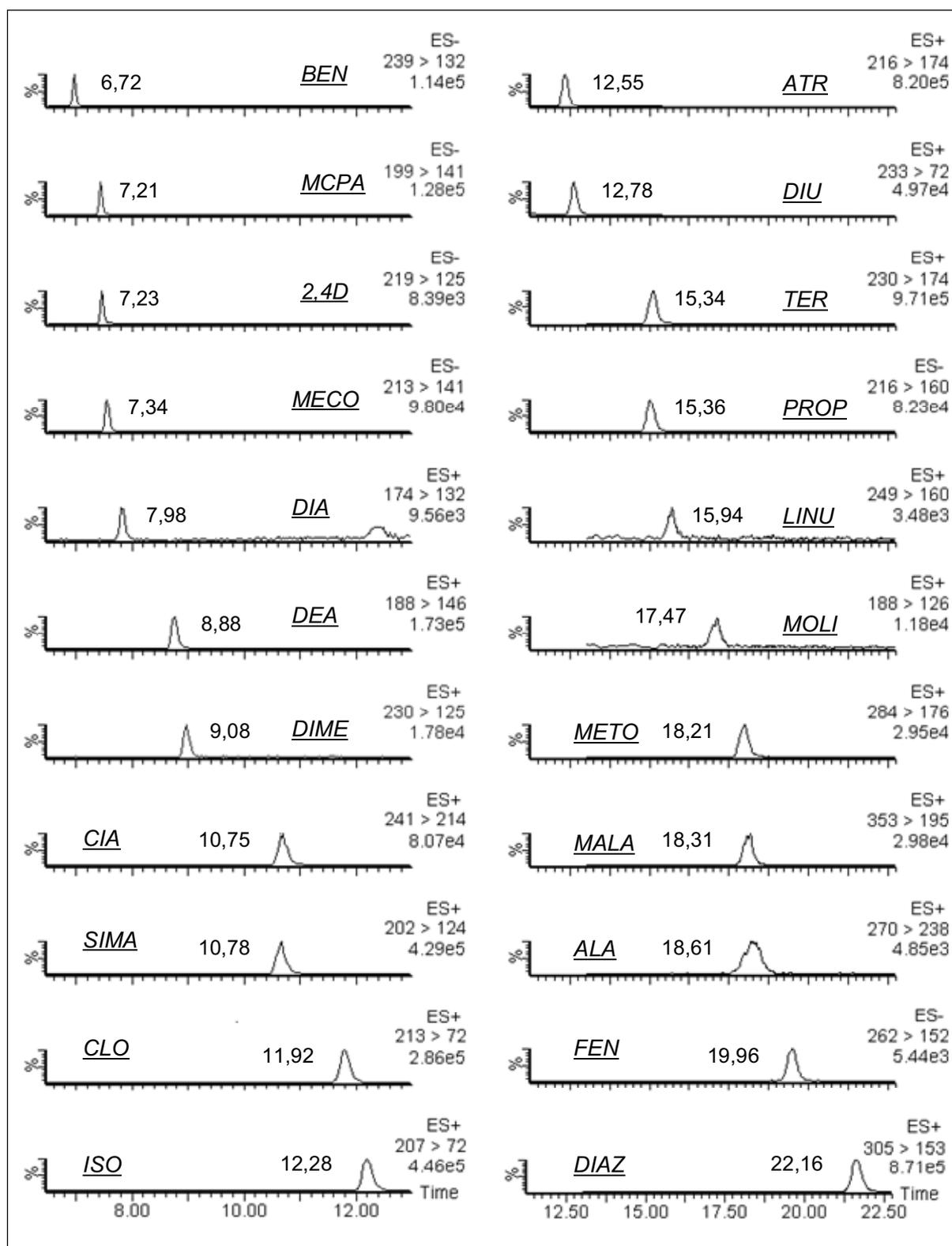


Figura 2 - 5. Cromatogramas correspondientes al análisis por online SPE-LC-MS/MS de 5 mL de agua de grado HPLC fortificada con 100 ng/L de cada analito.

2.3.1. Fragmentación

En relación a la fragmentación de los analitos y de sus respectivos SILIS, ésta puede darse de muchas formas según la estructura de la molécula y de las condiciones del espectrómetro de masas. Los fragmentos a monitorizar para cada analito se escogieron en base a su abundancia, tamaño y confianza. Los fragmentos grandes suelen ser más específicos de las moléculas, lo que significa mayor confianza, sin embargo, en muchos casos las intensidades de estos fragmentos son muy bajas y no permiten su detección a niveles aceptables. En esos casos se escogen fragmentos más pequeños, generalmente con m/e por debajo de los 100, que suelen ser muy abundantes, permitiendo su detección a niveles bajos.

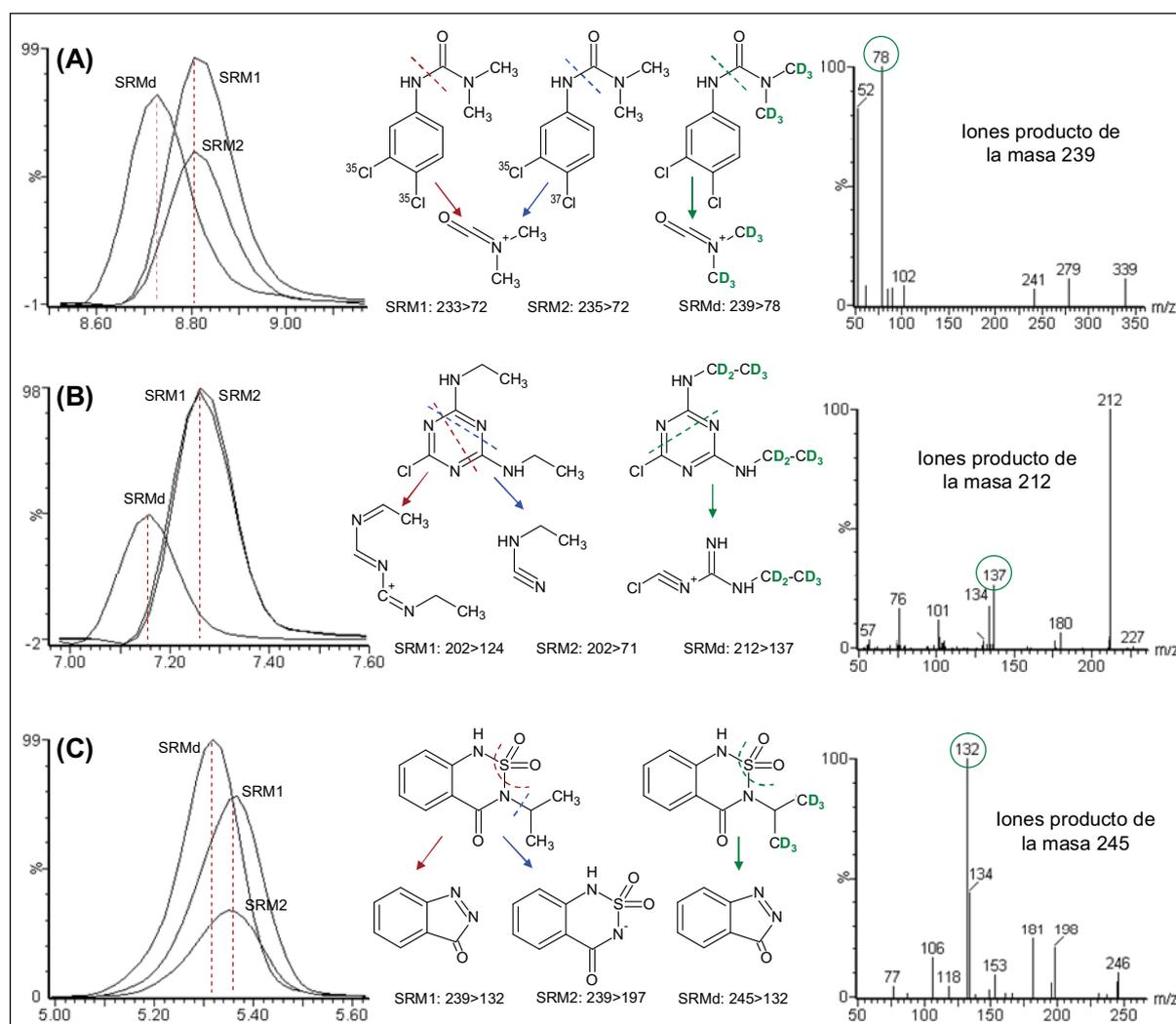


Figura 2 - 6. Cromatogramas de las transiciones, fragmentación y espectros de los herbicidas diurón (A), simazina (B) y bentazona (C) y de sus respectivos IS en una solución patrón con la mezcla de compuestos a 1 ng/ μ L y de los SILIS a 0,1 ng/ μ L. SRMd: SRM del compuesto deuterado.

En otros casos la fragmentación es muy difícil, generando tan sólo un único fragmento. En estos casos, si se trata de compuestos clorados o bromados, el uso del mismo fragmento pero diferenciando entre los dos isótopos más abundantes (^{35}Cl y ^{37}Cl , ^{79}Br y ^{81}Br) es una solución aceptable. Es el caso del herbicida diurón, para el que se usaron los dos isótopos más abundantes para cuantificar y confirmar su presencia (Figura 2-6a).

En el caso de los SILIS, los fragmentos generados pueden mantener todos los deuterios (ejemplo, diurón, Figura 2-6a), pueden perderlos parcialmente (ejemplo, simazina, Figura 2-6b) o pueden perderlos completamente dando lugar a fragmentos muchas veces idénticos a los generados por los respectivos analitos (ejemplo, bentazona, Figura 2-6c). El resumen de la propuesta de fragmentación de todos los analitos se muestra en la Tabla 2-5.

Tabla 2 - 5. Estructuras de las propuestas de fragmentación de los analitos (SRM1, SRM2) y de sus respectivos compuestos deuterados (SRMd).

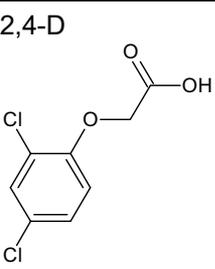
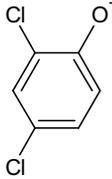
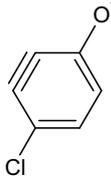
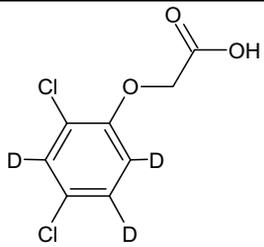
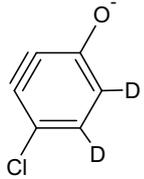
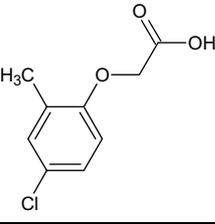
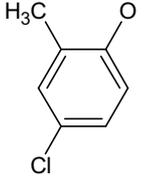
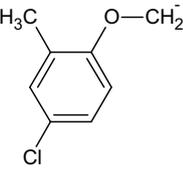
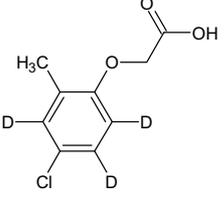
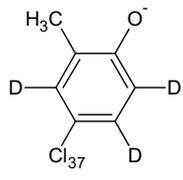
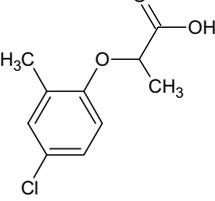
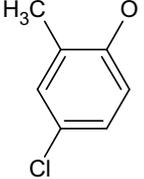
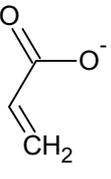
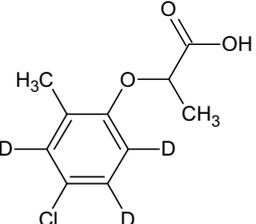
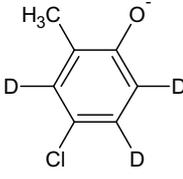
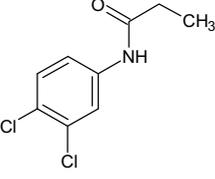
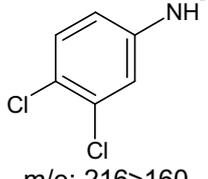
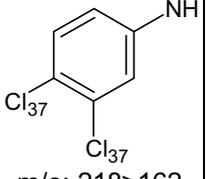
Plaguicida	SRM1	SRM2	Correspondiente deuterado	SRMd
HERBICIDAS ÁCIDOS				
2,4-D 	 m/e: 219>161	 m/e: 219>125		 m/e: 224>127
MCPA 	 m/e: 199>141	 m/e: 199>155		 m/e: 204>146
Mecoprop (MECO) 	 m/e: 213>141	 m/e: 213>71		 m/e: 218>146
ANILIDA				
Propanil (PROP) 	 m/e: 216>160	 m/e: 218>162		

Tabla 2 - 5. (continuación).

Plaguicida	SRM1	SRM2	Correspondiente deuterado	SRMd
BENZOTIAZINA				
Bentazona (BEN) 	 m/e: 239>132	 m/e: 239>197		 m/e: 245>132
CLOROACETANILIDAS				
Alacloro (ALA) 	 m/e: 270>238	 m/e: 270>162		 m/e: 283>251
Metolaclo (METO) 	 m/e: 284,8>176	 m/e: 284,8>73		 m/e: 290>258
FENILUREAS				
Clortolurón (CLO) 	 m/e: 213>72	 m/e: 213>140		 m/e: 219>78
Diurón (DIU) 	 m/e: 233>72	 (del diurón Cl ₃₇) m/e: 235>72		 m/e: 239>78
Isoproturón (ISO) 	 m/e: 207>72	 m/e: 207>165		 m/e: 213>171

Tabla 2 - 5. (continuación).

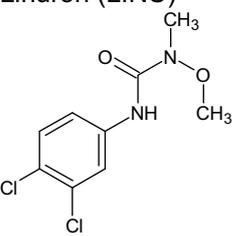
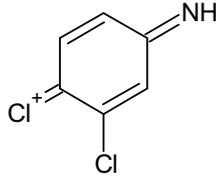
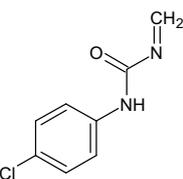
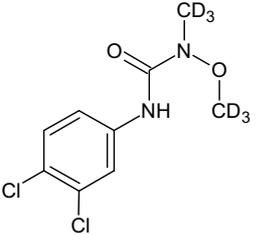
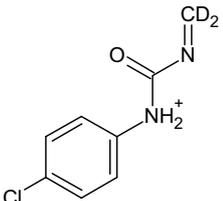
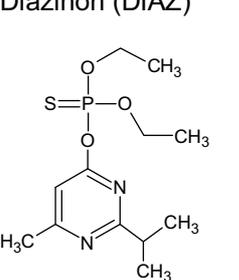
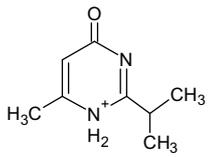
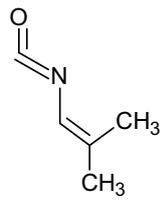
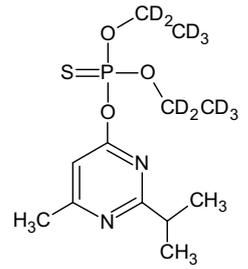
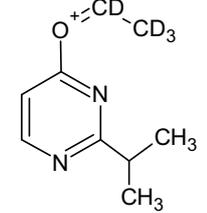
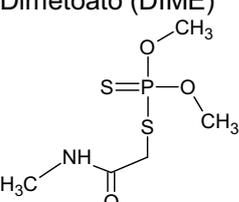
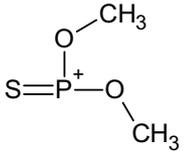
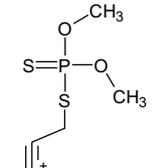
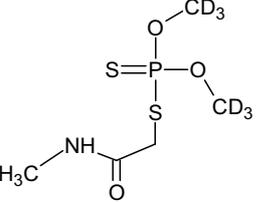
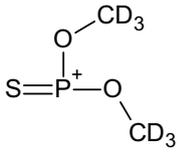
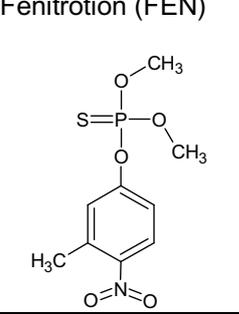
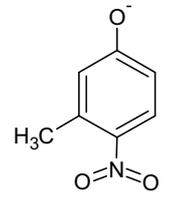
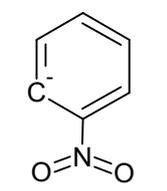
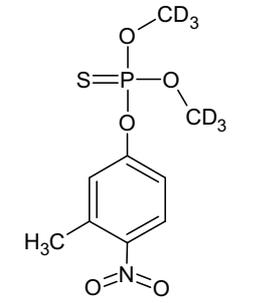
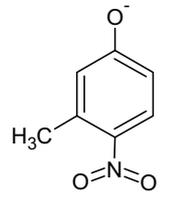
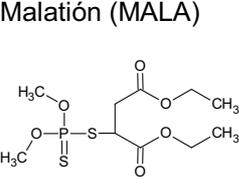
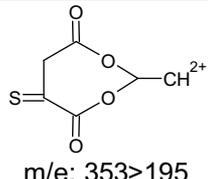
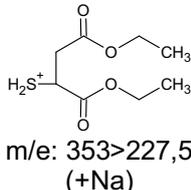
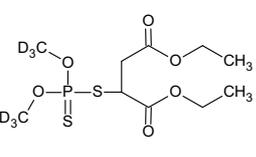
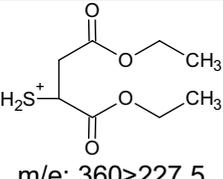
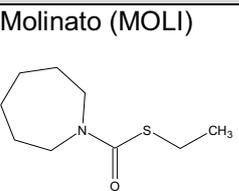
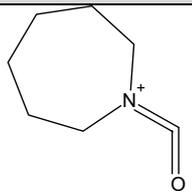
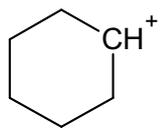
Plaguicida	SRM1	SRM2	Correspondiente deuterado	SRMd
<p>Linurón (LINU)</p> 	 <p>m/e: 249>160</p>	 <p>m/e: 249>182</p>		 <p>m/e: 255>185</p>
ORGANOFOSFORADOS				
<p>Diazinón (DIAZ)</p> 	 <p>m/e: 305>153</p>	 <p>m/e: 305>97</p>		 <p>m/e: 315>170</p>
<p>Dimetoato (DIME)</p> 	 <p>m/e: 230>125</p>	 <p>m/e: 230>199</p>		 <p>m/e: 236>131</p>
<p>Fenitrotión (FEN)</p> 	 <p>m/e: 262>152</p>	 <p>m/e: 262>122</p>		 <p>m/e: 265>152</p>
<p>Malatión (MALA)</p> 	 <p>m/e: 353>195 (+Na)</p>	 <p>m/e: 353>227,5 (+Na)</p>		 <p>m/e: 360>227,5 (+Na)</p>
TIOCARBAMATO				
<p>Molinato (MOLI)</p> 	 <p>m/e: 188>126</p>	 <p>m/e: 188>83</p>		

Tabla 2 - 5. (continuación).

Plaguicida	SRM1	SRM2	Correspondiente deuterado	SRMd
TRIAZINAS				
Atrazina (ATR) 	 m/e: 216>174	 m/e: 216>132	 m/e: 221>179	 m/e: 221>179
Cianazina (CIA) 	 m/e: 241>214	 m/e: 241>174	 m/e: 246>219	 m/e: 246>219
Deisopropilatrazina (DIA) 	 m/e: 174>132	 m/e: 174>104	 m/e: 179>137	 m/e: 179>137
Desetilatrazina (DEA) 	 m/e: 188>146.5	 m/e: 188>79	 m/e: 194>146.5	 m/e: 194>146.5
Simazina (SIMA) 	 m/e: 202>124	 m/e: 202>71	 m/e: 212>137	 m/e: 212>137
Terbutilazina (TER) 	 m/e: 230>174	 m/e: 230>96	 m/e: 235>179	 m/e: 235>179

Obs: Los átomos de cloro son todos ³⁵Cl, a no ser que se cite ³⁷Cl.

La intensidad relativa de iones (IRI) representa la diferencia de señal entre las transiciones SRM1 y SRM2 (área de SRM1 / área de SRM2). IRIs pequeñas indican dos

transiciones con intensidades similares. Sin embargo, hay casos en los que no se puede conseguir una segunda transición con intensidad similar a la correspondiente SRM1. Ello se debe a los problemas de fragmentación o a problemas de señal cruzada, lo que limita la confirmación de la presencia de los analitos y aumenta los límites de determinación. Es el caso del clortolurón (IRI = 30) que, tras su colisión, se fragmenta en el grupo urea, dando origen a tan sólo dos fragmentos: una anilina (m/e 140) y una amida (m/e 72). A pesar de la baja señal de la anilina, se escogió este fragmento como SRM2 por la falta de otro fragmento más abundante, opción similar utilizada también por otros investigadores (Borba da Cunha et al. 2004; Jansson et al. 2010).

Observando la tabla resumen de fragmentación de todos los analitos y analizando ésta por grupos de compuestos, se detectaron varios patrones comunes de fragmentación.

Los herbicidas ácidos estudiados pierden el grupo ácido (-COOH) u otros grupos funcionales liberando el grupo fenol, tal y como se puede observar en la Tabla 2-5 para 7 de las SRMs correspondientes a los compuestos 2,4D, MCPA, mecoprop y sus correspondientes SILIS. En el caso de fragmentos pequeños (m/e < 100), suelen ser los propios grupos de salida los fragmentos escogidos para el análisis (por ejemplo, el de m/e 71 en el caso del mecoprop).

Las anilidas estudiadas en esta Tesis Doctoral (propanil, alacloro y metolacloro) se fragmentan manteniendo en algunos casos su función anilida tras la fragmentación (alacloro), generando anilinas (4 SRMs), y/o perdiendo grupos etoxi (-O₂CH₃) o metoxi (-OCH₃) (5 SRMs) como en el caso del alacloro y el metolacloro, respectivamente, y los grupos de salida en el caso de moléculas pequeñas como la SRM2 del metolacloro (m/e 73) pueden ser los iones producto seleccionados.

En las fenilureas estudiadas la fragmentación se da principalmente en la función urea dando origen a anilinas y amidas. El clortolurón y el linurón dan lugar a fragmentos de anilinas, mientras que masas menores (m/e 72, 78) corresponden al grupo amida de salida (-CONH(CH₃)₂). En otros casos los fragmentos se formaron por la pérdida del grupo isopropil (isoproturón), metoxi (linurón) o de cloro (linurón).

Los 4 organofosforados estudiados se caracterizan por la presencia del grupo tiofosfato en la molécula. La fragmentación de estos 4 compuestos se da principalmente en este grupo (9 SRMs), siendo que en varios casos (3 SRMs) el propio grupo tiofosfato es el fragmento, o parte de él, de análisis (dimetoato).

En el caso de las 6 triazinas estudiadas, los anillos aromáticos presentan un cloro y dos grupos amino sustituidos con radicales (R1 y R2) que pueden ser iguales (simazina) o no. La fragmentación de estos herbicidas se da principalmente por la salida de uno de estos radicales (7 SRMs), por la salida de cianuro (-CN), como en el caso de la cianazina, o por la fragmentación del anillo aromático. Esta última fragmentación consiste frecuentemente en la

ruptura del anillo y en la pérdida de uno de los grupos amino. Es el caso de la m/e 132 (atrazina y DIA), m/e 104 (DIA) y, en el caso de los SILIS, de la m/e 137 (DIA-d5 y simazina-d5). Si durante la ruptura del anillo se pierde el cloro y se mantienen los dos grupos amino, se tiene la SRM1 de la simazina (m/e 124). También se forman fragmentos más pequeños (m/e 71, 79 y 96).

La bentazona y el molinato presentan fragmentaciones en algunos casos acompañadas de la reordenación de la molécula. En otros casos las transiciones seleccionadas se basan en el registro de aductos, como el aducto con sodio del malatió, y en la distinción entre los dos isótopos estables del cloro en las moléculas (^{35}Cl y ^{37}Cl), como en el caso del diurón y del propanil, confirmados analizando la presencia y abundancia relativa de las dos formas isotópicas.

Los problemas de señal cruzada (plaguicidas dando señal positiva en transiciones de deuterados y viceversa) se observaron en varios casos, lo que llevó a descartar una serie de transiciones intensas como la 202>132 (simazina), la 230>132 (terbutilazina), la 284>252 (metolacloro) y la 305>169 (diazinón). Teniendo en cuenta que todas las muestras se fortifican con una solución con la mezcla de deuterados antes de su análisis, es de suma importancia confiar en que la señal del analito provenga efectivamente y exclusivamente del analito, así como en que la señal del correspondiente deuterado provenga también exclusivamente de la mezcla de deuterados. De este modo, se reducen las posibilidades de dar falsos positivos. El caso más interesante fue el del herbicida MCPA. Como se observa en la Figura 2-7, el análisis de una mezcla de plaguicidas dio señal positiva no sólo a tres transiciones del MCPA, como era de esperar, sino también a la principal transición del equivalente deuterado (202>144). Análogamente, el análisis de una mezcla de deuterados dio señal positiva en las dos transiciones del MCPA deuterado, como era de esperar, pero también en la transición del MCPA 201>143, que se corresponde con la seleccionada para la cuantificación de este compuesto pero teniendo en cuenta el isótopo 37 del cloro, en lugar del 35. Esta situación provocó la exclusión de la transición 202>144 para la caracterización del MCPA d3 (SRMd), la exclusión de la transición 201>143 como posible transición de confirmación del MCPA (SRM2), y la selección de la transición 204>146 para la caracterización del MCPA d3.

Esta decisión conduce a la obtención de un método más fiable y la reducción de posibles falsos positivos, pero también a la obtención de una sensibilidad levemente más baja, por tratarse de un fragmento con señal 2/3 más baja que la del correspondiente deuterado con Cl_{35} (202>144). Cabe decir que también se probaron otras transiciones para la caracterización del MCPA d3, pero no dieron señales satisfactorias (202>158 y 202>175).

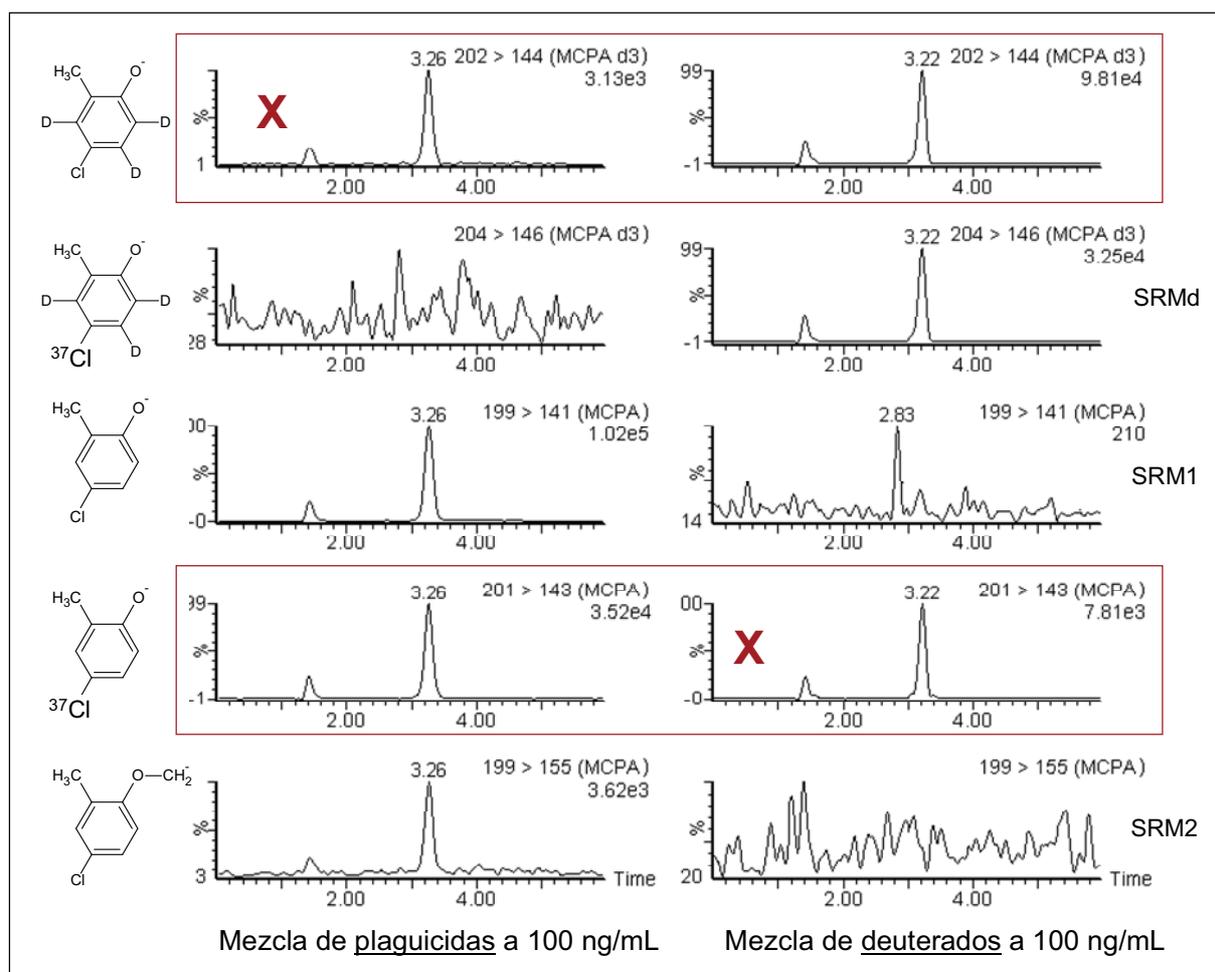


Figura 2 - 7. Transiciones del MCPA. Respuesta de cinco transiciones (2 del MCPA d3 y 3 del MCPA) durante el análisis de una mezcla de plaguicidas y una mezcla de deuterados, respectivamente.

El motivo por el cual este cruce de señal ocurre no está del todo claro, sin embargo hay situaciones que deben contemplarse a la hora de razonar al respecto:

- Observando los certificados gravimétricos de los patrones deuterados, se comprueba que la pureza química de los SILIS no suele llegar al 100% y la pureza isotópica suele estar por debajo de la pureza química. Eso significa que hay un porcentaje (generalmente $< 1,5\%$) de compuesto no deuterado en el patrón, lo que puede justificar que los SILIS den señal positiva a transiciones de sus análogos no deuterados. La situación inversa también es posible, sin embargo mucho menos probable, debido a que la abundancia isotópica del deuterio en la naturaleza no supera el 0,015%.
- Además de lo anterior, en presencia de agua, el intercambio de una parte de los átomos de deuterio por átomos de hidrógeno puede ser otro motivo por el cual transiciones correspondientes a analitos den señal positiva al analizar los

correspondientes deuterados. Normalmente, los átomos de deuterio que están unidos covalentemente a átomos de carbono no se cambian con facilidad, sin embargo varios autores han descrito intercambio de deuterio con el correspondiente analito (Chavez-Eng et al. 2002; Stokvis et al. 2005). Por ese motivo, SILIS marcados con ^{13}C , ^{15}N o ^{17}O pueden ser más apropiados que aquellos marcados con deuterio (Stokvis et al. 2005).

- La ionización por ESI suele generar $[\text{M}+\text{H}]^+$ o $[\text{M}-\text{H}]^-$, lo que puede causar confusión en el momento de analizar la m/e de compuestos con masas moleculares cercanas, diferenciándose en 3 deuterios o menos, y/o con abundancias isotópicas ($[\text{M}+2]$, $[\text{M}+4]$) significativas (^{37}Cl , ^{81}Br). Tal y como comenta Ríos (2007) en su tesis doctoral, los deuterados D3 o inferiores producen con frecuencia los mismos fragmentos que su análogo sin deuterios, por lo que sugiere el análisis de cruce de señal, tal y como se ha realizado en esta Tesis Doctoral, antes de la selección definitiva de las transiciones.

2.3.2. Análisis

En el caso del análisis de los 22 plaguicidas en agua, las diferencias encontradas al comparar el tiempo de retención de los analitos inyectados directamente en el sistema LC-MS/MS (5 μL de mezcla a 100 ng/mL) con los obtenidos tras haber pasado previamente por un cartucho de extracción on-line (5 mL de agua con Mezcla a 100 ng/L), se deben al tiempo de residencia de estos compuestos en el cartucho de extracción y al aumento del trayecto de transporte de los analitos hasta llegar a la columna cromatográfica (ver Figura 2-8). Aunque el trayecto de transporte hacia la columna analítica es la misma para todos los compuestos, la variación para cada compuesto es distinta en función de la interacción de cada analito con el cartucho y con la fase móvil (entre 1,5 min – mecoprop – y 5,7 min – fenitrotión).

Como era de esperar, los analitos con menor K_{ow} (2,4-D, MCPA, bentazona y mecoprop) son los que salen primero, justificado por su gran afinidad por el agua, principal componente de la fase móvil en los primeros minutos del gradiente. El herbicida fenitrotión sufre un retraso de más de 5 min lo que está de acuerdo con su mayor K_{ow} (> 3).

Para el análisis del cocktail de plaguicidas y otros contaminantes orgánicos (apartado 2.2.3) se utilizaron en total tres fases móviles: ACN/ H_2O , MeOH/ H_2O y MeOH/ H_2O con 0,1% de ácido fórmico, siendo la fase MeOH/ H_2O en condiciones neutras la más idónea, debido a que las condiciones ácidas favorecían la señal de un fármaco analizado en modo ESI(+) pero afectaba muy negativamente a los otros 3 fármacos, analizados en ESI(-).

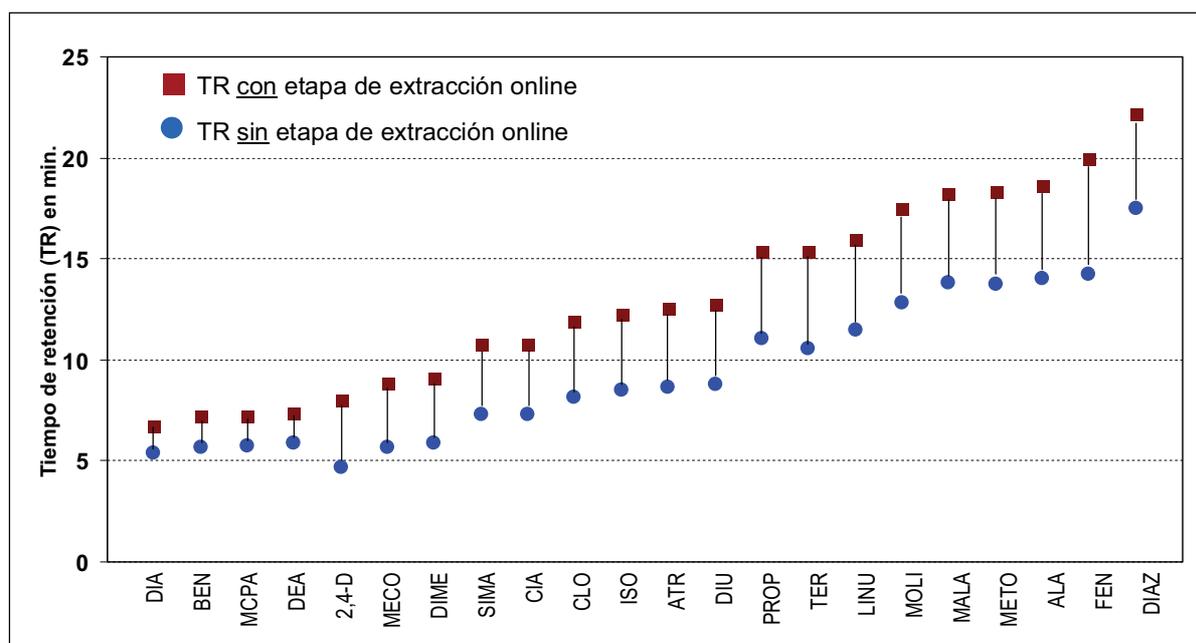


Figura 2 - 8. Tiempo de retención (TR) de los analitos objeto de estudio.

A su vez, escogida la composición de la fase móvil en base a la mayor o menor señal obtenida para los distintos compuestos, se optimizó el gradiente para así conseguir la mejor separación cromatográfica de los analitos. Se probaron 11 curvas de gradiente diferentes, tal y como muestra la Figura 2-9. Las cinco primeras curvas presentan un comportamiento de función logarítmica donde la concentración de MeOH sube rápidamente al principio, mientras que las curvas 7 a 11 presentan un comportamiento de función exponencial, donde la concentración de MeOH sube muy lentamente al principio para aumentar rápidamente al final. Durante las pruebas, la curva 10 mostró ser la más apropiada al analizar la elución del analito más problemático, una sulfamida (con tiempo de retención de 8,8 min.); sin embargo, la mejor separación se obtuvo aplicando la curva lineal (curva 6), razón por la cual se escogió esta curva para el análisis del cocktail de contaminantes por LC-ESI-MS/MS.

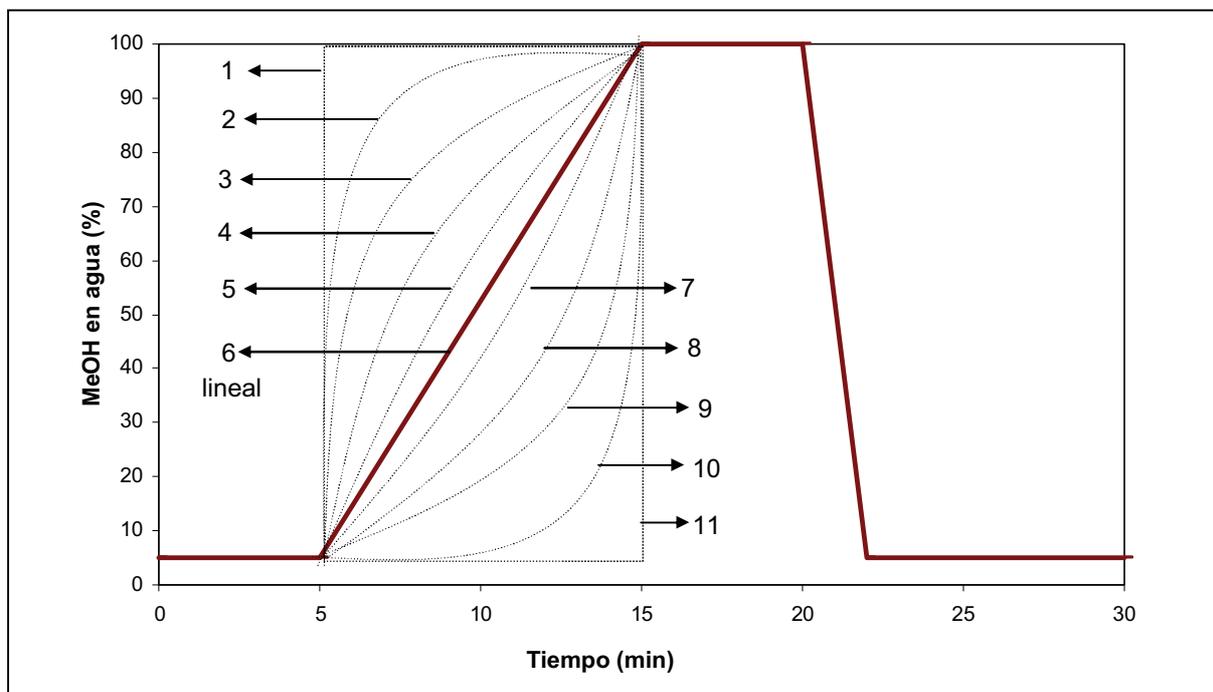


Figura 2 - 9. Gradientes de fase móvil probados para el análisis del cocktail de contaminantes orgánicos.

El método de confirmación de la presencia de los analitos en las muestras, es decir, “el método que proporciona información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés” (Decisión 2002/657/CE), se llevó a cabo conforme a los siguientes parámetros:

- TR: La relación entre el tiempo de retención (TR) del analito y el del patrón interno corresponderá a la de la solución de calibración, con un margen de tolerancia de $\pm 2,5 \%$.
- IRI: El margen de tolerancia de la variación de la IRI en una muestra con respecto al patrón no debe superar el 20% (IRI: 1-2), 25% (IRI: 2-5), 30% (IRI: 5-10) o el 50% (IRI: >10).
- La detección de los analitos es positiva si está por encima del límite de detección de la SRM1 (LOD1) y por debajo del límite de determinación (Ldet).
- La cuantificación de los analitos es posible si su señal es superior al Ldet del método.

2.3.3. Validación

La validación de un método analítico consiste en la confirmación mediante examen y la provisión de evidencias objetivas de que el método desarrollado cumple los requisitos particulares para un uso específico propuesto. En este caso específico, la validación

consistió en dar evidencias objetivas de que el método se puede aplicar al análisis de los plaguicidas y productos de transformación seleccionados en muestras de agua y sedimento de forma fiable y a niveles de ng/L y ng/g, respectivamente.

Siguiendo lo establecido por diversas legislaciones y guías (Decisión 2002/657/CE, Directiva 2009/90/CE, SANCO 2011), el proceso de validación se llevó a cabo considerando los siguientes aspectos:

Recuperación

Es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el proceso analítico. Consiste en la exactitud (R, de Recuperación) y en la repetibilidad (CV%, de Coeficiente de Variación) del método. El porcentaje de recuperación absoluta (RA) resulta de la comparación de las áreas de los picos obtenidos en el análisis de una solución producto de la extracción de una muestra con las áreas obtenidas por otra solución que contenga los mismos analitos sin haber pasado por una etapa de extracción. El porcentaje de recuperación relativa (RR) resulta de la comparación de la recuperación del analito con la recuperación de su respectivo SILIS.

Límites

El límite de detección (LOD, del inglés *limit of detection*) corresponde a la concentración del analito que produce una respuesta con respecto a un blanco en una proporción de 3 a 1. En el caso del límite de cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantification*) la proporción es de 10 a 1. Sin embargo, hay situaciones (ver Figura 2-10) en que un analito puede presentar una concentración superior al LOQ de la SRM1 (LOQ1), pero debido a la baja señal de la SRM2 (alta IRI) no se puede confirmar su presencia. En estos casos, la concentración cuantificable no sólo debe ser superior al LOQ1, sino que debe poder confirmarse correctamente con la SRM2, es decir, los valores también deben ser superiores al límite de detección de la SRM2 (LOD2) (Figura 2-10b). A esta condición para la cuantificación se le atribuyó el término de límite de determinación (Ldet), que consiste en un límite de cuantificación con garantías de confirmación por la segunda transición.

Para la validación del método de análisis de 22 plaguicidas en aguas, el estudio se realizó a dos concentraciones (100 y 500 ng/L), 6 a cada nivel y, con 5 matrices distintas: agua de grado HPLC, agua subterránea, agua superficial, agua residual tratada y agua residual no tratada. El porcentaje de RA resultó de la comparación de las áreas de los picos obtenidos en el análisis online del agua con las áreas obtenidas en la inyección directa de 5 µL de patrón (100 ó 500 ng/mL) en metanol.

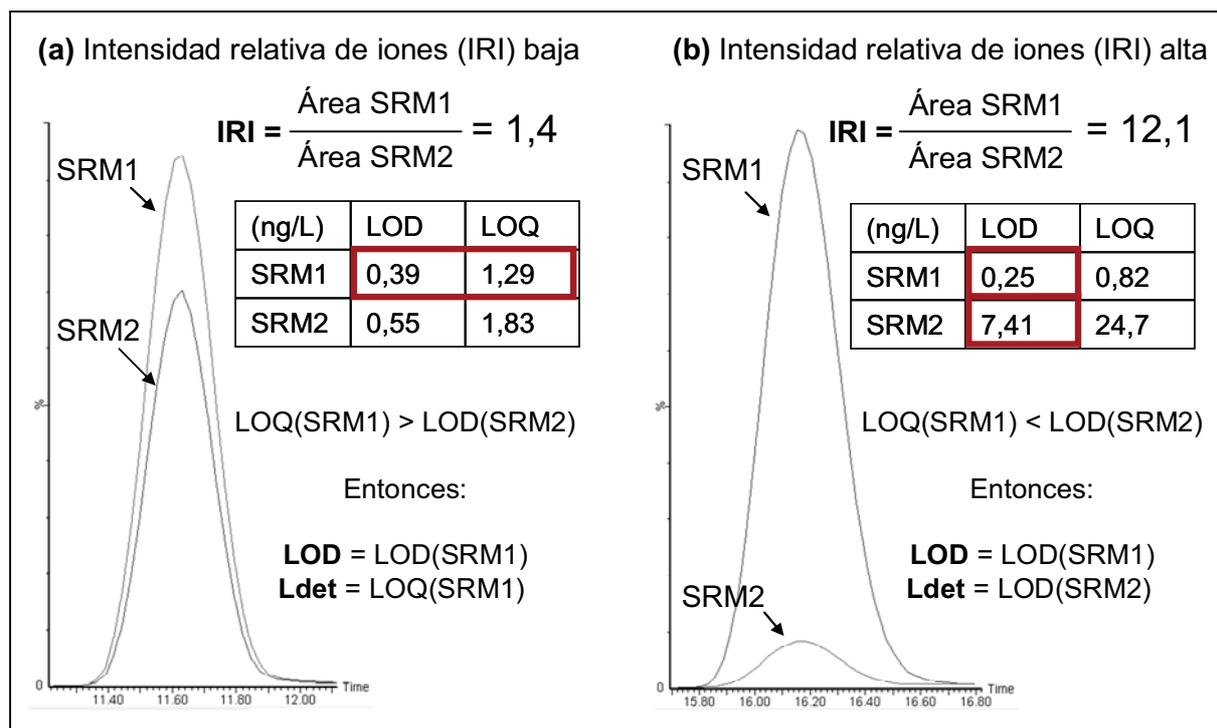


Figura 2 - 10. Ejemplo de compuestos con IRIs muy distintas (baja (a) y alta (b)), y su efecto en el cálculo del límite de determinación (Ldet) del método.

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo a distintos niveles teniendo en cuenta el tipo de matriz y la legislación existente en cada caso. En las aguas subterráneas, donde la legislación establece una concentración máxima para los plaguicidas individuales de 100 ng/L (Directiva 2006/118/EC), y en las aguas superficiales, donde las concentraciones máximas fijadas varían mucho de unos compuestos a otros (por ejemplo, 100 ng/L para el clorpirifos y 4000 ng/L para la simazina - Directiva 2008/105/CE), los estudios de recuperación se realizaron al nivel más bajo, de 100 ng/L, que coincide, a su vez, con el establecido para las aguas destinadas al consumo humano (Directive 98/83/EC). En el caso de las aguas residuales, donde las concentraciones de residuos de plaguicidas son mucho más altas, con frecuencia entre 5 y 10 veces superiores a las detectadas en aguas subterráneas, se escogió un nivel 5 veces por encima del escogido para validar los métodos para aguas subterráneas y superficiales, es decir, 500 ng/L.

La Figura 2-11 muestra la RA y la RR obtenida para cada analito en el estudio de recuperación llevado a cabo para los 22 plaguicidas en agua HPLC. Las recuperaciones absolutas variaron bastante, de 15,3% (deisopropilatriazina) a 181,4% (dimetoato), sin embargo, las recuperaciones relativas a los respectivos patrones internos se mantuvieron entre el 80 y el 120%.

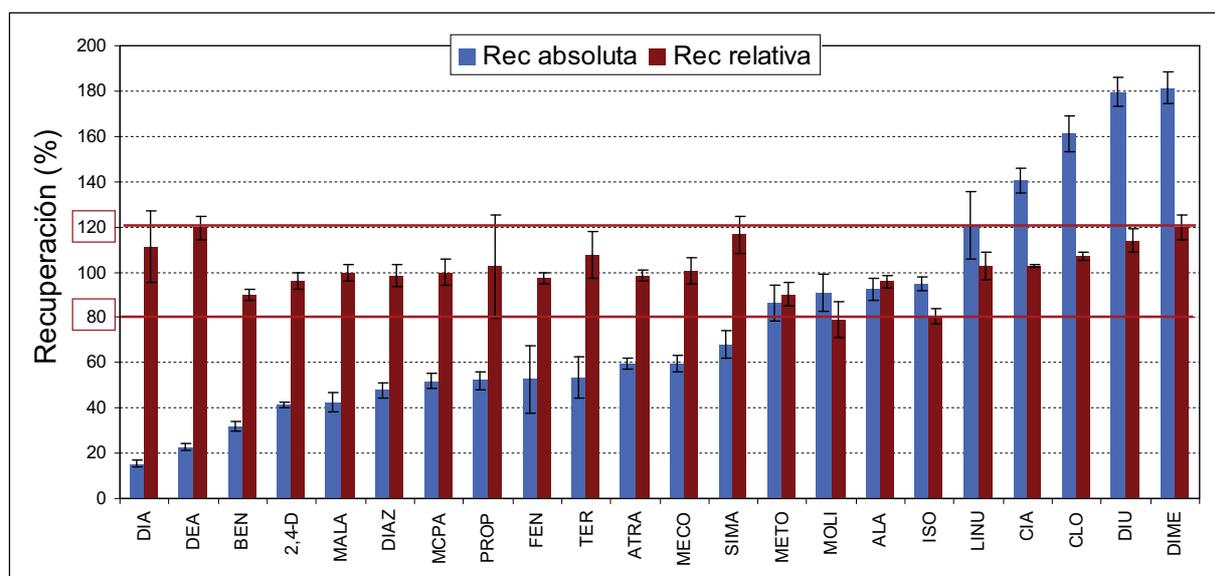


Figura 2 - 11. Recuperación absoluta y recuperación relativa obtenida para los distintos plaguicidas (ordenados en base a su tiempo de retención cromatográfico) en agua HPLC (nivel de fortificación = 500 ng/L, n = 5).

Al usar otras matrices, las recuperaciones absolutas mantuvieron el mismo perfil, con pequeñas variaciones. Sin embargo, en todos los casos la RR se mostró aceptable, al igual que su respectivo CV. La Tabla 2-6 recopila, junto con los resultados de linealidad de la curva de calibrado (r^2), las RRs, con sus respectivos CVs, obtenidas en las diferentes matrices acuosas. Es importante resaltar que el molinato y el propanil no presentan RR necesariamente entre el 80 y el 120% porque sus respectivos SILIS no son sus análogos deuterados.

Como se observa en la tabla, se obtuvieron buenos parámetros de validación (RR: 80-120%, CV < 30%) en matrices con bajo o nulo contenido de materia orgánica (agua HPLC, agua subterránea y agua continental superficial) y, estos empeoraron en algunos casos en aguas residuales debido a la complejidad de la matriz, aunque el CV siempre se mantuvo por debajo del 30% (con excepción de la deisopropilatrastina en muestras de agua residual no tratada).

Como es evidente, la matriz juega un papel muy importante sobre los parámetros de validación de los métodos. El efecto matriz puede manifestarse por medio de un aumento de la señal o de una supresión de la misma. La Figura 2-12 muestra un ejemplo del procedimiento de cálculo del efecto matriz llevado a cabo para cada analito y para las matrices más afectadas por ese efecto como son las aguas residuales tratadas y no tratadas.

Tabla 2 - 6. Linealidad y resultados (recuperación relativa y coeficiente de variación) obtenidos en los estudios de recuperación (n=6) llevados a cabo en las distintas matrices de agua.

Plaguicida	Linealidad r^2	Agua HPLC (100 ng/L)		Agua HPLC (500 ng/L)		Agua subterránea (100 ng/L)		Agua superficial (100 ng/L)		ART (500 ng/L)		ARNT (500 ng/L)	
		RR (%)	CV (%)	RR (%)	CV (%)	RR (%)	CV (%)	RR (%)	CV (%)	RR (%)	CV (%)	RR (%)	CV (%)
2,4-D	0.9991	107.6	5.2	96.2	3.8	91.5	18.4	100.8	12.8	114.8	7.8	140.1	22.7
Alacoloro	0.9991	97.9	8.6	95.9	2.8	100.6	6.2	100.0	9.2	93.7	3.8	66.9	9.7
Atrazina	0.9998	101.4	3.8	98.3	2.4	100.9	2.3	101.9	7.3	96.7	0.9	75.1	8.2
Bentazona	0.9996	103.6	7.3	89.9	2.6	107.5	8.2	90.1	14.7	106.9	2.9	118.1	6.2
Cianazina	0.9992	102.1	2.9	102.9	0.4	97.8	4.2	101.6	10.3	98.5	5.7	91.3	4.7
Ciortolurón	1.0000	103.4	1.0	106.9	1.5	104.0	1.7	107.0	8.8	104.3	2.1	69.9	3.0
Deisopropilatrizona	0.9927	109.1	18.3	111.3	14.1	102.0	22.1	86.7	12.9	193.3	12.7	96.4	87.0
Desetilatrizona	0.9993	111.5	4.0	119.5	4.1	115.8	4.2	91.5	19.3	117.9	5.6	119.6	3.0
Diazinón	0.9993	100.9	2.4	98.2	4.9	99.9	1.9	101.7	4.8	98.5	1.1	125.4	7.4
Dimetoato	0.9987	117.9	7.4	119.9	4.5	111.6	11.2	110.8	27.5	103.1	9.1	93.8	10.6
Diurón	0.9994	91.5	6.2	113.7	4.5	91.3	5.2	98.7	12.4	109.3	2.6	177.3	8.6
Fenitrotión	0.9969	102.7	4.9	97.3	2.4	101.7	7.8	97.5	9.9	94.6	2.7	94.4	4.0
Isoproturón	0.9989	90.8	5.6	80.5	3.9	89.5	2.0	109.0	6.5	89.7	2.7	51.1	7.9
Linurón	0.9968	95.2	6.2	102.8	5.7	85.2	2.6	95.9	18.9	70.0	3.1	89.7	3.8
Malatión	0.9997	100.7	3.9	99.7	3.8	100.8	6.8	104.2	17.5	92.3	5.4	77.4	13.1
MCPA	0.9996	109.1	8.4	99.7	5.7	99.6	9.3	100.2	18.9	103.9	5.3	88.3	12.6
Mecoprop	0.9998	101.9	3.6	100.3	5.7	103.6	5.1	102.4	15.0	134.1	5.7	163.3	11.7
Metolacoloro	0.9990	101.3	2.5	90.2	5.5	100.3	2.4	101.5	9.7	97.3	4.6	113.5	3.8
Molinato	0.9985	68.3	3.4	79.2	9.8	50.0	11.8	90.8	15.2	53.9	5.9	44.8	6.4
Propanil	0.9993	100.4	6.0	102.6	31.8	98.1	6.5	71.2	7.6	58.5	9.8	150.5	26.1
Simazina	0.9993	99.7	6.7	116.6	7.0	97.1	5.5	109.8	3.8	102.8	1.7	112.8	13.7
Terbutilatrizona	0.9991	106.8	3.0	107.6	9.4	115.2	1.9	100.8	5.5	105.0	3.8	111.1	5.1

RR: recuperación relativa; CV: coeficiente de variación; ART: agua residual tratada; ARNT: agua residual no tratada

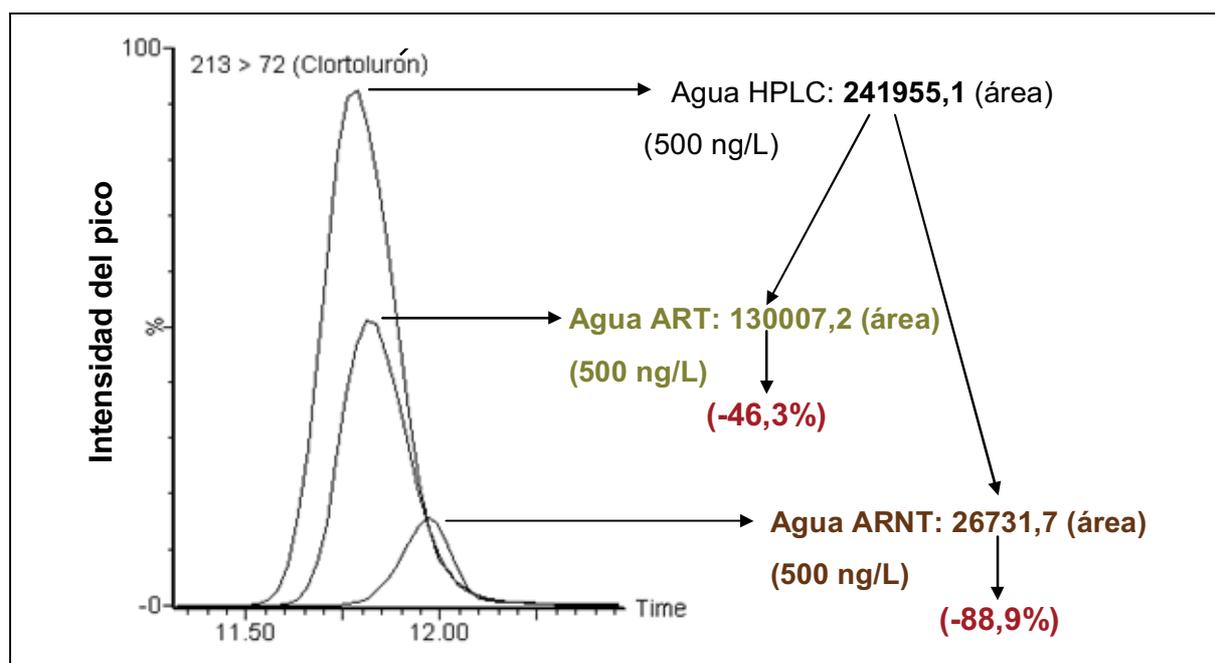


Figura 2 - 12. Cálculo del efecto causado por las matrices de ART (agua residual tratada) y ARNT (agua residual no tratada) en el análisis del clortolurón mediante online SPE-LC-MS/MS.

Los efectos causados a cada analito por las dos matrices más complejas se observan en la Figura 2-13. En su mayoría se trata de efectos de supresión iónica que conducen a señales de baja intensidad y, por consiguiente, a límites de detección y determinación más altos. El analito más afectado es la atrazina, con una supresión iónica superior al 90%, sin embargo su señal continúa siendo lo suficientemente alta como para permitir su cuantificación en muestras de agua residual no tratada por debajo de los 0,1 $\mu\text{g/L}$. La Figura 2-14 muestra los límites del método (Ldet y LOD) para cada una de las 5 matrices de agua en estudio: agua grado HPLC, agua subterránea, agua continental superficial, agua residual tratada y agua residual no tratada.

El límite de detección (LOD) de cada analito depende de la intensidad de la señal de su SRM1 y de los efectos causados por la matriz en estudio. En la Figura 2-14b se observa que los límites de detección están entre 0,020 (atrazina e isoproturón) y 30 ng/L (linurón) y que la mayoría (54,5%) se encuentra entre 0,1 y 1 ng/L. La dispersión de los límites indica el grado de vulnerabilidad de los analitos en relación a la presencia de la matriz. Por ejemplo, el diazinón presenta un intervalo de LOD de 0,130 ng/L (de 0,050 a 0,180 ng/L) indicando poca vulnerabilidad si se compara con la atrazina, que presenta un intervalo de LOD de 4,090 ng/L (de 0,020 a 4,110 ng/L).

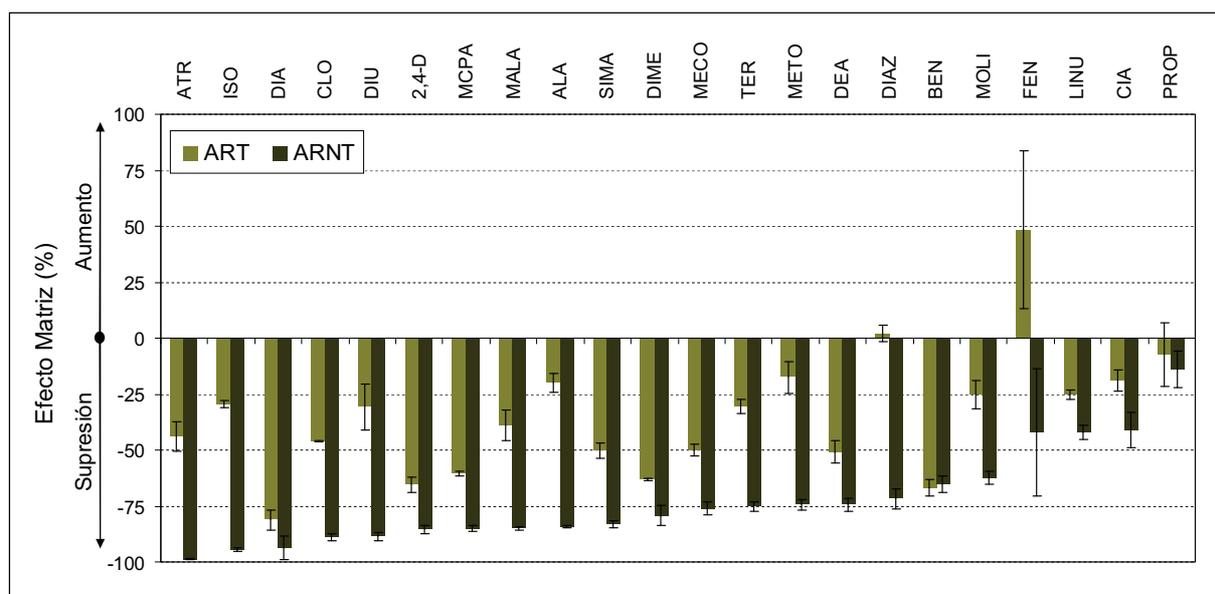


Figura 2 - 13. Estudio del efecto matriz. Supresión y aumento de señal (%) causada por la presencia de la matriz al analizar agua residual tratada (ART) y agua residual no tratada (ARNT) en muestras fortificadas a 500 ng/L (n=3).

El Ldet (ver Figura 2-14a) sigue en promedio la misma dispersión que los LOD, aunque a niveles más altos. Todos los Ldet se encuentran por debajo de los 100 ng/L, y el 40,9% de ellos se encuentra entre 1 y 10 ng/L. Ldet muy superiores a los respectivos LOD indican SRM2 de baja señal, es decir, IRIs muy altas. Es el caso del isoproturón (IRI: 30) que presenta LOD entre 0,050 y 0,520 ng/L y Ldet hasta dos órdenes de magnitud más altos (0,6 y 18 ng/L).

En todos los casos, los límites del método permiten detectar y cuantificar de forma precisa y fiable todos los analitos objeto de estudio a niveles por debajo de 25 ng/L, 65 ng/L, 52 ng/L y 99 ng/L en agua superficial, aguas subterráneas, aguas residuales tratadas y aguas residuales no tratadas, respectivamente.

La validación del método desarrollado para plaguicidas en sedimentos se describe en detalle en la publicación científica #1. Para la validación de los métodos desarrollados para el análisis del cocktail de contaminantes orgánicos, incluidos plaguicidas, en aguas y sedimentos, en términos de linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad, se siguieron básicamente los mismos criterios citados en este apartado.

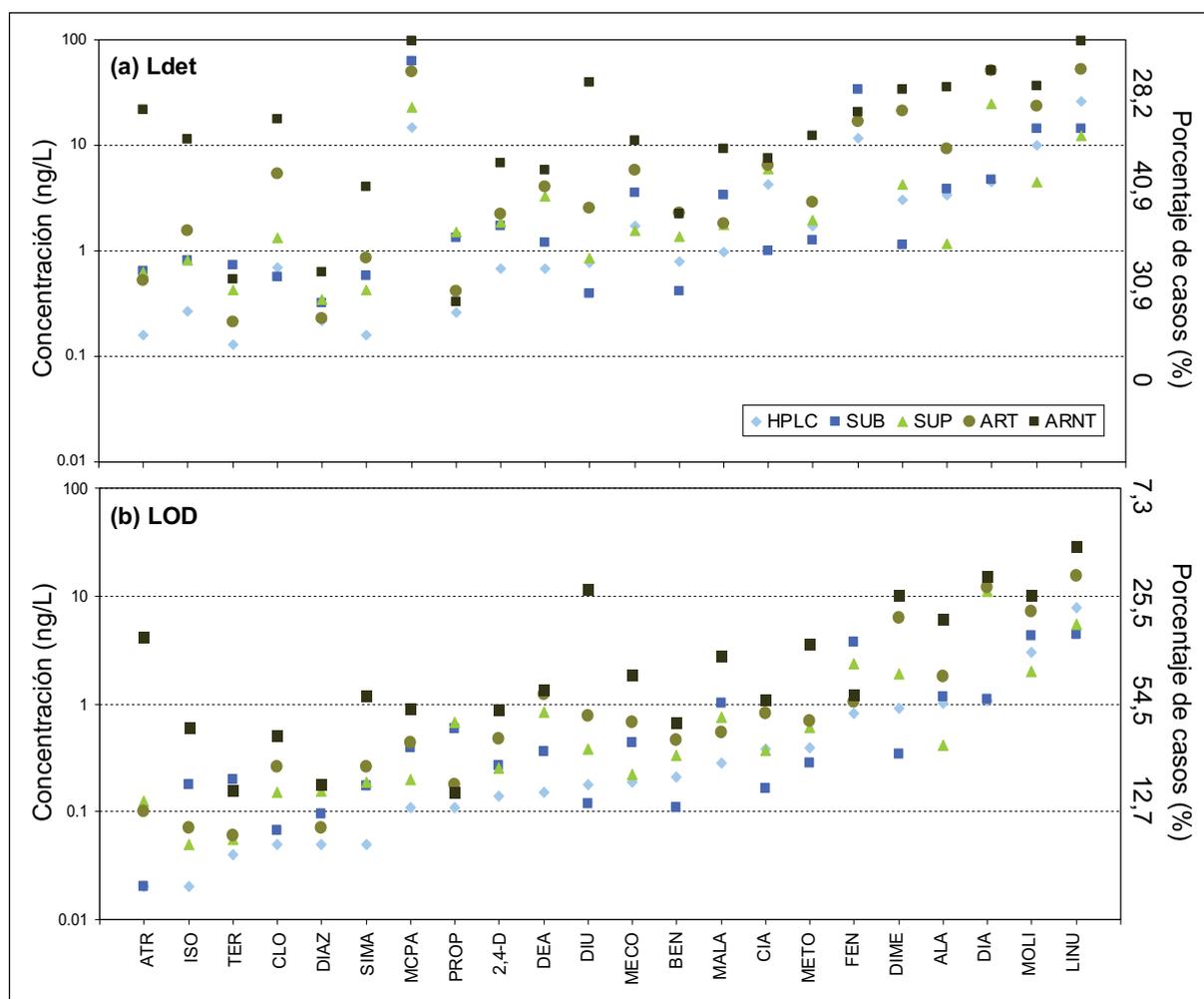


Figura 2 - 14. Límites del método (Ldet (a) y LOD (b)) para cada una de las 5 matrices de agua en estudio: agua de grado HPLC, agua subterránea (SUB), agua superficial (SUP), agua residual tratada (ART) y agua residual no tratada (ARNT).

La Tabla 2-7 muestra los porcentajes de RA y RR, la precisión del método dada por el CV y los LOD y Ldet obtenidos para los distintos plaguicidas en el análisis de aguas subterráneas y sedimento.

En el caso del agua, la exactitud y la precisión del método se determinaron a partir del análisis por sextuplicado de las muestras de agua fortificadas con los analitos a una concentración de 500 ng/L y SILIS a 100 ng/L. La exactitud y la precisión del método de sedimentos se determinaron a partir del análisis por triplicado de 1g de muestras fortificada con los analitos y sus respectivos SILIS a una concentración de 100 ng/g.

Tabla 2 - 7. Resultados del estudio de recuperación y precisión a dos niveles, R1 y R2, y límites de los métodos aplicados al análisis de muestras de agua subterránea y sedimento.

Plaguicida	R1			R2			Límites	
	RA (%)	RR (%)	CV (%)	RA (%)	RR (%)	CV (%)	LOD	Ldet
Agua subterránea (R1: 100 / R2: 500 ng/L, Límites en ng/L, n: 6)								
Diuron	6,4	94,0	5,6	7,2	99,8	3,7	0,39	1,29
Simazine	26,6	104,4	6,6	38,7	124,5	2,6	0,45	1,51
Simazine OH	7,4	28,9	24,9	14,7	47,0	36,7	0,35	1,16
DIA	20,1	117,0	12,2	31,0	121,5	7,3	3,76	12,5
Sedimento (R1: 100 ng/g, Límites en ng/g, n: 3)								
Diuron	75,12	108,4	3,0	na	na	na	0,11	0,29
Simazine	104,89	91,2	5,5	na	na	na	0,30	1,76

RA: recuperación absoluta; RR: recuperación relativa; CV: coeficiente de variación; LOD: Límite de detección; Ldet: límite de determinación; na: no analizado.

El efecto de matriz tanto en agua subterránea como en sedimento se calculó como se indica en este apartado y en todos los casos se tradujo en un efecto de supresión iónica. En el caso del análisis de agua subterránea, las pérdidas de señal fueron del 3,7%, 16,5 %, 23,8 % y 27,9% para la simazina, el diurón, la desipropilatrizona y la hidroxí simazina, respectivamente.

Las RAs variaron del 6,4 al 27% en aguas y del 75 al 105% en sedimento. Las recuperaciones relativas (RR), con excepción de la hidroxí simazina, se mantuvieron en el intervalo 90-120% con CVs por debajo del 30%. Los LOD y Ldet se mostraron excelentes, permitiendo la cuantificación de los analitos por debajo de los 13 ng/L en aguas y de los 2,0 ng/g en sedimentos. Para la confirmación de la presencia de los analitos en las muestras se siguieron las mismas condiciones comentadas anteriormente en este mismo apartado.

2.3.4. Comparativa entre las metodologías desarrolladas

Las cuatro metodologías descritas en este capítulo se esquematizan en las figuras 2-15 y 2-16. Las principales diferencias entre los dos métodos desarrollados para el análisis de aguas (Figura 2-15) residen en los disolventes orgánicos usados en la fase móvil cromatográfica (MeOH y ACN) y en los cartuchos de extracción escogidos (PLRP-s y Oasis HLB). El uso de H₂O/MeOH como fase móvil en el método desarrollado para el análisis de 4 plaguicidas y otros contaminantes (Figura 2-15b2) en agua se debe a la mayor polaridad del

MeOH (en comparación con el ACN), lo que lo convertía en una opción mejor debido a la alta hidrosolubilidad de los fármacos estudiados.

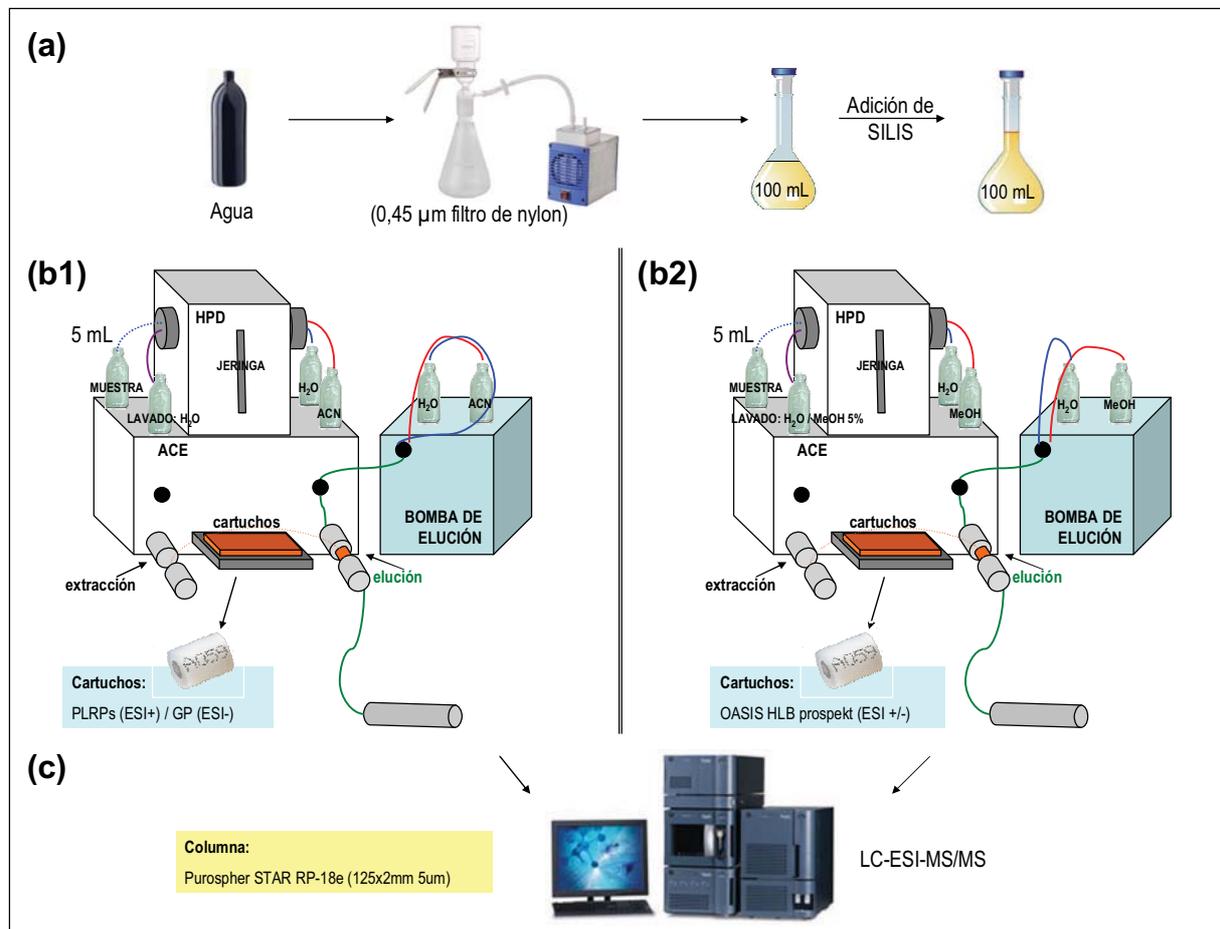


Figura 2 - 15. Esquema de proceso analítico desarrollado para el análisis de plaguicidas en agua por online SPE-LC-MS/MS: (a) preparación de la muestra; (b1) método de extracción de 22 plaguicidas; (b2) método de extracción de 4 plaguicidas y otros contaminantes; (c) método de análisis.

Con relación a los cartuchos de extracción, durante el desarrollo del método aplicado al análisis de los 22 plaguicidas, no fue posible extraer todos los analitos con el mismo cartucho, como en el caso del método aplicado al análisis de 4 plaguicidas y otros contaminantes, lo que significó realizar el proceso de extracción y consecuentemente el de análisis dos veces: extracción con cartuchos PLRP-s para el análisis de los plaguicidas que se ionizan en modo positivo (ESI+) y, en secuencia, extracción con cartuchos GP para los que se ionizan en modo negativo (ESI-). A pesar del consumo del doble de tiempo, los buenos resultados obtenidos tras el estudio de validación justifican el tiempo de análisis y el coste añadido. Para tener una idea, los Ldet en agua subterránea determinados para el diurón, simazina y DIA usando el método con los dos cartuchos (0,40, 0,58 y 4,68 ng/L

respectivamente) fueron en promedio 64% menores a los encontrados para los mismos compuestos con el método para el cocktail de contaminantes (1,29, 1,51 y 12,5 ng/L).

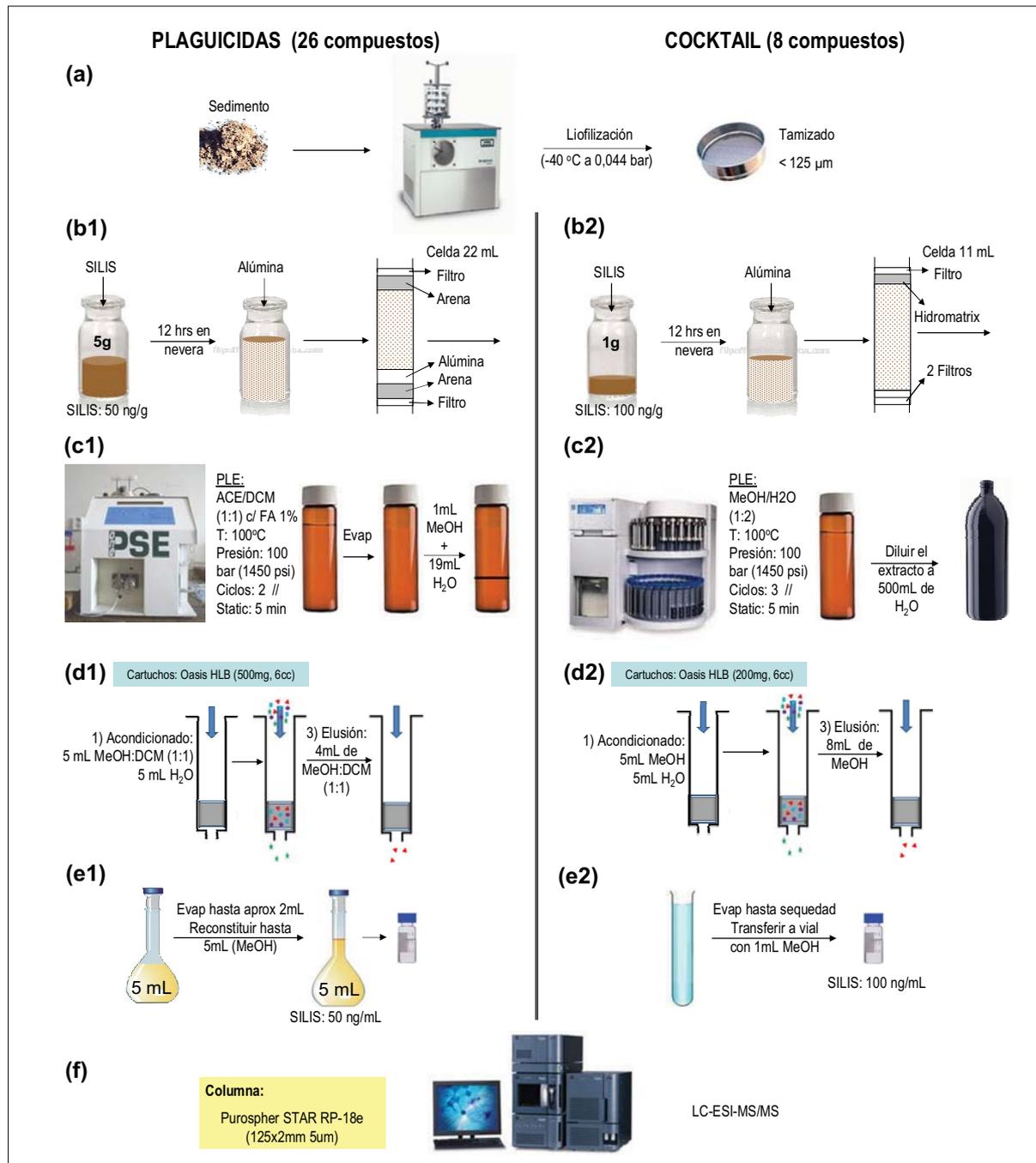


Figura 2 - 16. Esquema de proceso analítico desarrollado para el análisis de plaguicidas en sedimento por PLE-SPE-LC-MS/MS en los dos métodos desarrollados: (a) preparación de la muestra; (b) preparación de la celda; (c) extracción por PLE; (d) purificación y concentración por SPE; (e) concentración del extracto; (f) método de análisis.

Con respecto a los métodos desarrollados para el análisis de sedimentos, ambos se basan en las mismas técnicas, PLE seguida de SPE, sin embargo, hay diferencias

significativas entre ellos. En la publicación #1 se comentó la dificultad de recuperar los 26 plaguicidas tras haber pasado por el proceso de SPE, debido principalmente al grado medio-alto de volatilidad de algunos plaguicidas, lo que provocó un cambio en la metodología a fin de evitar la evaporación a sequedad de los extractos purificados (Figura 2-16). En el caso del método optimizado para el análisis de 2 plaguicidas y otros contaminantes en sedimentos, la evaporación a sequedad tras la SPE no fue un factor limitante. Esto se debe a que ninguno de los analitos (entre plaguicidas, fármacos y estrógenos) presentaba una constante de Henry lo suficientemente alta que comprometiese la recuperación de los mismos durante todo el proceso de análisis. Esto permitió trabajar con menos matriz, tan sólo 1 gramo de sedimento, en lugar de 5 gramos. El disolvente de extracción, y el de elución en el paso de SPE, también son algo diferentes en base a la mayor polaridad de algunos de los compuestos incluidos en el cocktail.

Comparando ambos métodos para el análisis de sedimentos, se observa que los Ldet son muy parecidos (0,21 y 0,28 ng/g para el diurón y la simazina, respectivamente, con el método de 26 plaguicidas, frente a 0,29 y 1,76 ng/g con el método de 8 analitos), mientras las RA varían algo más (75 y 105% para el diurón y simazina, respectivamente, con el método de 8 analitos, frente a 66 y 39% con el método de 26 plaguicidas. Las diferencias encontradas deben tener su origen en el uso de disolventes más selectivos tanto para la PLE como para la SPE en el método de 8 contaminantes. Cabe decir que ajustar un método para el análisis de 26 plaguicidas de diferentes familias químicas conlleva un grado de dificultad mucho mayor que el encontrado en el caso del método aplicado al análisis de tan sólo 8 compuestos.

Las ventajas del uso del método de dilución isotópica tanto en el análisis de aguas como en el de sedimentos se reflejan tanto en los estudios de recuperación, como en la calidad de las curvas de calibrado, en la corrección de la variación del tiempo de retención de los analitos, y en la compensación de los efectos de matriz.

Cuando no se hace uso del método de dilución isotópica, el porcentaje de recuperación absoluto de cada analito debe permanecer preferiblemente por encima del 50%, sin embargo, cuando se hace uso de SILIS, el porcentaje de recuperación absoluto de cada analito por debajo del 50% es aceptable, siempre que:

- la recuperación relativa (RR) de los analitos en función de la recuperación de los respectivos patrones internos esté entre el 70 y 120%;
- la repetibilidad (CV) de la RR sea buena (< 20%);
- los Ldet sean lo suficientemente bajos como para permitir la detección de los analitos a niveles aceptables.

Estos parámetros se basan en los parámetros de aceptabilidad analítica indicados en el documento SANCO/12495/2011 que describe un método de validación y procedimientos

de control de calidad para el análisis de residuos de plaguicidas en los alimentos y en los piensos (SANCO, 2011).

En lo que respecta a las curvas de calibrado, el uso de la dilución isotópica posibilita la cuantificación por el método de estándar interno, lo que permite intervalos de trabajo de más de un orden de magnitud sin perder calidad ($r^2 > 0,99$), ya que el intervalo lineal suele ser mayor gracias a la corrección de variaciones en la señal de los analitos con la de los patrones internos.

Además de eso, los SILIS permiten corregir de forma óptima variaciones en el tiempo de retención de los analitos causadas principalmente por la matriz. Es interesante resaltar que el tiempo de retención de los compuestos deuterados suele ser levemente menor que el tiempo de retención de los respectivos plaguicidas, es decir, los compuestos deuterados eluyen antes que los respectivos compuestos no deuterados. La explicación para ese fenómeno es que los átomos de deuterio tienen un enlace más fuerte con los átomos de carbono que los compuestos no deuterados lo que provoca que los enlaces sean más cortos y por lo mismo las moléculas ligeramente más pequeñas introduciendo de esa forma pequeñas diferencias en las propiedades físico-químicas, lo que se traduce en tiempos de retención ligeramente distintos (Meier-Augenstein et al. 1999; Stokvis et al. 2005).

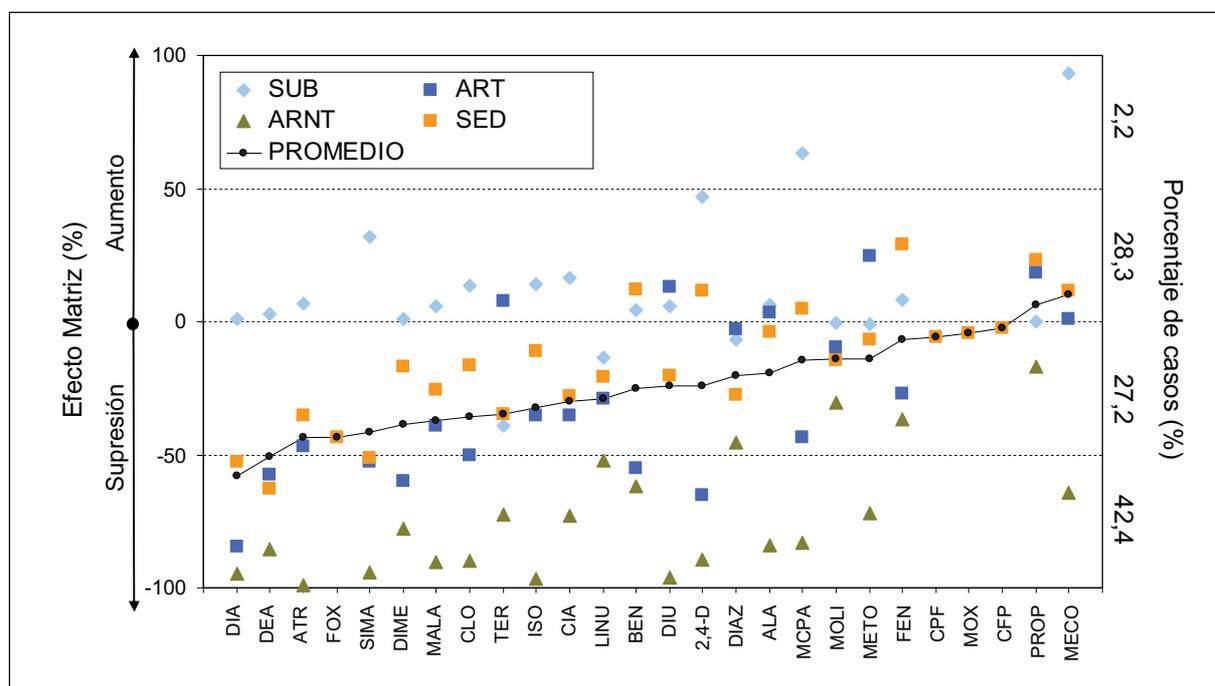


Figura 2 - 17. Estudio del efecto matriz. Promedio de supresión y aumento de señal (%) causada por la presencia de la matriz al analizar agua subterránea (SUB), agua residual tratada (ART), agua residual no tratada (ARNT) y sedimento (SED) en muestras fortificadas a 100 ng/L y 50 ng/g (aguas y sedimento, respectivamente).

Sobre el efecto matriz, como ya se ha comentado anteriormente, en la mayoría de los casos se trató de efectos de supresión iónica, que condujeron a la reducción de las señales cromatográficas. La Figura 2-17 presenta los diferentes efectos causados por las diferentes matrices de estudio (diferentes aguas y sedimento). Como se observa, los efectos causados por la matriz resultante tras todo el proceso de extracción y purificación son más pronunciados al analizar aguas residuales que sedimentos. Esto puede deberse tanto a la mayor cantidad de materia orgánica presente en las aguas residuales (incluso tras el tratamiento) como a la mayor selectividad de los procesos de extracción y purificación aplicados durante el proceso de análisis de sedimentos.

La mayoría de los efectos (55,4% de los casos) se encuentran en el margen $\pm 50\%$, mientras que sólo el 2,2% de los casos presenta aumento de señal por encima del 50%. El agua subterránea presenta, en la mayoría de los casos, efectos de aumento de señal, en contraste con las muestras de agua residual que en casi todos los casos causa efectos de supresión de la señal. Pero el efecto de matriz no solo depende de la matriz, sino también del analito. En la misma figura se observa claramente la heterogeneidad de los efectos, según muestra y analito, lo que hace que sea muy difícil encontrar métodos de análisis de plaguicidas capaces de corregir todos los efectos que se manifiestan en cada uno de los plaguicidas objeto de estudio. Hay métodos que intentan corregir estos efectos, pero no suelen ser muy efectivos. Por ejemplo, hacer curvas de calibrado en matriz no es tan fiable debido a las grandes diferencias de composición existentes entre cada una de las muestras de agua o sedimento. Otro método no muy satisfactorio es el de aumentar los pasos de purificación de la muestra, debido a que implica una manipulación mayor de la muestra lo que conlleva a más errores. La dilución de la muestra/extracto es otra opción, pero en muchos casos supone una disminución de la sensibilidad del método. La mejor opción para muchos autores (Jelic et al. 2011; Marin et al. 2009; Postigo et al. 2008) consiste en la adición de SILIS y, de preferencia, que cada analito tenga su respectivo SILIS, es decir, su propio compuesto análogo marcado isotópicamente (dilución isotópica), aunque esto no siempre es viable debido al alto coste de esta técnica y a la falta de disponibilidad de muchos SILIS, principalmente de productos de transformación.

La Tabla 2-8 muestra los métodos de calibración aplicados en estudios realizados en los últimos 5 años, basados en el análisis de 20 ó más plaguicidas en aguas por técnicas del tipo LC-MSⁿ. Como se observa, la técnica del uso de SILIS aún no es masiva y, cuando se han usado, no han llegado a ser técnicas de dilución isotópica. Por ejemplo, Marin y colaboradores usaron 7 compuestos deuterados para el análisis de 37 plaguicidas en agua potable, subterránea y continental superficial por SPE-UHPLC-MS/MS y, tras un extenso estudio del efecto matriz, apoyan y recomiendan el uso de los SILIS como herramienta fiable contra los efectos indeseados de la matriz. Por el contrario, Masiá y colaboradores

manifiestan ser conscientes de que las guías europeas de control de calidad (Decisión 2002/657/CE, SANCO 2011) recomiendan el uso de SILIS en los métodos de análisis, pero, debido a los bajos efectos de matriz registrados en sus estudios de análisis de contaminantes orgánicos en muestras de agua superficial y residual, y debido a las restricciones económicas que el uso de los SILIS implica, deciden no usarlos y cuantificar las muestras mediante calibración externa.

Tabla 2 - 8. Tipos de calibraciones aplicadas en los últimos 5 años a estudios donde 20 ó más plaguicidas se han investigado en muestras de agua por medio de técnicas del tipo LC-MSⁿ.

Referencia	Año	Matriz ambiental	Calibración	Plag.	SILIS*		
					D	¹³ C	¹⁵ N
Carvalho et al.	2008	agua potable, subterránea y superficial	externa	28			
Jordan et al.	2009	agua superficial	externa	30			
Marin et al.	2009	agua potable, subterránea y superficial	interna	37	7		
Jansson & Kreuger	2010	agua subterránea y superficial	Interna	95	4		
Loos et al.	2010	agua subterránea	interna	23	2	6	
Pitarch et al.	2010	agua residual tratada	interna	51	7		
Ricart et al.	2010	agua superficial	externa	22			
Singer et al.	2010	agua superficial y residual	interna	20	9		1
Fenoll et al.	2011	agua de lisímetros	externa	48			
Huntscha et al.	2012	agua subterránea, superficial y residual	interna	43	17	1	1
Wode et al.	2012	agua potable, superficial y residual tratada	interna	40	5	1	
Berho et al.	2013	agua subterránea	interna	25	2		
Caldas et al.	2013	agua potable y superficial	externa	33			
Herrero-Hernández et al.	2013	agua subterránea y superficial	externa	58			
Masiá et al.	2013	agua superficial y residual	externa	43			
Reemtsma et al.	2013	agua subterránea y superficial	externa	150			

Plag.: plaguicidas; D: compuestos deuterados; ¹³C: compuestos con ¹³C; ¹⁵N: compuestos con ¹⁵N
 *aplicados estrictamente al análisis de plaguicidas y productos de transformación.

En otros casos, como en el estudio de Reemtsma y colaboradores la calibración externa es prácticamente la única opción debido a la falta de disponibilidad en el mercado de los SILIS necesarios (para 150 analitos, productos de transformación de plaguicidas). Por

otra parte, cabe indicar que en los estudios con SILIS predomina el uso de compuestos deuterados, todo y que el uso de ^{13}C y ^{15}N SILIS también es posible, aunque hay menos disponibilidad y suelen ser más caros que los deuterados.

Es importante resaltar que el uso de SILIS no elimina las variaciones de señal causadas por los componentes de la matriz en estudio, sino que sólo las corrige, lo que, no obstante, contribuye a mejorar de forma muy importante la exactitud y la precisión del método.

CAPÍTULO 3

PLAGUICIDAS EN AGUAS RESIDUALES



3.1. Introducción y objetivos

El incremento de la actividad industrial y el desarrollo económico y social han producido, al menos hasta hace unos años, un crecimiento de las grandes ciudades, lo que ha provocado un aumento de la complejidad del suministro y tratamiento del agua. Para poder tratar volúmenes de agua cada vez más grandes, las potabilizadoras y las EDARs son cada vez más modernas y efectivas. Sin embargo, la eliminación de los microcontaminantes orgánicos durante la depuración de las aguas aún es parcial. En el caso específico de los plaguicidas, se ha detectado su presencia en las aguas depuradas, representando un peligro para el medio receptor ya que los vertidos de estas estaciones vuelven a los cauces de las aguas naturales contaminándolas (ver Figura 3-1).

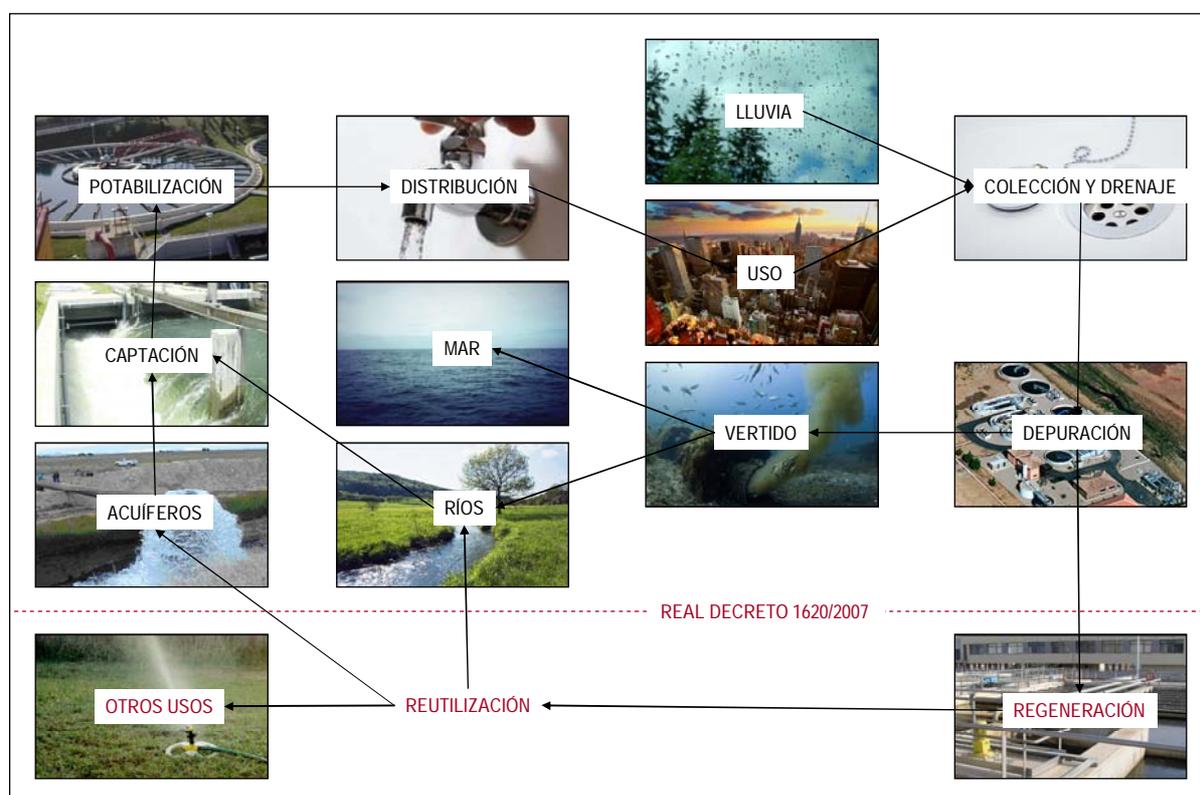


Figura 3 - 1. Ciclo del agua urbana.

Los requisitos para los vertidos de aguas procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas son:

- Demanda bioquímica de oxígeno con 5 días de reacción (DBO5): no superior a 25 mg/L de O₂ y un porcentaje mínimo de reducción de 70-90%;
- Demanda química de oxígeno (DQO): no superior a 125 mg/L de O₂ y un porcentaje mínimo de reducción de 75%;
- Sólidos en suspensión (SS): no superior a 60 mg/L y un porcentaje mínimo de

reducción de 90%;

- Fósforo total (P_T) (aplicado sólo en EDARs en zonas sensibles): no superior a 2 mg/L de P (para 10.000 - 100.000 h-e – habitantes equivalentes) y un porcentaje mínimo de reducción de 80%;

- Nitrógeno total (N_T) (aplicado sólo en EDARs en zonas sensibles): no superior a 15 mg/L de N (para 10.000-100.000 h-e) y un porcentaje mínimo de reducción de 70-80%.

Por otra parte, frente a la creciente demanda de agua y la escasez de los recursos hídricos, la re-utilización de aguas regeneradas se contempla como una posible vía de solución para incrementar los recursos existentes (Ormad et al. 2011). Para ello, las aguas deben someterse a un proceso adicional o complementario (tratamiento terciario), que permita adecuar su calidad al uso al que se destinan en conformidad con las normativas establecidas (Real Decreto 1620/2007).

Así pues, las aguas regeneradas deben pasar por un proceso adicional para garantizar una serie de criterios biológicos y físico-químicos mínimos de calidad de acuerdo con el tipo de uso que se le dará durante la re-utilización. Por ejemplo, la cantidad máxima de SS puede variar de 5 mg/L para el uso industrial (en torres de refrigeración) a 35 mg/L para la recarga de acuíferos por percolación. En el caso de la turbidez, ésta puede variar de 2 UNT (Unidades Nefelométricas de Turbidez) para la recarga de acuíferos por inyección directa a 15 UNT para usos industriales (no alimentarios) (Real Decreto 1620/2007). Con todo, tales normativas para aguas regeneradas no incluyen niveles máximos de plaguicidas en los vertidos de EDARs urbanos, tan sólo piden que se limite su entrada en el medio ambiente y que, en el caso de las sustancias peligrosas, se asegure el respeto de las normas de calidad ambiental. Según esto, el estudio de estos contaminantes en las EDARs es importante, ya que ayuda a detectar su presencia, eliminación e impacto ambiental y con ello se ayuda a las instituciones competentes a gestionar mejor las depuradoras. Además, está claro que los efluentes de las EDARs son una fuente importante de contaminantes orgánicos para el medio ambiente acuático, lo que incluye a los plaguicidas entre otros compuestos como los fármacos (Jelic et al. 2011).

En este contexto, los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron:

- Estudiar la presencia, el destino y la eliminación de plaguicidas (y sus metabolitos y productos de transformación) en las EDARs, y evaluar los factores que influyen en esta eliminación;
- Evaluar el impacto de la re-utilización de las aguas residuales tratadas:
 - sobre la calidad del agua del medio receptor, y
 - el uso posterior de éste para la captación de agua potable.

Estos objetivos se abordan en cada una de las dos publicaciones incluidas a continuación. La primera (publicación #2) investiga la presencia de plaguicidas en las aguas de tres EDARs de Cataluña con el objetivo de estudiar su eliminación durante el proceso de depuración y su destino e impacto ambiental, y la segunda (publicación #3) estudia la calidad química de las aguas regeneradas producidas en la EDAR de El Prat (una de las dos EDARs principales que dan servicio a la ciudad de Barcelona y su área metropolitana) y su impacto en la calidad del agua del río receptor, el Llobregat.

3.2. Presencia, comportamiento y relevancia ambiental de plaguicidas en EDARs.

Publicación científica #2:

“Occurrence and behaviour of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact”

Por:

Marianne Köck-Schulmeyer, Marta Villagrasa, Miren López de Alda, Raquel Céspedes-Sánchez, Francesc Ventura, Damià Barceló

Publicada en “Science of the Total Environment”.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact

Marianne Köck-Schulmeyer^a, Marta Villagrasa^b, Miren López de Alda^{a,*}, Raquel Céspedes-Sánchez^c, Francesc Ventura^c, Damià Barceló^{a,b}

^a Water and Soil Quality Research Group, Dept. Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, c/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Catalan Institute for Water Research (ICRA), C/Emili Grahit 101, Edifici H2O, Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, 17003 Girona, Spain

^c AGBAR-Aigües de Barcelona, Av. Diagonal 211, E-08018 Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- Pesticides are poorly removed in WWTPs.
- Urban wastewaters are important sources of pesticides to the aquatic environment.
- Diazinon and diuron: the most relevant pesticides in our study
- New index (ERPWI) to assess the environmental impact of pesticides coming from WWTPs

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2013

Received in revised form 26 March 2013

Accepted 3 April 2013

Available online xxxx

Keywords:

Pesticides

Risk assessment

Wastewater treatment

Water analysis

LC–MS/MS

ABSTRACT

Reports on pesticides elimination during wastewater treatment are rare since these substances are typically considered of agricultural rather than of urban origin. In this context, the aim of this work was to evaluate the presence, removal and environmental relevance of 22 selected pesticides in three different wastewater treatment plants (WWTPs), paying attention not only to their occurrence and elimination but also to the toxicity of each pesticide against three aquatic micro organisms (algae, *daphnia* and fish) through the calculation of the so-named Environmental Relevance of Pesticides from Wastewater treatment plants Index (ERPWI). For this purpose, an analytical method based on isotope dilution on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE–LC–MS/MS) was optimized, allowing the determination of the 22 target pesticides in wastewater with satisfactory sensitivity (limits of detection below 30 ng/L), accuracy and precision. Concerning the results, total pesticide levels were in most instances below 1 µg/L but removal in the WWTPs was variable and often poor, with concentrations in the effluent sometimes higher than in the corresponding influent. Possible explanations for these poor or negative removal rates are, among many others considered (e.g. sampling, sample preservation, method biases, atmospheric deposition), deconjugation of metabolites and/or transformation products of the pesticides, hydrolysis, and desorption from particulate matter during wastewater treatment. The most significant pesticides in terms of concentration and frequency of detection were diazinon and diuron. These two pesticides, followed by atrazine, simazine and malathion, were also the most relevant from the environmental point of view, according to the calculated ERPWI.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades rivers have been highly polluted by industrial, mining and urban wastewaters and by surface runoff from agricultural areas. Surface runoff from agricultural areas used to be the main source of pesticides, but in urban areas wastewaters represent one of the main routes of pesticide contamination into the environment (Cahill et al., 2011). The presence of pesticides in urban WWTPs is mainly due to non-agricultural uses of them. The list of uses includes application in

grass-management (golf courses, educational facilities, parks, and cemeteries), in industrial vegetation control (industrial facilities, electric utilities, roadways, railroads, pipelines), in public health (mosquito-abatement districts, rodent-control areas, and aquatic areas) and in non-agricultural crops such as commercial forestry and horticulture and plant-nurseries (Barceló and Hennion, 2003).

In spite that pesticides are probably the class of organic contaminants most studied in the aquatic environment, their occurrence and behavior in WWTPs has been very seldom studied, perhaps because these substances have been typically considered of agricultural rather than of urban origin. In this regard, most of the studies carried out have been performed at laboratory scale to test, for instance, the efficiency of

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 6134; fax: +34 93 204 5904.
E-mail address: mloqam@cid.csic.es (M. López de Alda).

different adsorbents, such as, carbonaceous materials (Ormad et al., 2008, 2009; Rodriguez et al., 2009; Ninkovic et al., 2010; Ahmad et al., 2010), agricultural wastes like watermelon peels (Memon et al., 2008) and wood residues (Rodriguez-Cruz et al., 2008), industrial wastes like sludge (Gupta et al., 2006; Kahle et al., 2008; Morasch et al., 2010) and fly ash (Singh, 2009), clay minerals (Cruz-Guzman et al., 2005), or polymeric resins like amberlite (Silva et al., 2004), in the removal of pesticides from wastewaters. Very few studies have been conducted at real plant scale (Kahle et al., 2008; Morasch et al., 2010; Ormad et al., 2011; Pitarch et al., 2010; Singer et al., 2010; Stamatidis et al., 2010; Teijon et al., 2010; Wittmer et al., 2010) and most of them coincide in reporting deficient removal efficiencies for pesticides in the WWTPs.

In this context, the main objective of the present work, integrated within the project SOSTAQUA (CEN 2007–1039; <http://www.sostaqua.com/>), was to evaluate the presence and removal of pesticides in WWTPs and the environmental relevance of this source of pesticides to the aquatic environment, considering not only their concentration, but also their toxicity against three aquatic micro organisms: algae, *daphnia* and fish. For this purpose, an analytical procedure based on on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE–LC–MS/MS) that has been used within the group in many studies for analysis of medium to polar pesticides in different monitoring programs conducted in drinking (Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2008b), ground (Kampioti et al., 2005; Postigo et al., 2010), surface (Barata et al., 2007; Terrado et al., 2007; Kuster et al., 2008a, 2008b; Palma et al., 2009; Ricart et al., 2010; Kock et al., 2010; Köck-Schulmeyer et al., 2011; Köck-Schulmeyer et al., 2012; Ochoa et al., 2012) and waste water (Kuster et al., 2008b; Köck-Schulmeyer et al., 2011) was further optimized by introducing the isotope dilution method for more accurate quantification and subsequently applied to the various wastewater samples collected in the frame of this study.

On the other hand, for assessment of the environmental relevance of pesticides coming from wastewaters a new index taking into consideration for the first time their concentration in wastewater jointly with their toxicity has been proposed. To date, risk assessment methods for pesticides in natural waters (a list of them can be found in Köck-Schulmeyer et al., 2012-supporting information) have not taken into account their presence or elimination in WWTPs, whereas the index proposed by Reemtsma et al. (2006) for polar pollutants entering the water cycle by municipal wastewater (the Water Cycle Spreading Index, WCSI), which considers the effluent concentration and the relative elimination of each contaminant during the treatment, does not take into account the toxicity of the compounds to the aquatic organisms.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

High purity (96–99.9%) standards of the 22 target pesticides (selected on the basis of current regulations, extent of use, and feasibility of analysis by LC–MS/MS) and 20 related isotopically labeled compounds used as internal standards (see Table 1) were purchased from Fluka or Dr. Ehrenstorfer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Stock standard solutions of the individual analytes and mixtures of them at different concentrations were prepared in methanol and stored in the dark at -20°C . Calibration solutions were prepared in HPLC water by appropriate dilution of the above standard solutions (percentage of methanol lower than 0.1%). Pesticide-grade solvents methanol, acetonitrile and LC-grade water were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Analytical method

Analysis of the 22 pesticides in water was performed by means of on-line SPE–LC–MS/MS. The method employed is based on a

previously described method (Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2008a) where quantitation by external calibration has been replaced by the isotope dilution method. Briefly, 5 mL of the water samples (previously filtered and spiked with the deuterated surrogate standards at a concentration of 200 ng/L) and the standard calibration solutions and blanks are extracted with the aid of an automated on-line SPE sample processor Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), connected in series with the LC–MS/MS instrument, using two types of disposable trace enrichment polymeric cartridges (Hysphere Resin GP and PLRP-s, both from Spark Holland) for quantitative recovery of most of the target compounds. The Hysphere Resin GP cartridge is used for the extraction of 6 pesticides that are measured in negative ionization (NI) mode, and the PLRP-s cartridge is used for extraction of the pesticides that are measured in positive ionization (PI) mode (16 compounds). In both cases, after sample loading, the cartridges are washed with 1 mL of water and further eluted with the chromatographic mobile phase.

Chromatographic separation is performed with a binary HPLC pump Model 1525 from Waters using a Purospher STAR RP-18e column (125×2 mm, $5 \mu\text{m}$ particle diameter, from Merck, Darmstadt, Germany) and gradient elution with acetonitrile and water as mobile phase. The 40 min gradient starts with 10% acetonitrile in water, increases to 50% acetonitrile in 5 min and continues to 80% in 25 min and to 100% in 26 min. During the following 5 min the column is cleaned with 100% acetonitrile, readjusted to the initial conditions in 1 min, and equilibrated for further 8 min.

MS/MS detection is performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode acquiring 2 SRM transitions per compound (the first, and more abundant, is used for quantitation and the second for confirmation) and 1 SRM transition per surrogate (Table 1) using a TQD triple-quadrupole mass spectrometer from Waters equipped with an electrospray (ESI) interface. Other MS/MS experimental conditions are: capillary voltage, 3.5 kV; source temperature, 150°C ; desolvation temperature, 450°C ; extractor voltage, 3 V; and RF lens, 0.1 V. Nitrogen is used as both the nebulizing and the desolvation gas.

This method has shown satisfactory performance in the analysis of the target compounds in both HPLC water and wastewater. As it can be seen in Table 1 the method is linear (correlation coefficients $R^2 > 0.99$) and affords satisfactory sensitivity (limits of detection (LOD) in the pg/L or low ng/L range and limits of determination (Ldet) below 30 ng/L), accuracy (recoveries relative to the corresponding deuterated surrogate standards between 79 and 120%), and repeatability (relative standard deviations, RSD < 15%, except for propanil) in HPLC water. Evaluation of the performance of the method in influent and effluent wastewater (500 ng/L, $n = 5$) also showed fairly satisfactory results in terms of recoveries (in most cases within the interval 70–130%) and RSDs (below 15%, with a few exceptions). Influenced by the matrix, the LOD (concentration of analyte that produces a signal-to-noise ratio (S/N) of 3) and Ldet (concentration of analyte that can be quantified with the first transition (SRM1 > LOQ, corresponding to a S/N of 10) and confirmed with the second transition (SRM2 > LOD)) increased slightly in comparison with those obtained in HPLC water, but they were still low enough to allow the quantification of all the analytes at levels below 100 ng/L.

On the other hand, for positive identification of a compound in a sample the following criteria have to be met: (1) LC retention must be within 2% the retention time of the standard compound (in cases when this limit has been occasionally surpassed, the identification/confirmation has been deemed positive if the corresponding IS showed similar retention time deviation), and (2) the relative abundances of the two selected analyte SRM transitions in the sample should not differ by more than 20% (ratio: 1–2), 25% (ratio: 2–5), 30% (ratio: 5–10) or 50% (ratio: 10–100) from the same relative abundances in the previously injected standard.

2.3. Samples

Wastewater samples (a total of 48) from the influent and the effluent of three WWTPs from Catalonia (NE-Spain) were collected with the help of an ISCO automated sampler (GLS Compact Composite Samplers) provided with a 5-L amber glass bottle and a cooling system set to maintain the temperature of the samples during collection at 4 °C. The sampling was programed to collect 50 mL of wastewater every 30 min during 24 h, and took into consideration the hydraulic retention time (HRT) of the plants. Sample collection and analysis took place in 8 different periods covering almost 2 years: 3 campaigns were performed in 2007 (in July, November, and December), 4 in 2008 (in March, June, September, and November), and 1 in 2009 (March). The samples were transported to the laboratory under cooled conditions (4 °C) and immediately upon reception they were filtered through 0.45 µm Nylon filters (Whatman, Maidstone, UK) and then stored at –20 °C.

The WWTPs studied receive mainly domestic wastewater and urban runoff. The plants (A, B and C) differ in size, with 210,500, 175,000 and 204,100 population equivalents (design) respectively, operational conditions (HRT of 26–40 h, 20 h and 40 h, respectively), and treatment (biological plus tertiary, only biological, and biological plus P and N removal, respectively). Moreover, WWTP-C differs from the others in that it receives, in addition to municipal wastewater, an important contribution of industrial wastewater. Tertiary treatment (TT) in WWTP-A is based on coagulation, flocculation, chlorination and micro filtration. Table S1 and Figure S1 (supporting information) show some of the main characteristics of the sampled WWTPs and samples.

2.4. Data evaluation

All quantitative data were compiled in a database and further subjected to statistical evaluation using PASW Statistics 18 (SPSS Inc., USA). The significance of differences in concentration was checked by means of the Student *t*-test or ANOVA, depending on the case. Principal Component Analysis (PCA) was also applied. To avoid dealing with missing cases (values below the limit of determination), the PCA was applied to pesticides classes (sum of triazines, phenylureas, etc.) rather than to individual compounds. In all cases, a 95% confidence interval was considered.

Additionally, considering the difference in concentration between the influent and the corresponding effluent of the various pesticides individually, an "IN-OUT balance" was calculated for each compound from the data of the three WWTPs with the aim of assessing which pesticides were eliminated the worst. To accomplish this, the concentrations in the influent and the effluent of each pesticide in each plant and each campaign were pairwise compared. Values positive in the influent and below the Ldet in the effluent were assigned a relative removal of 100%. Conversely, values below the Ldet in the influent and above it (i.e., positive, measurable concentrations) in the corresponding effluent were assigned a relative removal of –100%. In those cases where both values were positive, the relative removals were calculated considering the concentration found in the influent as being 100%. Not detected levels in both influent and effluent were not considered in the IN-OUT balance.

3. Results and discussion

3.1. Individual pesticides levels

Table 2 shows the frequency of detection and the median, mean and maximum concentrations of the individual pesticides in the water samples analyzed, distinguishing between influent (WWI) and effluent (WWE) wastewater. In this respect, it may be worth mentioning that, since the method was validated with a wastewater sample with high organic matter content (and hence high matrix effects), the concentrations reported in Table 2 can in some cases

(e.g. malathion and alachlor) be lower than the method Ldet (Table 1), even though they are above the corresponding sample Ldet.

As it can be seen in Table 2, the most ubiquitous pesticides were diazinon and diuron, present in more than 80% of the samples, while cyanazine, fenitrothion, linuron, metolachlor and molinate were not detected in any sample. Alachlor was detected in just one sample (an influent), at a low level (2.59 ng/L), and bentazone, isoproturon and malathion were detected only in effluent samples. On the other hand, the maximum individual concentrations were observed for diazinon (684 and 4160 ng/L in influent and effluent wastewater, respectively), followed by simazine (1990 ng/L in effluent wastewater).

In a recent study conducted with the aim to evaluate the significance of the urban and agricultural land use on the dynamics of the pesticides in surface waters, Wittmer et al. (2010) identified five different patterns and classified diazinon within the group of compounds that show elevated background concentrations throughout the year due to constant household sources, and diuron within the group of compounds that show rain-event driven concentration peaks throughout the year due to urban outdoor sources, such as facades and roofs (Wittmer et al., 2010), which comes to support our findings.

The occurrence of diuron (found in our study at maximum levels of 452 and 366 ng/L in WWI and WWE, respectively), in urban WWTPs has been previously reported in various studies conducted in Spain. In the South of Spain diuron was found in WWE at levels between 22 and 3000 ng/L (Bueno et al., 2009; Munoz et al., 2009), whereas in the central area it reached 600 ng/L (Munoz et al., 2009; Pitarch et al., 2010), and in the NE the levels reported surpassed occasionally 200 ng/L (Köck-Schulmeyer et al., 2011; Tejón et al., 2010). Outside Spain, diuron has been reported at quite high levels also, up to, for instance, 190 ng/L in Switzerland (Morasch et al., 2010; Singer et al., 2010) and 210 ng/L in Ireland (Cahill et al., 2011).

On the other hand, the most notable differences between the mean and median concentrations (and the largest RSDs) were observed in the case of diazinon (RSD 319%) and in the case of the triazines simazine (RSD 324%) and atrazine (RSD 206%). These results come to agree with the classification of these pesticides by Wittmer et al., 2010 within the groups of compounds showing (i) seasonal urban and agricultural rain-event-driven concentration peaks (atrazine and also mecoprop), and (ii) unpredictably sharp peaks due to spills and disposal (atrazine and also diazinon).

The comparison of the individual pesticide median levels in WWI and WWE also showed a trend towards an increase of concentration from influent to effluent for many of the compounds measured.

Finally, statistical evaluation of the data obtained, grouped by chemical class (acids, anilides, etc.) to avoid dealing with missing cases, did not show significant differences with time (i.e. throughout the various campaigns) in any of the plants, indicating a fairly constant pattern of contamination, consistent with the primarily urban origin of the wastewaters analyzed. No significant differences were found either between cold (campaigns 2, 3 and 7), warm (campaigns 4 and 8) and hot (campaigns 1, 5 and 6) seasons.

3.2. Removal of pesticides in WWTPs

Fig. 1 illustrates (a) the total pesticides levels (in the form of box-plots) found in the influents and effluents of each plant, and (b) the relative abundance of the various pesticide families in each case. This figure clearly shows:

- comparatively lower concentrations of pesticides at the inlet of WWTP-A, as compared to that of WWTPs B and C, in spite that plants A and B receive basically municipal wastewaters and plant C has an important contribution of industrial wastewater,
- a poor overall removal of pesticides in all three plants, though less marked in the plant provided with tertiary treatment (plant A),

Table 2

Frequency of detection and median, mean and maximum concentrations of the individual pesticides in the influent (WWI, n = 24) and effluent (WWE, n = 24) wastewater samples collected from the three WWTPs.

Pesticide	Family	WWI					WWE						
		frequency (%)	(samples)	median ng/L	mean ng/L	(RSD)%	max ng/L	frequency (%)	(samples)	median ng/L	mean ng/L	(RSD)%	max ng/L
2,4D	ac	33	(8)	32.1	88.5	(169)	442	50	(12)	18.8	42.9	(139)	201
Bentazone	ac	0	–	–	–	–	–	4	(1)	12.2	12.2	–	12.2
MCPA	ac	25	(6)	7.78	7.64	(61)	14.0	8	(2)	15.1	15.1	(66)	22.2
Mecoprop	ac	25	(6)	52.9	106	(138)	391	38	(9)	11.6	17.3	(100)	51.4
Alachlor	an	4	(1)	2.59	2.59	–	2.59	0	–	–	–	–	–
Metolachlor	an	0	–	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
Propanil	an	33	(8)	4.02	8.98	(135)	35.9	46	(11)	10.5	9.42	(82)	26.3
Diazinon	or	96	(23)	53.6	133	(153)	684	88	(21)	56.4	281	(319)	4160
Dimethoate	or	25	(6)	1.86	4.00	(105)	10.9	21	(5)	16.9	49.1	(161)	188
Fenitrothion	or	0	–	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
Malathion	or	0	–	–	–	–	–	4	(1)	0.48	0.48	–	0.48
Chlortoluron	ph	13	(3)	4.52	3.94	(28)	4.62	8	(2)	98.2	98.2	(115)	178
Diuron	ph	88	(21)	42.2	93.0	(125)	452	88	(21)	98.0	127	(76)	366
Isoproturon	ph	0	–	–	–	–	–	8	(2)	13.2	13.2	(141)	26.4
Linuron	ph	0	–	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
Molinate	th	0	–	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
Atrazine	tr	17	(4)	1.23	1.24	(38)	1.74	63	(15)	7.40	124	(206)	732
Cyanazine	tr	0	–	–	–	–	–	0	–	–	–	–	–
Desethylatrazine	tr	13	(3)	2.59	24.1	(158)	67.9	4	(1)	22.7	22.7	–	22.7
Deisopropylatrazine	tr	38	(9)	10.3	13.7	(78)	38.6	21	(5)	23.3	38.8	(80)	87.2
Simazine	tr	29	(7)	1.61	7.27	(143)	24.0	54	(13)	12.5	169	(324)	1990
Terbuthylazine	tr	46	(11)	8.80	20.6	(103)	71.3	58	(14)	10.3	20.0	(115)	75.1

ac: acids; an: anilides; or: organophosphates; ph: phenylureas; th: thiocarbamate; tr: triazines.

- different pesticide patterns at the inlet of each plant, with organo-phosphates dominating in plant A, phenylureas in plant B, and organophosphates together with acids in plant C, and,
- an unclear trend in the removal of the various pesticides classes, except in the case of triazines that in all three plants showed usually a comparatively larger contribution in the effluent than in the influent samples denoting a comparatively worse removal than the other pesticides classes.

In order to explore potential relations between the results and the WWTPs, the PCA statistical test was applied to the data (grouped by pesticide class). Three principal components were identified (Fig. 2a) justifying together 93.57% of the cases. In PC1 there is a predominance of triazines, organophosphates and phenylureas; PC2 (22.06%) is dominated by anilides, and in PC3 (22.12%) acids were the principal component. Crossing scores of each PC, three score plots were generated (Fig. 2b). Although none of these plots showed clear relations or trends

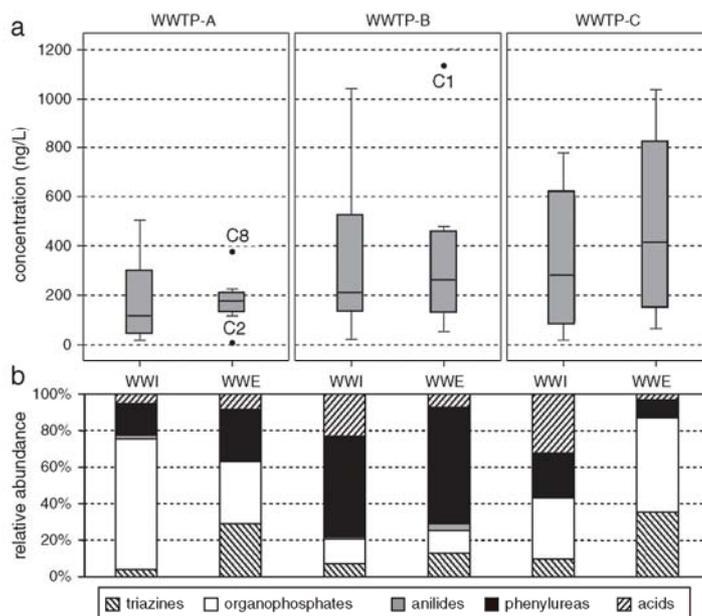


Fig. 1. (a) Levels of total pesticides in WWI and WWE of each plant; (b) relative abundance of pesticide families in the different samples.

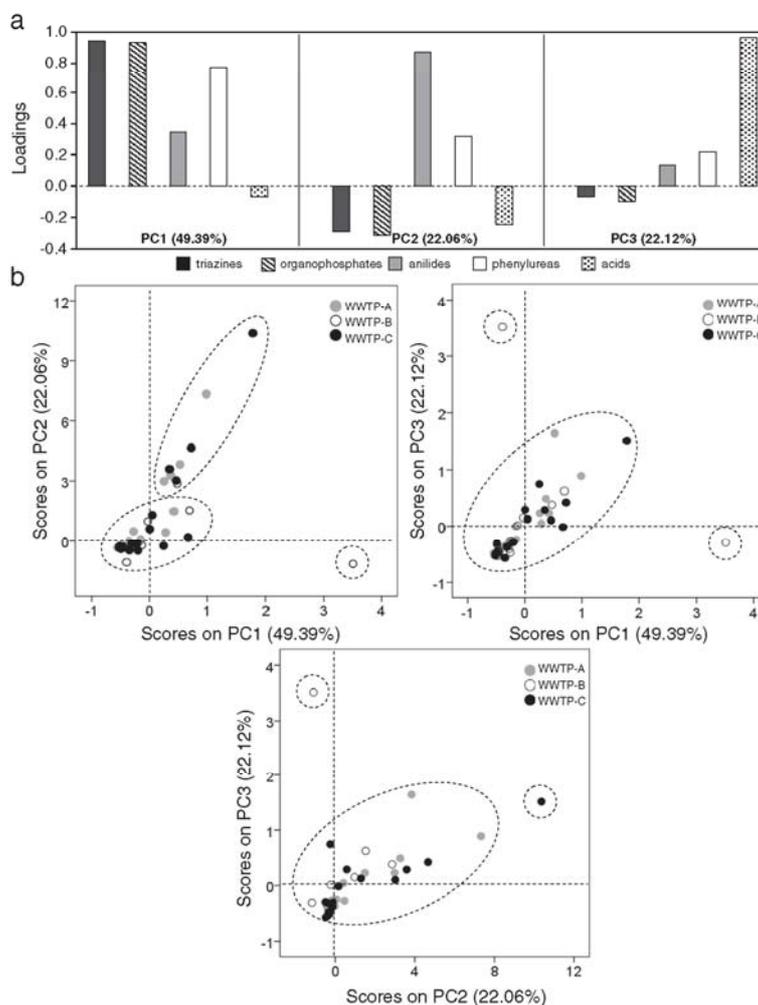


Fig. 2. Principal component analysis results. (a) Loadings for the three principal components. (b) Scores plots for the PC1&PC2, PC1&PC3 and PC2&PC3.

between the WWTPs, it is interesting to note that almost 94% of cases are justified with three contamination profiles, being triazines, organophosphates and phenylureas the most relevant compounds in accordance with their higher frequency of detection and concentration.

As regards removal, the present study clearly shows poor removal of the pesticides in WWTPs B and C, and to a lesser extent in plant A. Plants B and C presented considerably high concentrations of total pesticides in the effluents, and in several cases concentrations higher in the treated water than in the raw water. In all three plants, the median total pesticide concentration in WWI was lower than the median found in the respective WWE.

According to the average removal rates calculated for the various compounds the pesticides with the poorest removals are atrazine, malathion, isoproturon and bentazone, which show concentrations always higher in the effluent than in the influent (the last 3 compounds, in fact, were only detected in 1–2 effluent samples), followed by the triazines simazine and terbutylazine. At the other end, the pesticides most efficiently eliminated from the aqueous phase are alachlor, DEA, MCPA and DIA. Crosschecking of this “IN–OUT balance”

with the physical–chemical properties of the compounds (octanol–water partition coefficient, water solubility, and groundwater ubiquity score (GUS) index) did not show any significant correlation.

Works published regarding the occurrence and removal of pesticides in WWTPs at real field scale suggest poor WWTPs performance.

Morasch et al. (2010) investigated the occurrence and removal of 58 micropollutants (including various pesticides and among them atrazine, diuron, isoproturon, mecoprop and diazinon) in a WWTP without TT (treatment was based on chemical precipitation followed either by an activated sludge stage (ca. 70% of the volume) or by sedimentation) and found high removal efficiencies, between 70 and 98%, for some pesticides (chloridazon, tebufenozide, IPBC, and irgarol), whereas others (carbendazim, diazinon, terbutryn) were eliminated to a lower extent or not eliminated at all (atrazine, mecoprop, propiconazole) (Morasch et al., 2010).

Singer et al. (2010) evaluated the removal of several pesticides (including diazinon, diuron, atrazine, desethylatrazine, terbutylazine, isoproturon and mecoprop) in a WWTP after secondary (activated sludge followed by secondary settling) plus tertiary treatment

(sand filtration) and found for almost all the pesticides investigated in our study eliminations below 50%, whereas mecoprop showed negative elimination.

Stamatis et al. (2010) evaluated the occurrence and removal of widely used fungicides in a municipal WWTP operating with primary (mechanical), secondary (activated sludge) and tertiary (sand filtration and chlorination) treatments and, with the exception of triadimefon, all the fungicides showed relatively low removal rates: 31–49% after primary and secondary treatment, 22–39% due to tertiary treatment, 46–68% after the complete process. Even worse removal efficiencies were observed by Kahle et al. (2008) for the azole fungicides propiconazole and tebuconazole in various Swiss WWTPs with mechanical, biological (activated sludge) and chemical treatments (phosphate co precipitation with iron salts, without chlorination) followed by sand filtration (with flocculation), where the target compounds passed largely unaffected. Considerably better results, however, were obtained by Pitarch et al. (2010) for various pesticides (including dimethoate, diuron, malathion, simazine, and terbuthylazine) in a municipal solid-waste treatment plant using reversed osmosis as TT. Likewise, Teijon et al. (2010) tested the removal of pesticides (including atrazine, diuron, isoproturon, and simazine) in a tertiary WWTP with and without an additional treatment based on ultrafiltration, reverse osmosis and UV disinfection, and found hardly any removal when the additional treatment was not applied and removals up till 90% when it was (e.g. the concentration of diuron changed from 324 ng/L in the influent to 219 ng/L and 30.7 ng/L in the effluent without and with additional treatment, respectively).

3.3. Why these poor removals?

Pesticides removal in the WWTPs was variable and often poor, with concentrations in the effluent sometimes higher than in the corresponding influent. In many cases, and as a result of the many studies carried out for pharmaceuticals in WWTPs (Gomez et al., 2007; Gracia-Lor et al., 2010; Gros et al., 2010; Jelic et al., 2011; Kasprzyk-Hordem et al., 2008; Kovalova et al., 2012; Le Corre et al., 2012; Petrovic et al., 2008, 2009; Reungoat et al., 2010; Zhang et al., 2008), the "negative" removal of organic compounds is explained by the formation of unmeasured products of human metabolism and/or transformation products that, passing through the plant, are converted back to the parent compounds (Jelic et al., 2011). In the case of pesticides, this is an argument that in fact cannot be ruled out since the human daily intake of pesticides through the diet can be important (Margni et al., 2002) (and the same may occur in the case of animals, e.g. cattle) and the ingested pesticides can be metabolized and excreted in a way similar to that of pharmaceuticals. Studies on the metabolism of endosulfan using human liver microsomes have demonstrated, for instance, that endosulfan is metabolized in humans to endosulfan sulfate (<http://www.ecu.edu/cs-dhs/agromedicine/pesticides.cfm>), in the same way as other compounds such as estrogens (whose concentration has been also shown to increase in WWTPs due to deconjugation of their sulfate and glucuronide metabolites) do (Petrovic et al., 2008). Glutathione conjugates are also known metabolites of pesticides (Fujioka and Casida, 2007; Pérez et al., 2007). However, confirmation of such a hypothesis would require, first, a deeper knowledge on the human metabolism of pesticides, and second, the analysis of the pesticides metabolic forms in wastewater to confirm their presence and eventual transformation back into the parent active ingredient during the sewage treatment process.

Another possible reason behind the observation of pesticides concentrations higher in the effluents than in the corresponding WWTP influents can be the existence of method biases associated to matrix effects. As it is well known, matrix effects in LC-MS/MS usually result in signal suppression effects (though signal enhancement also occurs in some cases) that, if not appropriately corrected, translate into inaccurate, lower than real results, whose error increases with the complexity of the matrix. This possibility, however, can be largely ruled out due to

the use of isotope dilution for quantification, a technique that is in fact applied with the main objective of correcting for these potential matrix effects as well as for other possible error sources in the analytical method (Marin et al., 2009).

The matrix-dependent method performance parameter that cannot be compensated for through the use of isotope dilution is the sensitivity. The LOD and Ldet listed in Table 1 clearly show higher values in the WWI matrix than in the WWE. This can lead to comparatively higher frequencies of detection in WWE than in WWI, especially in the case of those compounds that show largely different Ldet in both types of matrices. This situation might occur, for instance, in the case of diuron, whose Ldet in WWE is 2.57, versus 39.04 ng/L in WWI, or in the case of atrazine (Ldet = 0.53 in WWE and 21.63 in WWI). However, the concentrations found are often well above the corresponding compound Ldet in both matrices, and still indicate negative removals.

Hydrolysis processes could also explain higher levels in the WWE than in the WWI. Singer et al. (2010) found a negative elimination for mecoprop, with levels in the tertiary effluent 11% higher than in the primary effluent. Since mecoprop is frequently sold under an ester formulation (e.g. ethylhexylester, octylester), the authors believe that mecoprop leaches into the WWTP as an ester and that it is afterwards hydrolysed forming mecoprop during the secondary treatment (Singer et al., 2010).

Another possible reason for these striking findings can be found in the sampling. Ort et al. (2010) have published recently a critical review about sampling in wastewater systems according to which, with increasing accuracy of chemical analyses, inappropriate sampling increasingly represents the major source of inaccuracy. In our case, three main factors could be affecting the accuracy of the data obtained: sample collection (in particular, sampling type and HRT), sample preservation, and also rainfall events.

Rainfall events can influence the pollutant concentration not only in the sewers but also in the WWTPs. However, no relevant rain events happened to occur in any one of the 24-h periods of sampling performed.

As regards sample collection, failure to appropriately and timely collect influent and effluent samples from a given WWTP considering the plant HRT might indeed yield unrealistically bad results in terms of removal efficiency due to the lack of correlation between both samples. However, the HRT of the plants was considered in all cases, and the sampling type (time-proportional with collection of 50-mL sub-samples every 30 min during 24 h) was the same for both (WWI and WWE) matrices. In only a few isolated cases samples were discrete instead of composite. This aspect (snap vs integrated sampling) and the sample preservation conditions were evaluated in a separated experiment conducted ad hoc, and discussed in the following section.

3.4. Sample preservation

Losses of pesticides during integrated sampling (and storage) of water can occur mainly as a result of hydrolysis, biodegradation, photolysis and evaporation processes (Barcelo and Alpendurada, 1996; Luque and Rubio, 2012). These processes affect differently to the various compounds; hence, triazines, chloroanilides and phenoxy acids, for instance, appear to be more stable than other pesticide classes such as organophosphorous and carbamate pesticides (Aboufadel et al., 2010; Barcelo and Alpendurada, 1996; Ferrer and Barcelo, 1996). To avoid or minimize these losses different strategies have been adopted: basically, chemical addition (e.g., chloroform, HgCl₂) (Bedding et al., 1988; Bourne, 1978; Jeannot, 1994), refrigeration (Casas et al., 2007), and acidification, as well as storage of the samples after solid phase extraction (SPE) in the cartridge or disk or in the resulting organic extract (Crescenzi et al., 1995; Lyytikäinen et al., 2003).

In an attempt to assess potential losses of the compounds during sampling a specific experiment was conducted in one of the WWTP under study. For the experiment, discrete and integrated samples,

both with and without formaldehyde 1% (v/v), were taken at the influent and after both secondary and tertiary treatments (ST and TT, respectively) from the WWTP-A, taking into account the HRT. For samples with formaldehyde, 65 mL of formaldehyde solution 37% (solution stabilized with 10% of methanol from Merck) were added to the 5 L sampler bottle just before the sampling of 2.4 L of water. In the case of the integrated samples, 50 mL of water were collected each 30 min for 24 h (50 mL × 48 aliquots = 2.4 L).

Fig. 3 shows the total pesticides levels and the levels of the most abundant individual pesticides in the test samples. Of all target compounds, only 10 were detected and from those 4 compounds were measured at concentrations higher than 20 ng/L (those shown in the figure) and six were detected at lower levels (2,4-D, terbutylazine, simazine, desethylatrazine, atrazine and isoproturon).

When looking at the figure the first clear observation is that, in general, regardless of the type of sample (discrete or integrated, with or without formaldehyde) the total pesticides levels increase after the secondary treatment and decrease thereafter, after the tertiary treatment, to levels close to those measured in the influent. A different trend, with total pesticides levels decreasing throughout the whole process, is only shown by the integrated samples collected without chemical preservation.

Another quite striking result is the similarity of results obtained for the individual compounds within each matrix type (influent, secondary effluent, and tertiary effluent) independent of the type of sampling (discrete or integrated) and the preservation conditions (with and without formaldehyde).

When comparing discrete versus integrated samples, notable differences can be observed in the individual and the total pesticide concentrations only in the influent (with in general higher concentrations in the integrated than in the discrete samples), reflecting the existence of fluctuations in the input of pesticides with time. In the secondary and tertiary effluents, however, the pesticide profile observed in the discrete and the integrated samples is very similar, which would reflect the settlement and homogenization of the water during the treatment process.

On the other hand, the comparison of unpreserved with preserved samples, shows that the addition of formaldehyde either has no effect on the individual and the total pesticide concentrations measured or, contrary to what one could expect, leads to the obtention of, in general, lower rather than higher concentrations in the preserved samples than in the unpreserved ones.

Having thus discarded biodegradation as a relevant process during integrated sampling, other possible explanations for the results found include: (a) desorption of pesticides eventually adsorbed to the suspended organic matter; (b) atmospheric dry and/or wet deposition

in outdoor installations (e.g. flocculation and decantation tanks) of aerial pesticides used, for instance, in agricultural and green zones (golf course, parks, etc.); and (c) use of pesticides in the WWTPs themselves, for instance, to combat mosquitoes. Processes (a) and (b) could contribute to increase the concentration of dissolved pesticides in the aqueous phase; however, confirmation of these hypothesis and elucidation of the factors and conditions that may be behind them require more detailed studies. Concerning item (c), technicians at the plant C have declared not to use any pesticide whereas plants A and B use diflubenzuron, a persistent urea derivative insecticide, to control a wide range of leaf-eating insects, and plant A uses also Vectobac 12, a biological insecticide whose active ingredient is the bacterium *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. Hence, this last hypothesis (c) can be dismissed.

Another general conclusion is that the tertiary treatment applied (chlorination, micro filtration, coagulation and flocculation) is only partially effective at removing the pesticides: it worked well in the case of diazinon and bentazone, but other compounds such as mecoprop, diuron, 2,4-D and terbutylazine passed it practically unaltered.

In summary, removal in the WWTPs was variable and frequently poor, with concentrations in the effluent sometimes higher than in the corresponding influent without a conclusive explanation. An evident result, however, is the high levels of pesticides that are introduced daily into the rivers through the WWTPs effluents. This has been put into evidence also by Gerecke et al. (2002), who analyzed sources of pesticides in surface water and discovered that pesticides used for additional purposes in urban areas enter surface waters up to 75% through WWTPs.

The importance of the urban sources of pesticides for the pollution of the aquatic systems has also been highlighted by Burkhardt et al. (2007) in a study conducted in Switzerland. They monitored various biocides, including diuron, mecoprop and terbutryn, in storm water runoff and concluded that in the area of study (where there is not agricultural activity) building envelopes, i.e. facades (paints, plasters) and roof sealing membranes, are relevant sources of diffuse water pollution by these compounds.

3.5. ERPW index

The introduction of these pesticides in rivers presents a risk to the aquatic environment; however, high concentrations do not necessarily imply greater risk. Some pesticides, such as malathion, are extremely toxic to aquatic invertebrates but do not represent a big risk to algae. The opposite is observed for other compounds like diuron, very toxic to algae but little to aquatic invertebrates. The degree of removal of these contaminants in WWTPs is also an important aspect in terms of

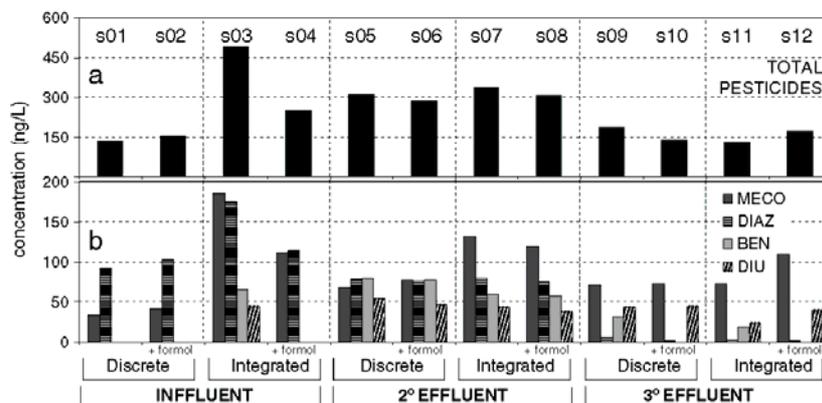


Fig. 3. Levels of (a) total and (b) individual (the most abundant) pesticides in the sample preservation test.

risk as it helps identify which are the most recalcitrant compounds during wastewater treatment and hence the most persistent and relevant pesticides to the aquatic environment.

Attending to these considerations, a new index, the Environmental Relevance of Pesticides from Wastewater treatment plants Index (ERPWI), is proposed. This index embraces not only the occurrence and removal of pesticides in wastewater treatment installations, but also the toxicity of each pesticide against three aquatic organisms: algae, *daphnia* and fish, according to the following equation:

$$\text{ERPWI} = \text{TUp} \times S_{\text{rem}} \times 1000$$

where TUp = pesticide concentration in WWE (mg/L)/end point (EC50; LC50...) (mg/L), and

S_{rem}	removal score
EC50	fifty percent effective concentration in mg/L
LC50	fifty percent lethal concentration in mg/L.

TUp corresponds to the ratio between the concentration of the individual pesticide (p) and its critical toxicological end point for the test organism (i.e., EC50, LC50, NOEC—see Table S2 in supporting information). S_{rem} is the removal score assigned to the pesticide on the basis of its removal rate in each WWTP. Table 3 lists the removal scores S_{rem} assigned to the various removal rate intervals, and the classification in terms of levels of risk attributed to the ERPWI according to its value.

The ERPWI classification was set taking into account: (a) the classification into high, medium and low risk given to a compound based on its LC50 or EC50 for each aquatic organism; (b) the WWE concentration; and (c) the high, medium or low removal of the compound observed during the WWTP process. Importantly, the international toxicity classification of the EC50 for algae as low (>10), medium (0.01–10) and high (<0.01), is ten times smaller than the international classification for fish and *daphnia* (low: >100, medium: 0.1–100 and high: <0.1). With the objective to make the values of the ERPWI calculated for the three aquatic organisms comparable and amenable to the same ERPWI classification, the EC50 for algae has been increased tenfold. With the equation and variables defined the index for each sample of the three WWTPs and for each aquatic organism was calculated. Fig. 4 shows the average relative removal of each detected pesticide (calculated as described previously in Section 2.4), the water cycle spreading index (WCSI) calculated according to (Reemtsma et al., 2006), and the ERPWI. The WCSI is the ratio between the effluent concentration of the compound and its relative removal in a WWTP. Comparing the WCSI and the ERPWI indexes it is possible to see the relevance of the toxicity as a variable to be taken into account when evaluating the risk associated to a pesticide. According to the WCSI, the most relevant pesticides are diazinon, mecoprop and diuron; however, according to the ERPWI the acid herbicide mecoprop is one of the less relevant. The explanation can be found on its aquatic toxicity, which is extremely low (237, 420 and 150 mg/L for algae, *daphnia* and fish, respectively), in contrast to that of the herbicide diuron (0.0027, 12 and 4.3 mg/L) and the insecticide diazinon (6.4, 0.001 and 3.1 mg/L).

The sensitivity of the ERPWI was checked by plotting the ERPWI as a function of the concentration of each pesticide in the effluent of

each WWTP. As an example, the sensitivity test for diuron for each organism is shown in Fig. 4d. The hypothetical ERPWI for *daphnia* as a function of the concentration of diazinon (LC50 0.001 mg/L) in WWI is shown in Fig. 4e. As it can be seen, 50 ng/L of diazinon in the influent without elimination during the treatment presents the same environmental relevance than 200 ng/L with 25–50% removal or 600 ng/L with 50–75% removal, which is considered a coherent equivalence.

In summary, the ERPWI, which could also be applied to other facilities like industrial water treatment plants, gives an idea of which are the most problematic pesticides for the aquatic environment in a given area taking into account their occurrence in the wastewater, their removal through the wastewater treatment, and their toxicity to aquatic organisms. In our study and according to this index, diazinon and diuron are highly relevant, the triazines atrazine, simazine and terbuthylazine, malathion, and the phenylureas isoproturon and chlortoluron would be in the middle, and, to the other end, as the less relevant pesticides in terms of risk for the aquatic environment would be MCPA and mecoprop. These results are actually full in line with the Directive 2008/105/EC (Council of the European Communities, 2008), which sets maximum allowable concentrations (MAC) in inland and other surface waters for most of these compounds (0.7, 2.0, 1.8, 1.0 and 4 µg/L for alachlor, atrazine, diuron, isoproturon and simazine, respectively).

4. Conclusions

Contamination of the aquatic environment by pesticides in urban areas cannot be neglected. The present study demonstrates the occurrence of these contaminants at considerably high concentrations in raw wastewaters (up to 684 ng/L for diazinon) and their persistence in the treated waters after conventional secondary (and even tertiary) wastewater treatment. Even more, an increase in some pesticides concentration in the effluent is often observed. Possible explanations for these poor or negative removal rates are deconjugation of metabolites and/or transformation products of the pesticides, hydrolysis, and desorption from particulate matter during wastewater treatment. A new index, the ERPWI, that considers the concentration in wastewater, the removal during wastewater treatment, and the toxicity to aquatic organisms, is proposed to assess the aquatic environmental relevance of pesticides present in WWs. According to this index the most problematic compounds in the area of study are diazinon and diuron, followed by, in this order, atrazine, simazine, malathion, chlortoluron, terbuthylazine and isoproturon. Most of these compounds, namely, diuron, atrazine, simazine and isoproturon, are actually included in the list of priority substances in the field of water and are subjected to environmental quality standards (EQS), a circumstance that comes to somewhat validate this index.

Acknowledgments

The work has been financially supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the projects SOSTAQUA (CEN 2007–1039) (led by Aguas de Barcelona and financed by the CDTI (Centre for the Development of Industrial Technology) in the framework of the Ingenio 2010 program under the CENIT call), SCARCE (Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065) and CEMAGUA (CGL2007-64551/HID), and by the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group: Water and Soil Quality Unit 2009-SGR-965). Merck is acknowledged for the gift of LC columns. Marianne Köck Schulmeyer acknowledges the European Social Fund and AGAUR (Generalitat de Catalunya, Spain) for their economical support through the FI pre-doctoral grant. Damià Barceló acknowledges financial support from the Visiting Professor Program of the King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia. The heads of the wastewater treatment plants are also acknowledged for their collaboration in sampling and for the information provided on the plants.

Table 3
Removal intervals, removal scores (S_{rem}) and ERPWI classification.

Removal (%)	S_{rem}	ERPWI	Level of risk
75–100	0.2	>10	Very high
50–75	0.4	1–10	High
25–50	0.6	0.01–1	Medium
0–25	0.8	0.001–0.01	Low
<0	1.0	<0.001	Negligible

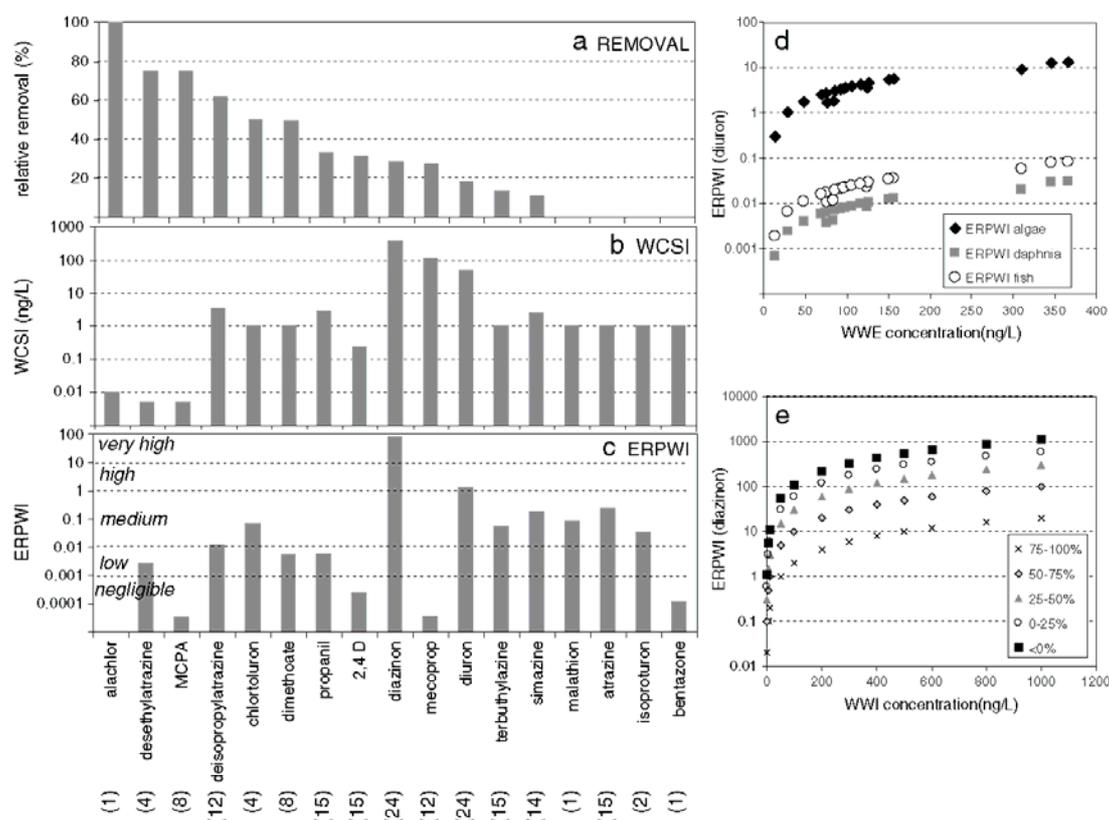


Fig. 4. (a) Average relative removal of the detected pesticides in the three WWTPs; (b) average WCSI calculated as indicated in Reemtsma et al. (2006); (c) mean value of ERPWI for the three WWTPs and the three aquatic organisms (algae, *daphnia* and fish); (d) real ERPWI for diuron in the effluent of a WWTP for each aquatic organism separately; (e) theoretical ERPWI for diazinon (EC50: 0.001 mg/L) against *daphnia* as a function of the concentration in the influent of a WWTP for each concentration removal interval. Numbers in parentheses in graphic (c) indicate the number of pairwise cases evaluated (influent vs effluent).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.010>.

References

Aboulfadl K, De Potter C, Prevost M, Sauve S. Time-dependent integrity during storage of natural surface water samples for the trace analysis of pharmaceutical products, feminizing hormones and pesticides. *Chem Cent J* 2010;4:8.
 Ahmad T, Rafatullah M, Ghazali A, Sulaiman O, Hashim R, Ahmad A. Removal of pesticides from water and wastewater by different adsorbents: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2010;28:231–71.
 Barata C, Damasio J, Lopez MA, Kuster M, de Alda ML, Barcelo D, et al. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:370–9.
 Barcelo D, Alpendurada MF. A review of sample storage and preservation of polar pesticides in water samples. *Chromatographia* 1996;42:704–12.
 Barcelo D, Hennion MC. Trace determination of pesticides and their degradation products in water, vol. 19. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2003.
 Bedding ND, McIntyre AE, Lester JN, Perry R. Analysis of waste-waters for polynuclear aromatic hydrocarbons. 1. Method development and validation. *J Chromatogr Sci* 1988;26:597–605.
 Bourne S. Preservation of organophosphorous pesticides in water samples. *J Environ Sci Health B* 1978;13:75–86.
 Bueno MJ, Agüera A, Hernando MD, Gómez MJ, Fernández-Alba AR. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *J Chromatogr A* 2009;1216:5995–6002.

Burkhardt M, Kupper T, Hean S, Haag R, Schmid P, Kohler M, et al. Biocides used in building materials and their leaching behavior to sewer systems. *Water Sci Technol* 2007;56:63–7.
 Cahill MG, Caprioli G, Stack M, Vittori S, James KJ. Semi-automated liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for basic pesticides in wastewater effluents. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:587–94.
 Casas V, Llompard M, Garcia-Jares C, Cela R, Dagnac T. Effects of sample pretreatment and storage conditions in the determination of pyrethroids in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1841–9.
 Council of the European Communities. Decision 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy. *Off J Eur Community L* 2008;348:84.
 Crescenzi C, Dicorcia A, Madbouly MD. Pesticide stability studies upon storage in a graphitized carbon-black extraction cartridge. *Environ Sci Technol* 1995;29:2185–90.
 Cruz-Guzman M, Celis R, Hermosin MC, Koskinen WC, Cornejo J. Adsorption of pesticides from water by functionalized organobentonites. *J Agric Food Chem* 2005;53:7502–11.
 Ferrer I, Barcelo D. Determination and stability of pesticides in freeze-dried water samples by automated on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode-array detection. *J Chromatogr A* 1996;737:93–9.
 Fujioka K, Casida JE. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chem Res Toxicol* 2007;20:1211–7.
 Gerecke AC, Schärer M, Singer HP, Müller SR, Schwarzenbach RP, Sagesser M, et al. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere* 2002;48:307–15.
 Gomez MJ, Agüera A, Mezcuca M, Hurtado J, Mocholi F, Fernandez-Alba AR. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater. *Talanta* 2007;73:314–20.

- Gracia-Lor E, Sancho JV, Hernandez F. Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010;1217:622–32.
- Gros M, Petrovic M, Ginebreda A, Barcelo D. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ Int* 2010;36:15–26.
- Gupta VK, Ali I, Suhas, Saini VK. Adsorption of 2,4-D and carbofuran pesticides using fertilizer and steel industry wastes. *J Colloid Interface Sci* 2006;299:556–63.
- Jeannot R. Preservation techniques for analysis of organic-compounds in water samples—a review. *Int J Environ Anal Chem* 1994;57:231–6.
- Jelic A, Gros M, Ginebreda A, Cespedes-Sanchez R, Ventura F, Petrovic M, et al. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Res* 2011;45:1165–76.
- Kahle M, Buerge IJ, Hauser A, Muller MD, Poiger T. Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ Sci Technol* 2008;42:7193–200.
- Kampioti AA, da Cunha ACB, de Alda ML, Barcelo D. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005;382:1815–25.
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:1293–308.
- Kock M, Farre M, Martinez E, Gajda-Schranz K, Ginebreda A, Navarro A, et al. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *J Hydrol* 2010;383:73–82.
- Köck-Schulmeyer M, Ginebreda A, Postigo C, López-Serna R, Pérez S, Brix R, et al. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: the impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain). *Chemosphere* 2011;82:670–8.
- Köck-Schulmeyer M, Ginebreda A, Gonzalez S, Cortina JL, Lopez de Alda M, Barcelo D. Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain). *Chemosphere* 2012;86:8–16.
- Kovalova I, Siegrist H, Singer H, Wittmer A, McArdell CS. Hospital wastewater treatment by membrane bioreactor: performance and efficiency for organic micropollutant elimination. *Environ Sci Technol* 2012;46:1536–45.
- Kuster M, de Alda MJL, Barata C, Raldua D, Barcelo D. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 2008a;75:390–401.
- Kuster M, Jose Lopez de Alda M, Dolores Hernandez M, Petrovic M, Martin-Alonso J, Barcelo D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J Hydrol* 2008b;358:112–23.
- Le Corre KS, Ort C, Kately D, Allen B, Escher BI, Keller J. Consumption-based approach for assessing the contribution of hospitals towards the load of pharmaceutical residues in municipal wastewater. *Environ Int* 2012;45:99–111.
- Luque N, Rubio S. Extraction and stability of pesticide multiresidues from natural water on a mixed-mode admicellar sorbent. *J Chromatogr A* 2012;1248:74–83.
- Lyytikäinen M, Kukkonen JVK, Lydy MJ. Analysis of pesticides in water and sediment under different storage conditions using gas chromatography. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;44:437–44.
- Margni M, Rossier D, Crettaz P, Jolliet O. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agric Ecosyst Environ* 2002;93:379–92.
- Marin JM, Gracia-Lor E, Sancho JV, Lopez FJ, Hernandez F. Application of ultra high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples. Study of matrix effects. *J Chromatogr A* 2009;1216:1410–20.
- Memon GZ, Bhangar ML Akhtar M, Talpur FN, Memon JR. Adsorption of methyl parathion pesticide from water using watermelon peels as a low cost adsorbent. *Chem Eng J* 2008;138:616–21.
- Morasch B, Bonvin F, Reiser H, Grandjean D, de Alencastro LF, Perazzolo C, et al. Occurrence and fate of micropollutants in the vidy bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:1658–68.
- Munoz I, Gomez-Ramos MJ, Agüera A, Garcia Reyes JE, Molina-Diaz A, Fernandez-Alba AR. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *TrAC Trends Anal Chem* 2009;28:676–94.
- Ninkovic MB, Petrovic RD, Lausevic MD. Removal of organochlorine pesticides from water using virgin and regenerated granular activated carbon. *J Serb Chem Soc* 2010;75:565–73.
- Ochoa V, Riva C, Faria M, de Alda ML, Barcelo D, Tejedor MF, et al. Are pesticide residues associated to rice production affecting oyster production in Delta del Ebro, NE Spain? *Sci Total Environ* 2012;437:209–18.
- Ormad MP, Miguel N, Claver A, Matesanz JM, Ovelleiro JL. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere* 2008;71:97–106.
- Ormad MP, Castillo JG, Cid BM. Eliminación de plaguicidas en aguas de abastecimiento mediante cloración, ozonización y adsorción con GAC. *Tecnol Agua* 2009;29:24–9.
- Ormad M, Miguel N, Mosteo R, Rodriguez J, Ovelleiro JL. Study of the presence of pesticides in treated urban wastewaters. In: Stoytcheva M, editor. Pesticides in the modern world — risks and benefits. Croatia: InTech; 2011. p. 453–70.
- Ort C, Lawrence MG, Rieckermann J, Joss A. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems: are your conclusions valid? A critical review. *Environ Sci Technol* 2010;44:6024–35.
- Palma P, Kuster M, Alvarenga P, Palma VL, Fernandes RM, Soares AMVM, et al. Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Environ Int* 2009;35:545–51.
- Pérez S, Farkas M, Barceló D, Aga DS. Characterization of glutathione conjugates of chloroacetanilide pesticides using ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007;21:4017–22.
- Petrovic M, Radjenovic J, Postigo C, Kuster M, Farre M, Alda ML, et al. Emerging contaminants in waste waters: sources and occurrence. In: Barcelo D, Petrovic M, editors. Handbook of environmental chemistry, 5 S1. Volume 5: water pollution; 2008. p. 1–35.
- Petrovic M, De Alda MJL, Diaz-Cruz S, Postigo C, Radjenovic J, Gros M, et al. Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philos Trans R Soc Lond A* 2009;367:3979–4003.
- Pitarch E, Portoles T, Marin JM, Ibanez M, Albarran F, Hernandez F. Analytical strategy based on the use of liquid chromatography and gas chromatography with triple-quadrupole and time-of-flight MS analyzers for investigating organic contaminants in wastewater. *Anal Bioanal Chem* 2010;397:2763–76.
- Postigo C, de Alda MJL, Barcelo D, Ginebreda A, Garrido T, Fraile J. Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): an approach based on on-line solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry detection. *J Hydrol* 2010;383:83–92.
- Reemtsma T, Weiss S, Mueller J, Petrovic M, Gonzalez S, Barcelo D, et al. Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: a European perspective. *Environ Sci Technol* 2006;40:5451–8.
- Reungoat J, Macova M, Escher BI, Carswell S, Mueller JF, Keller J. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Res* 2010;44:625–37.
- Ricart M, Guasch H, Barcelo D, Brix R, Conceicao MH, Geislinger A, et al. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: pesticide effects on biological communities. *J Hydrol* 2010;383:52–61.
- Rodriguez A, Garcia J, Luis Sotelo J, Ovejero G, Mestanza M. Removal of the pesticides diazinon and carbofuran in aqueous solutions by activated carbon. *Fresenius Environ Bull* 2009;18:2093–101.
- Rodriguez-Cruz MS, Andrades MS, Parada AM, Sanchez-Martin MJ. Effect of different wood pretreatments on the sorption–desorption of linuron and metalaxyl by woods. *J Agric Food Chem* 2008;56:7339–46.
- Silva M, Fernandes A, Mendes A, Manaiá CIM, Nunes OC. Preliminary feasibility study for the use of an adsorption/bio-regeneration system for molinate removal from effluents. *Water Res* 2004;38:2677–84.
- Singer H, Jaus S, Hanke I, Lueck A, Hollender J, Alder AC. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environ Pollut* 2010;158:3054–64.
- Singh N. Adsorption of herbicides on coal fly ash from aqueous solutions. *J Hazard Mater* 2009;168:233–7.
- Stamatis N, Hela D, Konstantinou I. Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *J Hazard Mater* 2010;175:829–35.
- Tejón G, Candelá I, Tamoh K, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci Total Environ* 2010;408:3584–95.
- Terrado M, Kuster M, Raldua D, De Alda ML, Barcelo D, Tauler R. Use of chemometric and geostatistical methods to evaluate pesticide pollution in the irrigation and drainage channels of the Ebro river delta during the rice growing season. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1479–88.
- Wittmer IK, Bader HP, Scheidegger R, Singer H, Luck A, Hanke I, et al. Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water Res* 2010;44:2850–62.
- Zhang YJ, Geissen SU, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 2008;73:1151–61.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1 (supporting information): Characteristics of the sampled WWTPs

	WWTP-A	WWTP-B	WWTP-C
Wastewater treatment plant characteristics			
Type of wastewater	predominantly municipal wastewater	predominantly municipal wastewater	important industrial contribution
Type of treatment	Biological + Tertiary	Biological	Biological
HRT (h)	26-40	20	40
Population Equivalent (design)	210583	175000	204166
habitants (2009)	63251	135804	50608
tertiary treatment	chlorination, micro filtration, coagulation and flocculation
Wastewater characteristics			
SS-influent (mg/L)	191	330	750
SS-effluent (mg/L)	43	20	10
BOD₅-in (mg/L)	175	390	1130
BOD₅-out (mg/L)	19	14	6
COD-in (mg/L)	393	700	1800
COD-out (mg/L)	82	85	36
Nt-in (mg/L)	39	70	126
Nt-out (mg/L)	25	42	11
Pt-in (mg/L)	6	8	16
Pt-out (mg/L)	4	3	1
Teffluent °C	n.d.	20.6	22.5
pH-influent	7.7	n.d.	7.5
pH-effluent	7.3	7.2	7.2
Sludge characteristics			
Nt-sludge (%)	5.4	5.9	5.1
N-amonium (%)	1.2	2.9	1.1
N-organic (%)	4.2	2.9	4.1
P(P₂O₅) (%)	3	5	3.6
K(K₂O) (%)	0.3	0.3	0.2
pH-sludge	6.5	6.4	7.6

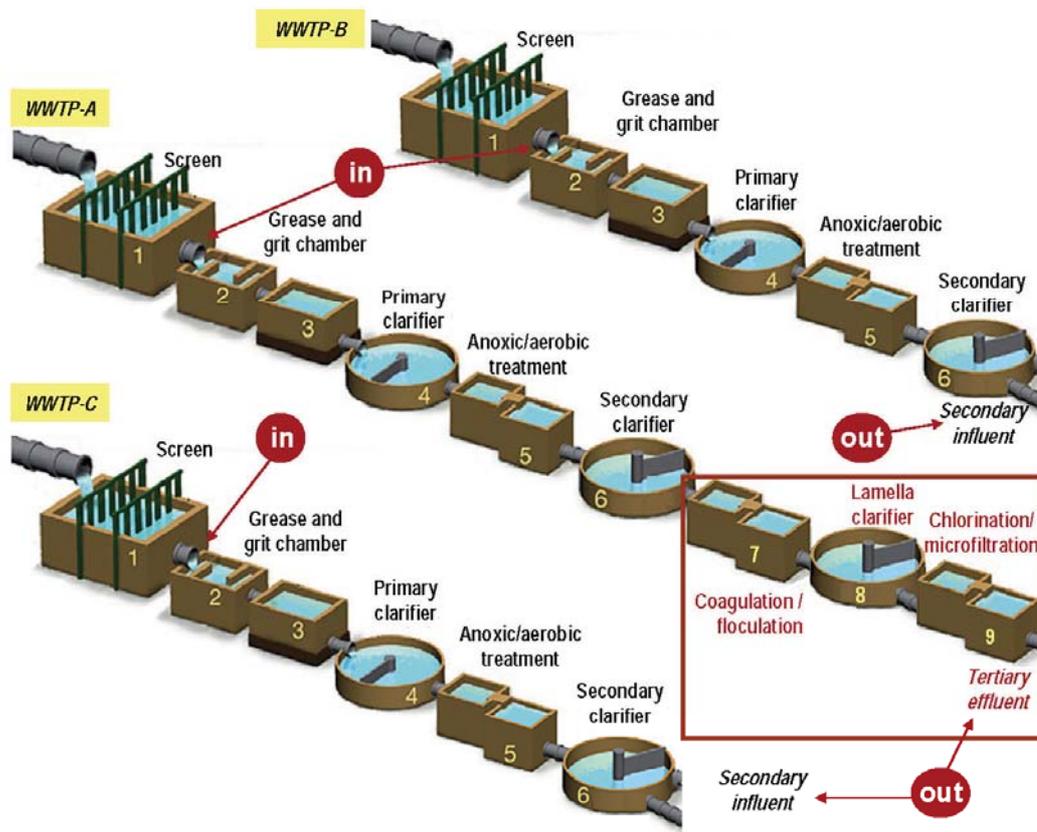


Table S2 (supporting information): EC50 / LC50 of the target pesticides for algae, *Daphnia* and fish, and LogK_{ow} of each pesticide.

	A (algae) EC50^a (mg L⁻¹)	B (<i>Daphnia</i>) EC50^b (mg L⁻¹)	C (Fish) LC50^c (mg L⁻¹)	LogK_{ow}⁽⁸⁾
Triazines				
atrazine	0.059 ⁽¹⁾	6.9 ⁽⁷⁾	4.5 ⁽¹⁾	2.7
cyanazine	0.2 ⁽³⁾	49 ⁽⁵⁾	10 ⁽⁶⁾	2.1
desethylatrazine	0.1 ⁽³⁾	6.9 ^e	4.5 ^e	1.51
deisopropylatrazine	0.050 ^d	3.795 ^d	47.25 ^d	1.15
simazine	0.04 ⁽¹⁾	1.1 ⁽¹⁾	90 ⁽¹⁾	2.3
terbutylazine	0.012 ⁽²⁾	21.2 ⁽⁵⁾	2.2 ⁽²⁾	3.4
Phenylureas				
chlortoluron	0.024 ⁽²⁾	67 ⁽²⁾	20 ⁽²⁾	2.5
diuron	0.0027 ⁽³⁾	12 ⁽⁷⁾	4.3 ⁽⁵⁾	2.87
isoproturon	0.013 ⁽²⁾	507 ⁽⁷⁾	37 ⁽⁷⁾	2.5
linuron	0.016 ⁽²⁾	0.12 ⁽⁷⁾	3.15 ⁽⁷⁾	3
Organophosphates				
diazinon	6.4 ⁽²⁾	0.001 ⁽²⁾	3.1 ⁽²⁾	3.69
dimethoate	90.4 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	30.2 ⁽²⁾	0.704
fenitrothion	1.3 ⁽²⁾	0.0086 ⁽²⁾	1.3 ⁽²⁾	3.32
malathion	13 ⁽¹⁾	0.0007 ⁽²⁾	0.1 ⁽⁷⁾	2.75
Anilides and Chloroacetanilides				
alachlor	0.966 ⁽³⁾	10 ⁽³⁾	1.8 ⁽¹⁾	3.09
metolachlor	57.1 ⁽³⁾	23.5 ⁽⁴⁾	3.9 ⁽⁴⁾	3.4
propanil	0.05 ⁽⁹⁾	4.8 ⁽⁷⁾	2.3 ⁽⁵⁾	2.29
Thiocarbamate				
molinate	0.5 ⁽²⁾	14.9 ⁽²⁾	16 ⁽²⁾	2.86
Acids				
2,4D	24.2 ⁽²⁾	100 ⁽²⁾	100 ⁽⁷⁾	-0.83
bentazone	10.1 ⁽²⁾	125 ⁽⁷⁾	100 ⁽²⁾	-0.46
MCPA	79.8 ⁽²⁾	190 ⁽²⁾	50 ⁽²⁾	-0.81
mecoprop	237 ⁽²⁾	420 ⁽⁷⁾	150 ⁽⁷⁾	-0.19

a) 72 hrs; b) 48 hrs; c) 96 hrs d) average of ATR with SIM; e) the same as ATR

(1) UK PSD ACP Evaluation Documents / and other DEFRA (UK) documents (See

<http://www.pesticides.gov.uk/publications.asp?id=202>)

(2) EU Regulatory & Evaluation Data as published by EC and EFSA (DAR & Conclusion dossiers) / EU Annex III PIC DGD / EU MRL Database (See http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)

(3) U.S. EPA ECOTOX Database (see <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) / U.S. EPA Pesticide Fate Database (See <http://cfpub.epa.gov/pfate/home.cfm>) / Miscellaneous WHO documents.

(4) Extension Toxicology network Database EXTOTOXNET (See <http://extoxnet.orst.edu/ghindex.html>)

(5) Pesticide Action Network Database (See <http://www.pesticideinfo.org/>)

(6) U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resource Publication No. 137. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 1980, p. 23.

(7) Book: The pesticide Manual. Editor: Clive Tomlin, Editorial: Crop protection publications, Tenth edition

(8) Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2011. The PPDB, Pesticide Properties Database. University of Herfordshire, UK (see <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/>)

(9) French database provided by ARVALIS-Institut du Végétal.

3.3. Evaluación del impacto de la re-utilización de aguas residuales tratadas.

Publicación científica #3:

Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain).

Por:

Marianne Köck-Schulmeyer, Antoni Ginebreda, Cristina Postigo, Rebeca López, Sandra Pérez, Rikke Brix, Marta Llorca, Miren López de Alda, Mira Petrovic, A. Munné, L. Tirapu, Damia Barceló

Publicada en "Chemosphere"



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain)

Marianne Köck-Schulmeyer^a, Antoni Ginebreda^a, Cristina Postigo^a, Rebeca López-Serna^a, Sandra Pérez^{a,*}, Rikke Brix^a, Marta Llorca^a, Miren López de Alda^a, Mira Petrović^{a,c}, Antoni Munné^d, Lluís Tirapu^d, Damià Barceló^{a,b}

^a Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, c/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Catalan Institute of Water Research, ICRA Catalan Institute for Water Research-ICRA, C/Emili Grahit, 101, Edifici H2O, Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, E-17003 Girona, Spain

^c Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Passeig Lluís Companys 23, 80010 Barcelona, Spain

^d Agència Catalana de l'Aigua, c/Provença 204-208, 08036 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2010

Received in revised form 29 October 2010

Accepted 1 November 2010

Available online 27 November 2010

Keywords:

Micro contaminants

LC-MS

Wastewater treatment

Water reuse

Llobregat river

Mass balances

ABSTRACT

The presence of sewage-borne micro contaminants in environmental waters is directly related to the discharge of treated effluents from wastewater treatment plants (WWTP) and the flow rate of the receiving river waters. Mediterranean rivers, in particular, are characterized by important fluctuations in the flow rates and heavy pollution pressures resulting from extensive urban, industrial and agricultural activities. This translates into contamination levels in these rivers often higher than those in other larger European basins. The present work provides an overview of the occurrence of five groups of organic contaminants (131 compounds) namely pharmaceuticals, illicit drugs, polar pesticides, estrogens, alkylphenols and related ethoxylates in WWTP tertiary treatment effluents. Data gathered during a period of water reuse carried out in the lower stretch of the Llobregat river (NE Spain), in the surroundings of the town of Barcelona as a consequence of the severe drought that took place along the years 2007–2008 are presented as illustrative example. In general, measured concentrations of the target compounds were in the low to mid ng L^{-1} range. The total concentration of each compound class downstream to the discharge point was similar or slightly higher than that found upstream. Regarding the loads calculated for each compound, the relative contribution from the river upstream and the tertiary effluent were highly compound depending with no apparent trend. However, estimation of the overall bulk loads for each compound class determined in the Llobregat river showed the following rank order: pharmaceuticals > alkylphenols > pesticides > illicit drugs > estrogens.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mediterranean rivers are characterized by important fluctuations in the flow rates and heavy contamination pressures from extensive urban, industrial and agricultural activities. For instance, the Llobregat river basin (Catalonia, NE Spain), with 156 km and covering a catchment area of 4957 km^2 (Fig. 1), suffers from extreme and sudden flow fluctuations (mean annual precipitation: 3330 mm^3 , annual average discharge: 693 hm^3) and receives the effluent discharges of more than 50 WWTPs coming mostly from its two main tributaries, River Cardener and River Anoia. In some

periods, 92% of the discharges come from WWTP (Muñoz et al., 2009b).

At some points, especially in drought periods the effluents may constitute a high percentage of the total flow of the river. As it can be seen in Fig. S1 (Supplementary information), the average monthly flow registered in the period 2000–2008 shows peaks of ca. $100 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, together with minimum values of ca. $1 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Agència Catalana de l'Aigua – Generalitat de Catalunya; <http://www.gencat.cat/aca/>). Thus, relevant concentrations of organic pollutants are commonly found along the river, usually showing increasing levels when moving downstream, due to the corresponding increase of WWTPs discharges and population density (Huerta-Fontela et al., 2008). Furthermore, under the pressure of water scarcity and the expected increasing occurrence of drought events in the Mediterranean area (Christensen et al., 2007),

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 6100; fax: +34 93 204 5904.

E-mail address: spsqam@cid.csic.es (S. Pérez).

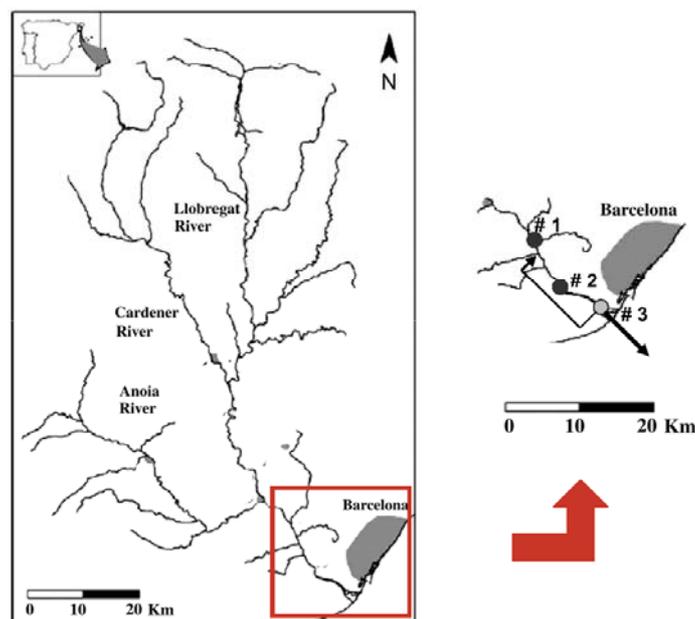


Fig. 1. Sampling points location in the lower stretch of the Llobregat river. Point #1 Llobregat river at Molins de Rei; point #2 Llobregat river at Sant Joan Despí; point #3 WWTP El Prat de Llobregat.

measures like water reclaim and reuse, addressed to provide alternative resources, are gaining major relevance (Aggeli et al., 2009). Such measures are doubtlessly necessary from the point of view of resource sustainability, and are usually promoted by the responsible water authorities.

Whereas conventional physico-chemical and microbiological contaminants are usually and routinely monitored in reused-reclaimed water as prescribed by the existing Spanish regulations (Spanish Government, 2007), emerging contaminants are rarely analyzed since they are not yet covered therein. The risks posed by the presence of the aforesaid emerging contaminants are thus recognized as an area requiring further study (Muñoz et al., 2009a).

The present work aimed to provide an overview of the occurrence of five groups of micro contaminants (pharmaceutically active substances, illicit drugs, polar pesticides, estrogens and alkyphenol ethoxylates) in WWTP tertiary effluents destined to reuse and their effects on receiving surface waters, using as an illustrative example the data gathered during the experiences with water reuse carried out in the lower part of the Llobregat river (NE Spain) by the responsible water authority (Catalan Water Agency) in the surroundings of the town of Barcelona, during the summer and fall of 2008, as a consequence of the severe drought that took place during the years 2007–2008 in the area (Cazurra, 2008; Mujeriego et al., 2008). Their significance as trace environmental pollutants in waterways is due to several facts: (i) continuous introduction into the environment, either by diffuse or point sources via effluents from sewage treatment facilities; (ii) they are inherently biologically active; (iii) some of them are used by man in rather large quantities (Postigo et al., 2008; Calisto and Esteves, 2009; Kümmerer, 2009a,b; Kuster et al., 2009; Brix et al., 2010).

The presence of sewage-borne micro contaminants in environmental waters is directly related to their removal in wastewater treatment plants (WWTP) (Barceló and Petrovic, 2007; Batt et al., 2007; Christensen et al., 2009; Matamoros et al., 2009) and the

dilution factor by the receiving waters (Johnson et al., 2008). Numerous studies revealed their presence in wastewaters, as well as surface, ground and ultimately in drinking water (Pérez and Barceló, 2008; Kasprzyk-Hordern et al., 2009).

Moreover, in order to better understand the role of micro contaminants in water reuse and its effect on surface water quality from a quantitative point of view, it was necessary to take into account the variability of both flows and concentrations. This can be conveniently addressed by using load (mass-flow) balances. In the present case study its applicability was explored.

2. Materials and methods

2.1. Study site

2.1.1. The lower Llobregat river watershed

The Llobregat river section dealt with in the present work corresponded to the last part between the towns of Molins de Rei (point #1) and Sant Joan Despí (point #2), the latter being particularly important because the intake of an important waterworks supplying drinking water to the city of Barcelona is located there. Water from the WWTP tertiary treatment of El Prat de Llobregat (point #3) was pumped upstream ca. 15.6 km and discharged into the river at 0.2 km downstream of point #1 (Fig. 1). For the purposes of the present work it is worth noting that the total treated wastewater discharged into the Llobregat basin upstream of point #1 is ca. $96 \text{ hm}^3 \text{ y}^{-1}$, corresponding to 1 346 790 equivalent inhabitants.

2.1.2. Tertiary waste water treatment

The WWTP facilities of El Prat del Llobregat is located close to the mouth of the River Llobregat, receiving the wastewater from Barcelona and several surrounding towns. It gives service to 1 141 538 eq. inhabitants and treats $266 500 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ of wastewater

(97.5 hm³ y⁻¹). The treatment process consists of a primary settlement, followed by a conventional secondary biological step. The main part (68.9 hm³ y⁻¹, 67.5%) of the so generated effluents is discharged into the Mediterranean Sea through an emissary 3.2 km long. The remaining part (33.2 hm³ y⁻¹, 32.5%) is reclaimed and destined to reuse, after adequate tertiary treatments which are different depending on the final projected use: i.e. agricultural irrigation, wetland preservation, ground water hydraulic barriers against marine saline intrusion, ground water recharge or river flow recharge. The present work dealt with the last one, that amounts to a maximum of 1.8 m³ s⁻¹, the tertiary treatment consisting on nutrient elimination, filtration and disinfection (UV plus chlorine addition).

2.1.3. Flow measurements

Flow measurements of the Llobregat river are regularly performed by the Catalan Water Agency (ACA) in the gauge flow station located in Sant Joan Despí (point #2). Measurements are recorded every 5 min and the data aggregated at day intervals. They are accessible at the ACA website (Agència Catalana de l'Aigua – Generalitat de Catalunya; <http://www.gencat.cat/aca/>). Tertiary effluent flow was also available from the WWTP records. River flow at point #1 (river upstream) Q_1 , though not measured, was assumed be the difference between that of point #2 (river downstream) Q_2 and point #3 (WWTP effluent), Q_3 since the distance between both points was not too long, and no other significant water discharges and/or water abstractions was located in that section of river. Therefore, under the foregoing assumption the flow in point #1 could be reasonably estimated from the balance Eq. (1):

$$Q_1(\text{river upstream \#1}) \cong Q_2(\text{river downstream \#2}) - Q_3(\text{effl \#3}) \quad (1)$$

Flow values for points #1, #2 and #3, either measured (#2 and #3) or calculated (#1) are listed in Table 1.

2.2. Chemical analysis

2.2.1. Chemical reagents

Organic solvents were HPLC grade. Acetonitrile and methanol were from Riedel de Hæn (Steinheim, Germany). Target compounds (Tables S1 and S2 – Supplementary information) were of high purity grade (pharmaceutical > 90%; polar pesticides, drugs of abuse and estrogens > 96%; alkyl phenols and ethoxylates 98%).

2.2.2. Sampling and sample preparation

The sampling campaign was carried out in mid-October 2008. Grab water samples (5 L) corresponding to points #1, #2 and #3 (see Fig. 1) were collected in glass bottles, on three different days. Upon reception in the lab, samples were immediately filtered through 1 µm glass fibre filters, followed by 0.45 µm nylon mem-

Table 1
Flow data (in m³ s⁻¹) for the different points (#1: river Llobregat at Molins de Rei; #2: Llobregat river at Sant Joan Despí; #3: WWTP tertiary effluent discharged).

Point reference	#1 River upstream	#2 River downstream	#3 WWTP effluent
Description	$Q_1 = Q_2 - Q_3$	Q_2	Q_3
16/10/2008	4.20	5.05	0.85
21/10/2008	3.89	5.09	1.20
22/10/2008	3.25	4.75	1.50
Average (m ³ s ⁻¹)	3.78	4.96	1.18
Std. dev. (m ³ s ⁻¹)	0.45	0.19	0.33

brane filters (Whatman International Ltd., Maidstone, England), and stored in the dark at -20 °C until analysis.

2.2.3. Analysis method

Compound extraction and analysis of different aliquot volumes was performed according to previously reported validated methods.

Analysis of 71 pharmaceuticals, reported validated methods by Gros et al. (2008); illicit Drugs (17), by Postigo et al. (2008); pesticides (22), by Kampioti et al. (2005); estrogens (12), by Rodriguez-Mozaz et al. (2004b); and alkyl phenols and ethoxylates (9), by González et al. (2004).

To ensure the performance of the analytical methods for all the compounds, sample aliquots were spiked with surrogate standards (deuterated whenever available) prior to extraction as it is published elsewhere. The concentrations of the analytes were corrected for by the recovery of the surrogate standards. Limits of detection and quantification for all target compounds are in Tables S3–S7 (Supplementary information).

2.3. Load contributions and mass balances

For every compound i , and point j the load (expressed as mass-flow in appropriate mass/time units) was computed as the product of concentration c_{ij} per flow Q_j :

$$\text{Load (point } j, \text{ compound } i) = Q_j \cdot c_{ij} \quad (2)$$

Hence, assuming a conservative behavior for the contaminants (see Section 3.2), for every compound i the following mass-flow balance equation holds:

$$\text{Load river downstream (\#2)} = \text{load river upstream (\#1)} + \text{load effl. discharged (\#3)} \quad (3)$$

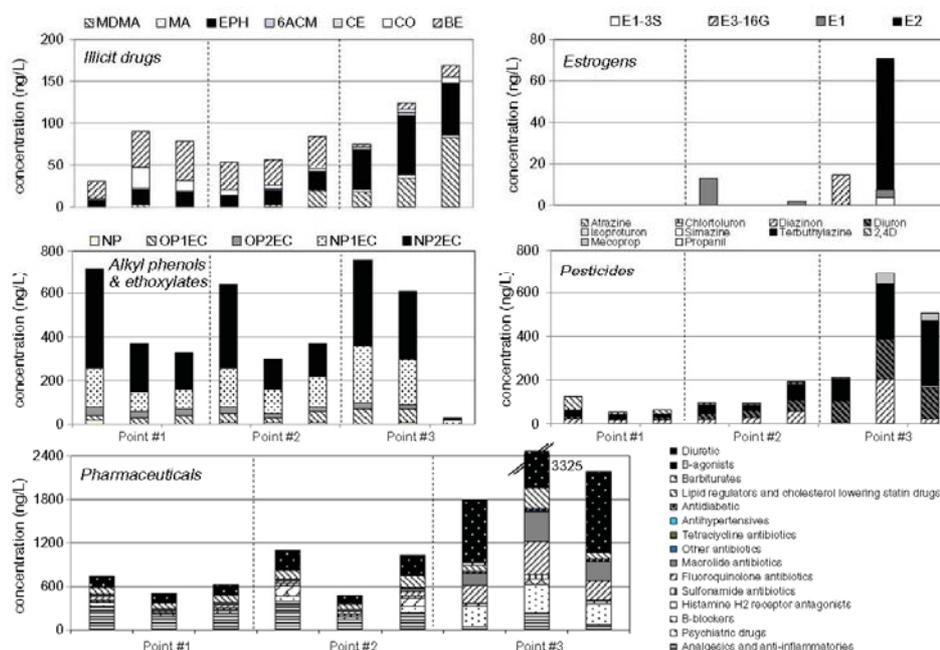
$$Q_2 \cdot c_{2i} = Q_1 \cdot c_{1i} + Q_3 \cdot c_{3i} \quad (4)$$

3. Results and discussion

3.1. Occurrence of micro contaminants

The occurrence of 131 micro contaminants was determined in both the river Llobregat (Fig. 1, points #1 and #2) and the effluents pumped upstream and discharged into the river from the WWTP El Prat de Llobregat (Fig. 1, point #3) after an adequate tertiary treatment (as described in Section 2.1.2). The analytical results are summarized in Tables S1 and S2 (Supplementary information). As expected, in general terms, effluent waters usually show higher concentrations of pollutants than the river. In turn, if one compares the concentrations per families of compounds found river upstream (point #1) and downstream (point #2), levels found are roughly similar or slightly lower in the former (Fig. 2).

As far as pharmaceuticals are concerned, 56 drugs out of 71 monitored were detected at least in one sample. Concentrations measured were in the range of ng L⁻¹ for most of the compounds analyzed. The highest concentrations found reached levels of µg L⁻¹ (max 1.6 µg L⁻¹ for the diuretic hydrochlorothiazide in one sample at point #3 with an average concentration in three samples of 1.1 µg L⁻¹). Therapeutic classes which were present at higher concentrations at all sampling points were antihypertensives, antibiotics, diuretics and anti-inflammatories. Data available regarding the occurrence of pharmaceuticals in the Llobregat river from previously published studies (Farré et al., 2001; Kuster et al., 2008; Muñoz et al., 2009b; Ginebreda et al. 2010) were not readily comparable with the results reported here, because of the limited number of compounds investigated in other studies which relied



MDMA: ecstasy; MA: methamphetamine; EPH: ephedrine; 6ACM: 6-acetylmorphine; CE: cocaethylene; CO: cocaine; BE: benzoyllecgonine; E1-3S: Estrone-3-sulfate; E3-16G: Estriol-16-glucuronide; E1: Estrone; E2: Estradiol; NP: Nonylphenol; OP1EC: Octylphenol-1-carboxylates; OP2EC: Octylphenol-2-carboxylates; NP1EC: nonylphenol-1-carboxylates; NP2EC: nonylphenol-2-carboxylates.

Fig. 2. Concentrations (ng/L) per families of compounds in river upstream (point #1), downstream (point #2), and WWTP effluent (point #3).

on less sensitive analytical methods. Even so, generally speaking, it could be stated that the levels found in our study roughly fell within the low range of the previously reported ones.

In this context, 22 target compounds were measured and four of them (simazine, terbutylazine, diuron and diazinon) were detected in all the samples analyzed, while 12 were at undetectable levels. Highest values were measured in point #3 (WWTP tertiary effluent) and corresponded to terbutylazine, diuron, diazinon, mecroprop and 2,4-D. The values found in the river, either upstream or downstream to the point of discharge, never exceeded those regulated by Directive 2008/105/EC. Comparison of the results with previous studies (Quintana et al., 2001; Rodríguez-Mozaz et al., 2004a; Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2008; Ricart et al. 2010) suggests a general decrease for the majority of the compounds analyzed except for propanil and terbutylazine, showing a slight increase.

Concerning illicit drugs and metabolites, 9 out of the 17 investigated compounds were not detected in any of the investigated samples. On the other hand, cocaine and benzoyllecgonine, and the amphetamine-like compound ephedrine were present in all water samples analyzed. Cocaine and its major metabolite benzoyllecgonine presented average concentrations higher in surface river waters (points #1 and #2) than in discharged treated water (point #3). Maximum cocaine and benzoyllecgonine concentrations were determined at point #1 (25 and 47 ng L⁻¹, respectively). In effluent waters (point #3) the highest level measured for cocaine was 8 ng L⁻¹, and up to 13 ng L⁻¹ were quantified for benzoyllecgonine. In monitoring study carried out in effluents from the WWTP El Prat

(Postigo et al., 2008) the concentrations of cocaine and benzoyllecgonine ranged from 3 to 13 ng L⁻¹ and from 9 to 61 ng L⁻¹, respectively. Comparing ephedrine levels, they were slightly higher in effluents from WWTP El Prat when no tertiary treatment was applied, as well as for metamphetamine and MDMA levels. Levels for the 6-ACM in the same WWTP effluent had been reported to be between 3 and 5 ng L⁻¹, in contrast to the present study where this compound was not found at detectable levels in the river (Bolveda et al., 2009). In the Llobregat river, levels of benzoyllecgonine and cocaine were throughout the year in the range of 15–150 ng L⁻¹ and of 0.1–60 ng L⁻¹, respectively (Huerta-Fontela et al., 2008). The amphetamine-like compound, ephedrine, presented a maximum concentration of 71 ng L⁻¹ in effluent wastewaters (point #3). MDMA was also detected in some samples collected in points #1 and #2, but generally at lower levels than those observed for this analyte at point #3.

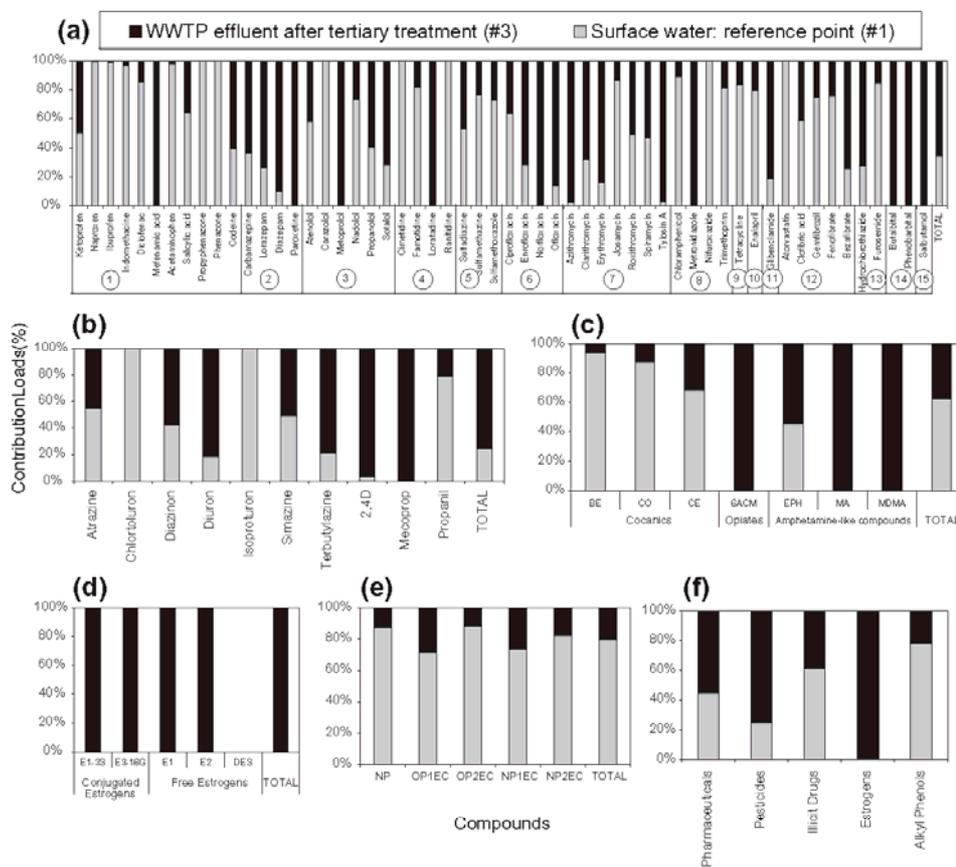
Cannabinoids and lysergic compounds were also not detected in the investigated samples. Overall, levels of illicit drugs and metabolites in surface waters were not highly affected by the discharge of treated wastewaters, as average total concentrations observed in points #1 and #2 were fairly similar. Amphetamine was occasionally detected in the Llobregat river waters and in effluents from the WWTP El Prat in previous studies (Huerta-Fontela et al., 2008; Postigo et al., 2008). For MDMA and metamphetamine, levels were as high as 40 ng L⁻¹ and 2 ng L⁻¹, respectively (Huerta-Fontela et al., 2008).

In relation to estrogens, none of the investigated hormones were detected in the upstream Llobregat river waters (point

#1) and up to three estrogens were present in the downstream river waters collected at point #2. In the effluent from the WWTP El Prat (point #3) 4 out of the 12 investigated estrogens were determined in one sample. Estrone and estrone 3-sulfate did not exceed 4 ng L^{-1} . Estradiol, one of the estrogens with the highest estrogenic potency, reached a value of 63.6 ng L^{-1} in the effluent from the WWTP El Prat (point #3), and the presence of the conjugated form of estriol (estriol 16-glucuronide) was also confirmed at a concentration of 15 ng L^{-1} . The high levels of estradiol might result from different processes that may occur during the wastewater treatment process, such as cleavage of conjugated forms of estradiol, reduction of estrone to estradiol and desorption of estradiol from the organic matter. The mea-

sured level of diethylstilbestrol (1.7 ng L^{-1}) might come from illegal use, since this compound is banned. Estrone was found in two out of the three river water samples from point #2 ($<13 \text{ ng L}^{-1}$).

The levels determined for estrone in this work were below the maximum concentration measured at the same location of the Llobregat river a few years ago (Rodríguez-Mozaz et al., 2004b). In addition, results from a previous study (Kuster et al., 2008), showed similar low concentrations of estrone and estrone 3-sulfate in effluents from different WWTPs located on the same river, while estradiol, estriol, estriol 16-glucuronide were not detected. This study reported also higher levels of estrone and estrone 3-sulfate in the Llobregat river water samples than in the effluents from



a) 1- Analgesics and anti-inflammatories, 2- Psychiatric drugs, 3- β -blockers, 4- Histamine H2 receptor antagonists, 5-Sulfonamide antibiotics, 6- Fluoroquinolone antibiotics, 7- Macrolide antibiotics, 8- Other antibiotics, 9- Tetracycline antibiotics, 10- Antihypertensives, 11- Antidiabetics, 12- Lipid regulators and cholesterol lowering statin drugs, 13- Diuretics, 14- Barbiturates, 15- B-agonists. c) BE: benzoylcegonine; CO: cocaine; CE: cocaethylene; 6ACM: 6-acetylmorphine; EPH: ephedrine; MA: methamphetamine; MDMA: ecstasy; d) E1-3S: Estrone-3-sulfate; E3-16G: Estriol-16-glucuronide; E1: Estrone; E2: Estradiol; DES: Diethylstilbestrol; e) NP: Nonylphenol; OP1EC: Octylphenol-1-carboxylates; OP2EC: Octylphenol-2-carboxylates; NP1EC: nonylphenol-1-carboxylates; NP2EC: nonylphenol-2-carboxylates.

Fig. 3. Relative contribution (%) to pollution loads found in point #3 of (a) pharmaceuticals, (b) pesticides, (c) illicit drugs and metabolites, (d) estrogens, (e) alkylphenols and ethoxylated derivatives and (f) each investigated group.

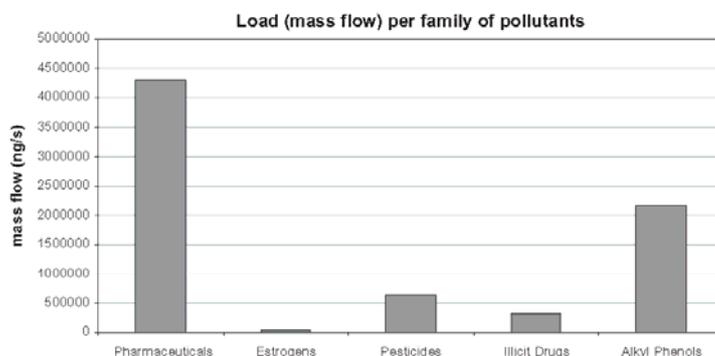


Fig. 4. Calculated and experimental mass-flow balances for each family of micro contaminants investigated in point #2.

WWTPs, thus, uncontrolled or non-treated discharges may be the main contribution to these levels.

Octylphenol (OP), nonylphenol (NP) and their respective mono-, di- and triethoxylates, as well as the carboxylates and ethoxy carboxylates of the two parent phenols were analyzed (nine compounds). Among them, only six compounds were detected. The carboxylic derivatives NP1EC and NP2EC were both the most ubiquitous (100%) and abundant ones (100–400 ng L⁻¹). On the other hand, the ethoxylated derivatives were absent. OP carboxylates were further commonly detected, though at lower levels (10–70 ng L⁻¹). These values were significantly lower than the levels previously found in the Llobregat river in the years 1998–2003 (González et al., 2004; Brix et al., 2010), thus indicating a decrease in their use and/or an improvement in the wastewater treatment.

3.2. Load contributions and mass balances

3.2.1. Loads

One of the purposes of the present study was to weight the relative contribution to the load (expressed as mass-flow in mass/time units) of the various micro contaminants found downstream in the river to the effluent discharge, thus differentiating the load which is already present upstream in the river as “background”, from that coming from the discharged effluent. Loads for points #1 and #3 were calculated as the product of concentrations per flows (Section 2.3, Eq. (2)), as the average of the three measurements available. Compounds whose levels were below the limit of detection and/or quantification were set to zero. Hence, loads were calculated according to the outlined procedure for the five groups of pollutants studied.

It can be reasonably assumed that load downstream at point #2 was only determined by load coming from the river upstream (point #1), together with the load discharged (point #3). On the other hand, since sampling point #2 and the discharge point were each other at very close distance (ca. 0.2 km) and other influences in such a short stretch were negligible their relative load contributions could be directly compared. The outcomes are depicted in Fig. 3a–f.

As expected, it is evident from the figures that the relative contributions were different for each group, and for the different compounds within each group (Fig. 3f). Estrogens were the only group which was exclusively detectable in the tertiary effluents, though at very low concentrations (Fig. 3d). In contrast, the presence of alkylphenols derivatives (Fig. 3e) was clearly linked to the upstream river (ca. 80%). However, for pesticides, the contributions appeared to be very heterogeneous (Fig. 3b). Thus, for instance, whereas chlortoluron, isoproturon and propanil were clearly asso-

ciated to the upstream river, while 2,4-D, mecoprop and to a lesser extent diuron and terbutylazine were related to the effluent. Other compounds such as atrazine, simazine or diazinon show a mixed origin. Whereas pesticides are normally considered diffuse pollutants coming from agriculture, the contribution of non-agricultural sources has been also recognized (Barceló and Hennion, 1997; Gerecke et al., 2002; van Beelen, 2007; Stamatis et al., 2010). In fact, the European Regulation known as E-PRTR (European Commission, 2006a,b) has included several herbicides, namely Diuron, Isoproturon, Atrazin, Simazin, among the compounds to be controlled in the output of WWTPs.

The other two families showed a behavior somewhere in between requiring an examination compound by compound. Thus, for instance, in the case of illicit drugs, while amphetamines like MA and MDMA and the opiate 6-ACM appeared to be strongly associated with the tertiary effluent discharge, cocaine was mostly present in waters coming from the upstream stretch of the river (Fig. 3c). Pharmaceuticals constituted the most complex case, as could be expected because of the high heterogeneity of chemical structures and the number of compounds analyzed. Even so, the clear association of analgesics and anti-inflammatories (ibuprofen, naproxen, diclofenac, indomethacin, salicylic acid, phenazone, propylphenazone with the only exception of mefenamic acid) with upstream river water was noticeable. Some histamine H2 antagonists like famotidine, cimetidine and ranitidine, lipid regulators such as gemfibrozil, fenofibrate and atorvastatin, or antibiotics trimethoprim and tetracycline, the diuretic furosemide showed a predominance of the same upstream origin. Conversely, the β -blocker metoprolol, the quinolone antibiotic ofloxacin and norfloxacin, antibiotic macrolides like azithromycin, erythromycin or tylosin A, barbiturates, salbutamol were mostly associated with the WWTP effluent. However, for the great majority of pharmaceutical compounds studied, a mixed contribution (from river upstream and from the effluent discharged) was observed. Even though the source of pharmaceuticals in all cases comes from urban origin through WWTP discharges, differences are likely attributable (a) the type of treatment applied (most of the discharging WWTPs upstream have only secondary treatment in contrast with WWTP El Prat de Llobregat) and (b) the possible occurrence of depletion mechanisms (i.e., photodegradation, adsorption, etc.) in the river along the longer distance traveled.

Furthermore, loads (mass-flows) provide a straightforward way to compare in bulk the weight of the different pollutant families studied in quantitative terms. The results corresponding to point #2 (river downstream) are summarized in Fig. 4. From them, the following rank order was established:

Pharmaceuticals > alkylphenols > pesticides > illicit drugs >> estrogens.

3.2.2. Flow-mass balances

In a preliminary crude approach, one can assume a conservative behavior for the contaminants (which was considered a reasonable assumption given the short distance traveled). Therefore, since both flow and concentrations at point #2 (Q_2 and c_{2i}) are already available from direct measurements, we could compare the predicted value of $c_{2i}(\text{calc})$, which was straightforward calculated from the foregoing mass balance equation (Section 2.3, Eq. (4)) to the found $c_{2i}(\text{exp})$. The suitability of the assumptions was thus experimentally checked.

Results obtained are represented for each one of the families studied in Fig. 5a–e. Leaving aside the case of estrogens that were

found at detectable levels only in effluents and at very low concentrations, the rest of the groups seemed to acceptably fit the model. Though both positive and negative deviations between calculated and measured values were observed, predicted values slightly higher than measured seemed to predominate. In some cases, such difference could be neglected since it fell within the range of the statistical uncertainty embodied in the results. However, the over-estimation could be attributed to several reasons, all of them based on deviations from the balance Eq. (4). Among others, two possibilities are (i) non fulfillment of the implicit assumption of conservative behavior, due to the disappearance of the compound by some kind of depletion mechanism occurring in the river, such as chemical or biological degradation, or adsorption onto sediments, and (ii) by the possible existence of some temporal minor water stream reaching the Llobregat river between points #1 and

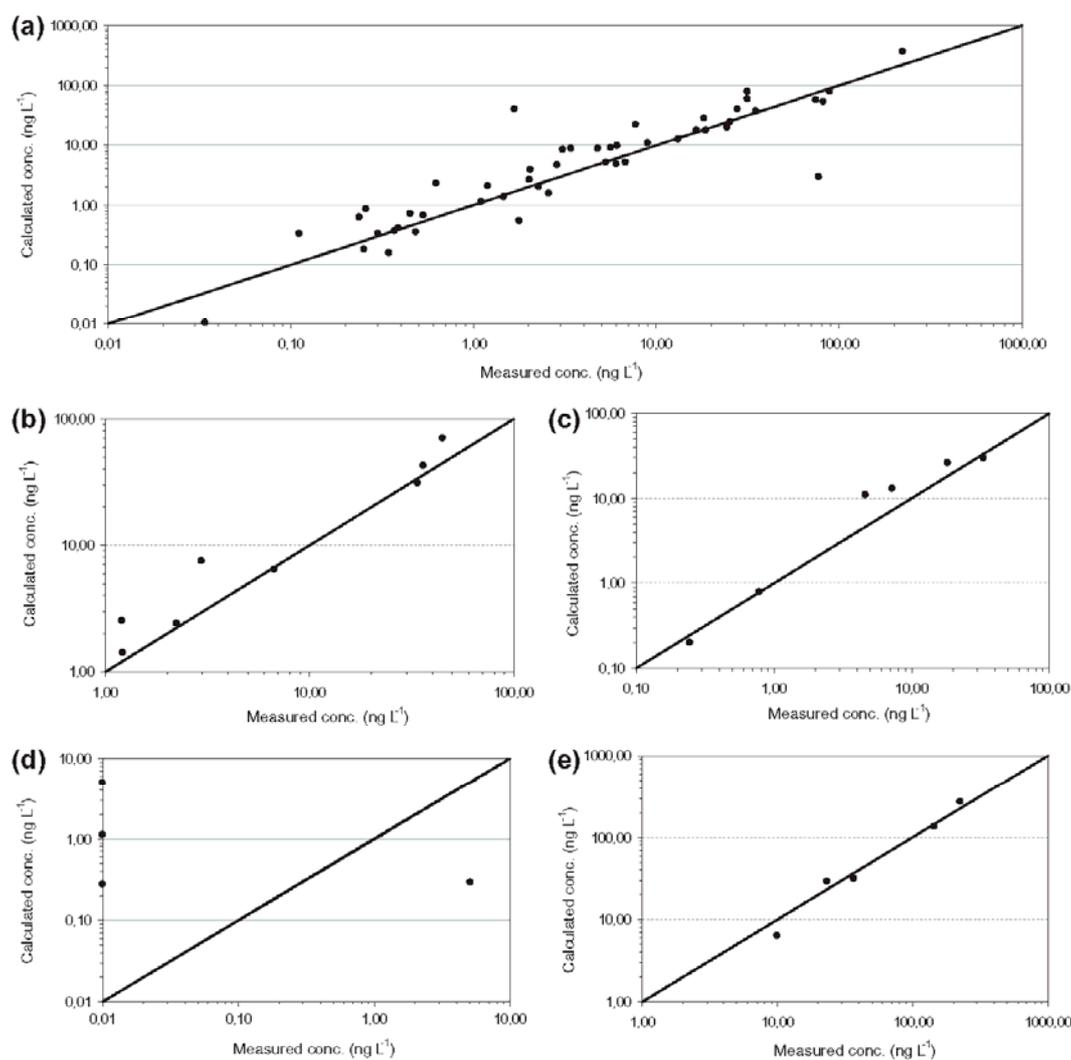


Fig. 5. Levels of contamination in point #2 predicted for (a) pharmaceuticals, (b) polar pesticides, (c) illicit drugs and metabolites, (d) estrogens and (e) alkyl phenols and ethoxylates derivatives by using the mass balance equation.

#2, neglected in Eq. (1), that might contribute to a higher dilution factor (Q_2). Whereas the second factor would be expected to equally affect all compounds, the former looked more plausible, since it was more compound dependent. Notwithstanding, the mass-flow balance equation could be qualified as a valuable tool to predict downstream concentrations of pollutants if flows and concentrations (river and effluent discharges) occurring upstream are known, and the distance ' by water is moderate.

4. Conclusions

In the present study we examined the impact of wastewater reuse on the river water quality by monitoring the occurrence of five classes of micro contaminants. The campaign was run during the severe drought occurred in 2008 in the lower Llobregat river (NE Spain) which can be considered a representative hydrologic scenario of the basins in the semi-arid Mediterranean area. With the exception of estrogens only present in tertiary treated sewage waters at very low concentrations, all the remaining families were detected both in the river and in the tertiary effluents at comparable levels. In general, detected concentrations of the target compounds aggregated per families downstream to the discharge point are similar or slightly higher to those found upstream and comparable to or even below to those reported previously in the Llobregat river and in other Spanish rivers discharging into the Mediterranean Sea. The detection of a broad spectrum of organic pollutants corroborated the heavy impact of contaminant sources in the river like households, industry and agriculture.

In order to get a better appraisal of the relative contribution of the river basin upstream and sewage discharged to the burden of the different micro contaminants, their respective concentrations and flows should be handled together, especially if one considers the low proportion of the receiving river flow relative to the discharged tertiary effluent (in our case the average ratio was ca. 4:1). For comparison purposes this can be conveniently addressed using loads (mass-flows), calculated from their respective concentrations and flows. The so calculated loads also serve to provide an estimate of the overall bulk quantities of the different compounds and families.

From the results obtained in the Llobregat case study, and recalling the high variability of compounds examined, no general rules can be easily established at compound level, each one requiring an individual study. However, upon aggregation at family level, it can be concluded that for most of the cases both the river upstream basin and the tertiary effluent have comparable contributions in terms of loads. Overall, tracing the relative pollutant load contribution and their amount provides valuable information very useful for management purposes, especially under drought situations.

Acknowledgements

This work has been supported by the Catalan Water Agency, the Spanish Ministry of Science and Innovation [Projects Cemagua CGL2007-64551/HID and Consolider-Ingenio 2010 Scarce CSD2009-00065], CSIC Intramural Project IP3 [200880I247] and the EU [Modelkey Project GOCE 511237]. It reflects the authors' views only. The EU is not liable for any use that may be made of the information contained in it. Merck is acknowledged for the gift of LC columns, and Biotage for the gift of SPE cartridges. CP and MK gratefully acknowledge the European Social Fund and AGAUR (Generalitat de Catalunya, Spain) for their economical support through FI pre-doctoral grants. SP acknowledges the contract from the Ramón y Cajal Program of the Spanish Ministry of Science and Innovation.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.005.

References

- Aggeli, K., Kalavrouziotis, I.K., Bezergianni, S., 2009. A proposal of a treated wastewater reuse design system in urban areas. *Fresen. Environ. Bull.* 18, 1295–1301.
- Barceló, D., Hennion, M.C., 1997. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. *Elsevier, Amsterdam*, pp. 6–8.
- Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Under the analytical spotlight, contaminants emerge: Report on the 2nd EMCO Workshop "Emerging Contaminants in Wastewaters: Monitoring Tools and Treatment Technologies" held in Belgrade, Serbia, 26 and 27 April 2007. *Trac-Trends Anal. Chem.* 26, 647–649.
- Batt, A.L., Kim, S., Aga, D.S., 2007. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* 68, 428–435.
- Boleda, M.R., Galceran, M.T., Ventura, F., 2009. Monitoring of opiates, cannabinoids and their metabolites in wastewater, surface water and finished water in Catalonia, Spain. *Water Res.* 43, 1126–1136.
- Brix, B., Postigo, C., González, S., Villagrana, M., Navarro, A., Kuster, M., Lopez de Alda, M.J., Barceló, D., 2010. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds 5 and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1301–1309.
- Calisto, V., Esteves, V.L., 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77, 1257–1274.
- Cazurra, T., 2008. Water reuse of south Barcelona's wastewater reclamation plant. *Desalination* 218, 43–51.
- Christensen, J., Hewitson, B., Busuico, A., Chen, A., Gao, X., Held, I., Jones, R., Kolli, R., Kwon, W., Laprise, R., Magaña-Rueda, V., Mearns, L., Menéndez, C., Raisären, J., Rinke, A., Sarr, A., Whetton, P., 2007. Regional Climate Change Projections. The Physical Science Basis Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, New York, USA.
- Christensen, A.M., Markussen, B., Baun, A., Halling-Sørensen, B., 2009. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere* 77, 351–358.
- European Commission, 2006a. Regulation 166/2006 Concerning the Establishment of a European Pollutant Release and Transfer Register and Amending Directives 91/689/CEE and 96/61/CE.
- European Commission, 2006b. Guidance Document for the Implementation of the European PRTR.
- Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, L., Vilanova, M., Barceló, D., 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A* 938, 187.
- Gerecke, A.C., Scharer, M., Singer, H.P., Müller, S.R., Schwarzenbach, R.P., Sagesser, M., Ochsenein, U., Popow, G., 2002. Sources of pesticides in surface waters in Switzerland: pesticide load through waste water treatment plants-current situation and reduction potential. *Chemosphere* 48, 307–315.
- Ginebreda, A., Muñoz, I., López de Alda, M., Brix, R., López-Doval, J., Barceló, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat river (NE Spain). *Environ. Int.* 36, 153.
- González, S., Petrovic, M., Barceló, D., 2004. Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *J. Chromatogr. A* 1052, 111–120.
- Gros, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2008. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal. Chem.* 81, 898–912.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M.T., Martín-Alonso, J., Ventura, F., 2008. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci. Total Environ.* 397, 31–40.
- Johnson, A.C., Ternes, T., Williams, R.J., Sumpter, J.P., 2008. Assessing the concentrations of polar organic microcontaminants from point sources in the aquatic environment: measure or model? *Environ. Sci. Technol.* 42, 5390–5399.
- Kampioti, A.A., Borba da Cunha, A.C., López de Alda, M., Barceló, D., 2005. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1815–1825.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 43, 363–380.
- Kümmerer, K., 2009a. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part I. *Chemosphere* 75, 417–434.

- Kümmerer, K., 2009b. Antibiotics in the aquatic environment – a review – part II. *Chemosphere* 75, 435–441.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martín-Alonso, J., Barceló, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J. Hydrol.* 358, 112–123.
- Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D., 2009. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *J. Chromatogr. A* 1216, 520–529.
- Matamoros, V., Hijosa, M., Bayona, J.M., 2009. Assessment of the pharmaceutical active compounds removal in wastewater treatment systems at enantiomeric level. Ibuprofen and naproxen. *Chemosphere* 75, 200–205.
- Mujeriego, R., Compte, J., Cazorra, T., Gullon, M., 2008. The water reclamation and reuse project of El Prat de Llobregat, Barcelona, Spain. *Water Sci. Technol.* 57, 567–574.
- Muñoz, I., Gómez-Ramos, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2009a. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *Trac-Trends Anal. Chem.* 28, 676–694.
- Muñoz, I., López-Doval, J.C., Ricart, M., Villagrana, M., Brix, R., Geszinger, A., Ginebreda, A., Guasch, H., López de Alda, M., Romani, A.M., Sabater, S., Barceló, D., 2009b. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (NE Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2706.
- Pérez, S., Barceló, D., 2008. First evidence for occurrence of hydroxylated human metabolites of diclofenac and aceclofenac in wastewater using QqLIT–MS and QqTOF–MS. *Anal. Chem.* 80, 8135–8145.
- Postigo, C., de Ada, M.J.L., Barcelo, D., 2008. Analysis of drugs of abuse and their human metabolites in water by LC–MS2: a non-intrusive tool for drug abuse estimation at the community level. *Trac-Trends Anal. Chem.* 27, 1053–1069.
- Quintana, J., Martí, I., Ventura, F., 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE–GC–MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *J. Chromatogr. A* 938, 3–13.
- Ricart, M., Guasch, H., Barcelo, D., Brix, R., Conceicao, M.H., Geiszinger, A., de Alda, M.J.L., Lopez-Doval, J.C., Munoz, I., Postigo, C., Romani, A.M., Villagrana, M., Sabater, S., 2010. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: pesticide effects on biological communities. *J. Hydrol.* 383, 52–61.
- Rodriguez-Mozaz, S., López de Alda, M.J., Barceló, D., 2004a. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045, 85–92.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., 2004b. Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry method. *Anal. Chem.* 76, 6998–7006.
- Spanish Government, 2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boletín Oficial del Estado* 294, 50639.
- Stamatis, N., Hela, D., Konstantinou, I., 2010. Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *J. Hazard. Mater.* 175, 829–835.
- van Beelen, E., 2007. Municipal Waste Water Treatment Plant (WWTP) Effluents: a Concise Overview of the Occurrence of Organic Substances. Association of River Waterworks – RIWA, Nieuwegein.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Mean concentrations*, in ng L⁻¹ (relative standard deviation, in %) of pharmaceuticals at the three sampling points. Values in bold denote detection at all three samples, bold and italic denotes detection in two samples, regular font denotes detection in a single sample.

Analyte class and subclass	Compound	Point #1	Point #2	Point #3
Pharmaceuticals⁽¹⁾				
<i>Analgesics and antiinflammatories</i>	1 Acetaminophen	64.4 (70)	81.7 (98)	3.8 (7)
	2 Codeine	4.7 (1)	5.6 (3)	21.8 (28)
	3 Diclofenac	65.4 (8)	74.5 (32)	34.2 (40)
	4 Ibuprofen	49.5 (6)	34.9 (5)	2.2 (4)
	5 Indomethacine	6.8 (2)	6.8 (3)	0.8 (1)
	6 Ketoprofen	12.0 (3)	16.6 (6)	38.4 (26)
	7 Mefenamic acid	blq	blq	2.74 (5)
	8 Naproxen	32.4 (7)	25.2 (7)	1.2 (2)
	9 Phenazone	1.8 (0.5)	1.5 (0.1)	blq
	10 Phenylbutazone	bld	bld	bld
	11 Propyphenazone	2.6 (0.3)	2.3 (0.3)	blq
	12 Salicylic acid	10.3 (3)	13.2 (7)	18.2 (4)
<i>Antihypertensives</i>	13 Enalapril	0.4 (0.1)	0.5 (0.1)	0.2 (0.4)
	14 Lisinopril	blq	blq	blq
	15 Nifuroxazide	0.2 (0.4)	blq	blq
<i>Antidiabetics</i>	16 Glibenclamide	2.2 (0.03)	3.4 (2)	29.6 (1)
<i>β-Agonists</i>	17 Salbutamol	bld	0.03 (0.06)	0.04 (0.08)
<i>β-Blockers</i>	18 Atenolol	7.4 (1)	6.1 (1)	16.7 (9)
	19 Betaxolol	bld	bld	bld
	20 Carazolol	0.03 (0.05)	blq	bld
	21 Metoprolol	blq	77.6 (57)	13.4 (5)
	22 Nadolol	0.3 (0.01)	0.3 (0.1)	0.3 (0.4)
	23 Pindolol	bld	bld	bld
	24 Propranolol	1.4 (0.3)	2 (1)	6.4 (7)
	25 Sotalol	1.7 (1)	2.9 (2)	13.6 (10)
	26 Timolol	bld	bld	bld
<i>Barbiturates</i>	27 Butalbital	bld	bld	6.1 (5)
	28 Pentobarbital	bld	bld	bld
	29 Phenobarbital	bld	bld	10.3 (18)
<i>Diuretics</i>	30 Furosemide	9.2 (9)	3.1 (5)	5.6 (10)
	31 Hydrochlorothiazide	136.5 (12)	224.0 (89)	1104.0 (250)
<i>Fluoroquinolone antibiotics</i>	32 Ciprofloxacin	3.3 (1)	2.0 (1)	6.1 (2)
	33 Enoxacin	bld	bld	bld
	34 Enrofloxacin	29.0 (14)	31.7 (9)	235.0 (53)
	35 Norfloxacin	blq	bld	6.3 (6)
	36 Ofloxacin	3.8 (1)	7.7 (4)	74.0 (62)
<i>Histamine H2 receptor antagonists</i>	37 Cimetidine	0.1 (0.1)	bld	bld
	38 Famotidine	0.1 (0.1)	bld	0.04 (0.1)
	39 Loratadine	bld	0.3 (0.4)	3.4 (2)
	40 Ranitidine	0.8 (0.4)	0.2 (0.2)	blq
<i>Lipid regulators and cholesterol lowering statin drugs</i>	41 Atorvastatin	0.9 (0.5)	0.5 (0.3)	bld
	42 Bezafibrate	6.1 (3)	18.7 (19)	56.0 (4)
	43 Clofibrac acid	4.1 (1)	5.3 (1)	9.2 (1)
	44 Fenofibrate	0.2 (0.2)	0.2 (0.03)	0.2 (0.2)
	45 Gemfibrozil	77.8 (9)	89.1 (34)	83.3 (113)
	46 Mevastatin	bld	bld	bld
	47 Pravastatin	blq	blq	blq

	48	Azithromycin	1.1 (0.4)	1.7 (1)	159 (50)
	49	Clarithromycin	12.1 (0.2)	18.3 (5)	77.7 (30)
	50	Erythromycin	0.4 (0.05)	1.2 (1)	6.7 (4)
<i>Macrolide antibiotics</i>	51	Josamycin	0.5 (0.3)	0.4 (0.2)	0.2 (0.4)
	52	Roxithromycin	0.5 (0.1)	0.4 (0.1)	1.5 (1)
	53	Spiramycin	6.8 (1)	9.0 (4)	23.5 (29)
	54	Tilmicosin	bld	bld	bld
	55	Tylosin A	0.1 (0.1)	0.6 (0.4)	9.0 (10)
<i>Other antibiotics</i>	56	Chloramphenicol	0.4 (0.2)	0.1 (0.2)	0.2 (0.3)
	57	Trimethoprim	5.1 (1)	6.0 (2)	3.8 (6)
	58	Carbamazepine	19.1 (5)	27.8 (11)	104.1 (46)
	59	Diazepam	1.2 (0.3)	4.8 (3)	34.8 (11)
<i>Psychiatric drugs</i>	60	Fluoxetine	blq	bld	bld
	61	Lorazepam	20.1 (3)	31.5 (14)	178.6 (19)
	62	Paroxetine	blq	0.4 (0.3)	0.7 (1)
<i>Sulfonamide antibiotics</i>	63	Sulfadiazine	0.3 (1)	1.8 (2)	1.0 (1)
	64	Sulfamethazine	1.5 (1)	2.6 (1)	1.5 (2)
	65	Sulfamethoxazole	19.0 (3)	24.3 (4)	21.9 (24)
<i>Tetracycline antibiotics</i>	66	Chlorotetracycline	bld	bld	bld
	67	Doxycycline	bld	bld	bld
	68	Oxytetracycline	bld	bld	bld
	69	Tetracycline	1.2 (1)	1.1 (1)	0.8 (1)
<i>To treat cancer</i>	70	Tamoxifen	bld	bld	bld
<i>To treat infections</i>	71	Metronidazole	blq	0.4 (0.4)	1.8 (2)

* values below the limit of quantification were considered 0 to calculate the mean value and the RSD.

bld: below limit of detection

blq: below limit of quantification

(1) Pharmaceuticals not detected: pindolol, enoxacin, oxytetracycline, doxycycline, timolol, chlorotetracycline, tilmicosin, betaxolol, tamoxifen, phenilbutazone, mevastatin, pentobarbital.

Table S2. Mean concentrations* in ng L⁻¹ (relative standard deviation, in %) of micro contaminants at the three sampling points. Values in bold denote detection at all three samples, bold and italic denotes detection in two samples, regular font denotes detection in a single sample.

Analyte class and subclass	Compound	Point #1	Point #2	Point #3
Pesticides⁽¹⁾				
<i>Acidic Herbicides</i>	Mecoprop	bld	2.9 (94)	28.2 (93)
	2,4-D	0.2 (173)	6.7 (26)	29.8 (88)
<i>Anilides and Chloroacetanilides</i>	Propanil	2.4 (96)	1.2 (173)	2.5 (96)
<i>Organophosphates</i>	Diazinon	17.0 (30)	34.0 (57)	74.5 (145)
<i>Phenylureas</i>	Diuron	10.5 (23)	36.0 (33)	142 (30)
	Isoproturon	<i>0.5 (87)</i>	bld	bld
	Chlortoluron	<i>0.4 (89)</i>	bld	bld
<i>Triazines</i>	Atrazine	1.0 (15)	1.2 (33)	2.4 (64)
	Simazine	1.5 (11)	2.2 (10)	4.6 (61)
	Tertbutylazine	18.6 (48)	44.6 (56)	215 (48)
Illicit drugs and their metabolites⁽²⁾				
<i>Amphetamine like compounds</i>	Ephedrine	15.2 (37)	18.2 (27)	60.1 (20)
	MDMA	0.7 (173)	<i>7.3 (142)</i>	45.1 (75)
	Metamphetamine	bld	bld	3.0 (21)
<i>Cocainics</i>	Benzoylcegonine	36.7(38)	33.6 (11)	8.1 (58)
	Cocaehtylene	<i>0.1 (106)</i>	<i>0.2 (101)</i>	<i>0.5 (87)</i>
	Cocaine	12.9 (91)	4.6 (26)	4.9 (55)
<i>Opiates</i>	6-acetyl morphine	0.8 (173)	0.8 (173)	0.9 (173)
Estrogens and metabolites⁽³⁾				
<i>Conjugated estrogens</i>	Estrone 3-sulfate	blq	blq	1.2 (173)
	Estriol 16- glucuronide	bld	bld	4.8 (173)
<i>Free estrogens</i>	Estradiol	bld	bld	21.2 (173)
	Estrone	bld	5.1 (139)	1.2 (173)
	Diethylstilbestrol	bld	0.49 (0.85)	bld
Surfactants⁽⁴⁾				
<i>Alkylphenols</i>	Nonylphenol (NP)	6.7 (12)	10.0 (0.0)	3.3 (58)
<i>Carboxylic derivatives</i>	OP1EC	30.0 (10)	36.7 (15)	43.3 (38)
	OP2EC	33.0 (6)	23.0 (58)	16.7 (15)
	NP1EC	120.0 (52)	143.0 (35)	163.0 (127)
	NP2EC	283.0 (155)	223.0 (136)	240.0 (2042)

* values below the limit of quantification were considered 0 to calculate the mean value and the RSD.

bld: below limit of detection

blq: below limit of quantification

(1) Pesticides not detected: cyanazine, deethylatrazine, deisopropyl atrazine, linuron, fenitrothion, malathion, dimethoate, alachlor, metolachlor, molinate, bentazone, MCPA.

(2) Illicit drugs and their metabolites not detected: morphine, heroin, amphetamine, LSD and its metabolites, O-H-LSD and nor-LD and THC and its metabolites, OH-THC and THC-COOH

(3) Estrogens not detected: E3,EE, DES, E1-3G, E2-3S, E2-17G& E2-3G, E3-3S

(4) Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates not detected: Octylphenol, NP1EO, NP2EO, NP3EO.

Table S3. LODs and LOQs of pharmaceutical compounds and its metabolites in the analyzed waters.

Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)		Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)	
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)		LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
<i>Ketoprofen</i>	2.00	6.67	7.00	23.33	<i>Tilmicosin</i>	0.10	0.33	0.70	2.33
<i>Naproxen</i>	0.30	1.00	3.00	10.00	<i>Clarithromycin</i>	0.50	1.67	4.00	13.33
<i>Ibuprofen</i>	0.40	1.33	9.00	30.00	<i>Josamycin</i>	1.00	3.33	1.00	3.33
<i>Indomethacin</i>	0.20	0.67	2.00	6.67	<i>Tylosin</i>	2.00	6.67	1.00	3.33
<i>Diclofenac</i>	1.00	3.33	4.00	13.33	<i>Spiramycin</i>	0.50	1.67	2.00	6.67
<i>Mefenamic acid</i>	0.30	1.00	5.00	16.67	<i>Sulfadiazine</i>	0.40	1.33	2.00	6.67
<i>Acetaminophen</i>	2.00	6.67	7.00	23.33	<i>Sulfamethacine</i>	0.80	2.67	1.00	3.33
<i>Salicylic acid</i>	3.00	10.00	1.00	3.33	<i>Ofloxacin</i>	0.40	1.33	0.20	0.67
<i>Propyphenazone</i>	0.60	2.00	1.00	3.33	<i>Ciprofloxacin</i>	1.00	3.33	2.00	6.67
<i>Phenylbutazone</i>	1.00	3.33	3.00	10.00	<i>Enrofloxacin</i>	0.80	2.67	1.00	3.33
<i>Phenazone</i>	0.40	1.33	1.00	3.33	<i>Norfloxacin</i>	0.50	1.67	6.00	20.00
<i>Codeine</i>	0.10	0.33	1.00	3.33	<i>Danofloxacin</i>	0.20	0.67	3.00	10.00
<i>Clofibrac acid</i>	0.10	0.33	0.10	0.33	<i>Enoxacin</i>	0.40	1.33	6.00	20.00
<i>Bezafibrate</i>	0.01	0.03	0.40	1.33	<i>Trimethoprim</i>	0.20	0.67	0.40	1.33
<i>Fenofibrate</i>	0.30	1.00	0.50	1.67	<i>Chloramphenicol</i>	0.02	0.07	0.66	2.20
<i>Gemfibrozil</i>	0.40	1.33	1.00	3.33	<i>Metronidazole</i>	0.30	1.00	0.70	2.33
<i>Mevastatine</i>	0.20	0.67	2.00	6.67	<i>Nifuroxazide</i>	0.30	1.00	2.30	7.67
<i>Pravastatin</i>	3.00	10.00	9.00	30.00	<i>Atenolol</i>	0.10	0.33	9.00	30.00
<i>Atorvastatin</i>	0.20	0.67	2.00	6.67	<i>Sotalol</i>	0.80	2.67	2.00	6.67
<i>Paroxetine</i>	0.50	1.67	0.70	2.33	<i>Metoprolol</i>	0.10	0.33	2.00	6.67
<i>Fluoxetine</i>	0.20	0.67	1.00	3.33	<i>Propranolol</i>	0.20	0.67	0.60	2.00
<i>Diazepam</i>	0.80	2.67	1.20	4.00	<i>Timolol</i>	0.10	0.33	0.30	1.00
<i>Lorazepam</i>	1.30	4.33	4.00	13.33	<i>Betaxolol</i>	0.10	0.33	0.60	2.00
<i>Carbamazepine</i>	0.30	1.00	2.00	6.67	<i>Carazolol</i>	0.10	0.33	0.20	0.67
<i>Loratadine</i>	0.10	0.33	0.50	1.67	<i>Pindolol</i>	0.20	0.67	1.00	3.33
<i>Famotidine</i>	0.40	1.33	0.70	2.33	<i>Nadolol</i>	0.04	0.13	0.20	0.67
<i>Ranitidine</i>	0.50	1.67	2.00	6.67	<i>Salbutamol</i>	0.20	0.67	0.20	0.67
<i>Cimetidine</i>	0.10	0.33	0.40	1.33	<i>Clenbuterol</i>	0.20	0.67	0.60	2.00
<i>Tetracycline</i>	5.00	16.67	5.00	16.67	<i>Butalbital</i>	0.10	0.33	0.60	2.00
<i>Doxycycline</i>	2.00	6.67	7.00	23.33	<i>Pentobarbital</i>	0.20	0.67	1.00	3.33
<i>Oxytetracycline</i>	2.00	6.67	2.00	6.67	<i>Phenobarbital</i>	0.30	1.00	0.70	2.33
<i>Chlorotetracycline</i>	4.00	13.33	17.00	56.67	<i>Enalapril</i>	0.30	1.00	0.70	2.33
<i>Erythromycin</i>	0.40	1.33	1.80	6.00	<i>Hydrochlorothiazide</i>	6.00	20.00	6.00	20.00
<i>Azithromycin</i>	0.30	1.00	2.00	6.67	<i>Lisinopril</i>	0.40	1.33	5.00	16.67
<i>Roxithromycin</i>	0.50	1.67	1.00	3.33	<i>Furosemide</i>	0.50	1.67	2.00	6.67
<i>Sulfamethoxazole</i>	0.40	1.33	1.00	3.33	<i>Glibenclamide</i>	1.00	3.33	4.00	13.33
					<i>Tamoxifen</i>	0.30	1.00	0.40	1.33

Table S4. LODs and LOQs of the pesticides compounds in the analyzed waters.

Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)		Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)	
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)		LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
Atrazine	0.07	0.23	0.12	0.41	Metolachlor	0.29	0.96	0.46	1.55
Simazine	0.22	0.74	0.28	0.92	Diuron	0.24	0.79	0.49	1.62
Cyanazine	0.27	0.91	0.37	1.22	Isoproturon	0.04	0.12	0.09	0.29
Deethylatrazine	0.66	2.20	1.30	4.33	Linuron	6.61	22.03	8.42	28.08
Tertbutylazine	0.07	0.22	0.12	0.41	Chlortoluron	0.11	0.36	0.14	0.48
Deisopropyl atrazine	31.85	106.17	54.85	182.82	Molinate	2.01	6.70	3.14	10.45
Diazinon	0.15	0.48	0.13	0.43	Mecoprop	0.23	0.52	0.37	0.84
Dimethoate	1.13	3.77	1.20	4.00	2,4-D	0.37	0.84	0.59	1.33
Fenitrothion	4.35	9.79	4.05	9.11	Bentazone	0.40	0.89	0.63	1.43
Malathion	0.76	2.54	0.75	2.49	MCPA	0.20	0.45	0.26	0.58
Alachlor	0.55	1.83	0.84	2.79	Propanil	0.71	1.59	0.64	1.44

Table S5. LODs and LOQs of the estrogenic compounds in the analyzed waters.

Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)	
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
Estrone 3-glucuronide	0.63	2.10	0.71	2.37
Estradiol 17-glucuronide & Estradiol 3-glucuronide	0.90	3.00	0.93	3.10
Estriol 16-glucuronide	1.53	5.11	1.58	5.26
Estrone 3-sulfate	0.12	0.39	0.15	0.48
Estradiol 3-sulfate	0.98	3.27	1.79	5.97
Estriol 3-sulfate	0.15	0.50	0.15	0.51
Estrone	0.23	0.76	0.25	0.83
Estradiol	2.00	6.67	2.22	7.39
Estriol	2.23	7.42	2.59	8.63
Ethinyl-estradiol	1.77	5.88	1.52	5.08
Diethylstilbestrol	0.62	2.08	0.53	1.75

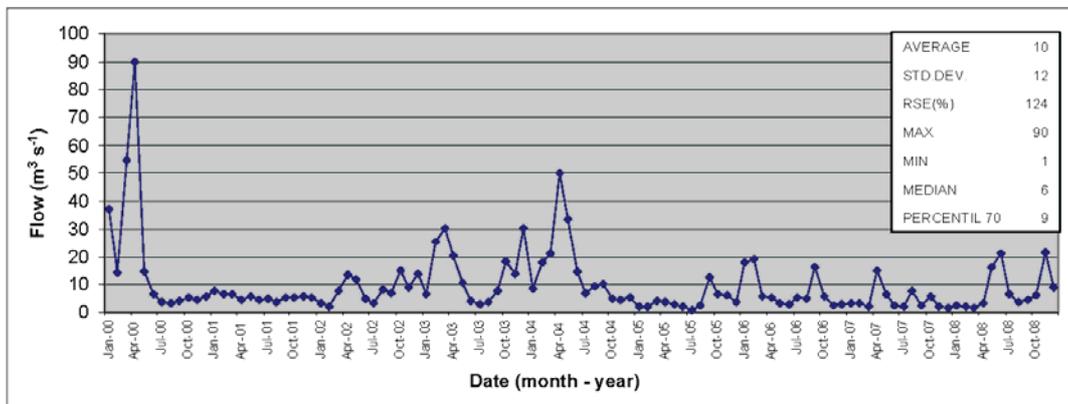
Table S6. LODs and LOQs of the illicit drugs and metabolites in the analyzed waters.

Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)	
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
Cocaine	0.05	0.15	0.13	0.43
Benzoylcegonine	0.63	2.11	1.48	4.95
Cocaethylene	0.01	0.02	0.01	0.04
Morphine	4.05	13.51	4.06	13.53
Heroin	1.70	5.66	2.15	7.17
6-acetylmorphine	2.30	7.68	2.77	9.24
LSD	0.08	0.28	0.17	0.56
2-oxo, 3-hydroxy LSD	0.53	1.78	0.90	3.01
Nor-LSD	0.32	1.06	0.93	3.10
Amphetamine	0.71	2.37	2.21	7.38
Methamphetamine	0.47	1.58	0.43	1.43
MDMA	1.49	4.97	5.51	18.35
Ephedrine	0.62	2.08	2.14	7.14
THC	2.34	7.79	3.12	10.39
11-hydroxy THC	0.10	0.35	0.11	0.37
11-nor, 9-carboxy THC	0.18	0.60	0.27	0.89

Table S7. LODs and LOQs of surfactants in the analyzed waters

Compound	Points 1 and 2 (surface water)		Point 3 (wastewater effluent)	
	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
Nonylphenol (NP)	1.22	4.53	0.28	2.04
Octylphenol (OP)	4.09	19.47	15.46	49.79
OP1EC	0.94	1.74	0.81	1.40
OP2EC	11.78	1.34	28.24	1.32
NP1EC	3.84	6.59	3.26	5.05
NP2EC	3.67	6.00	3.00	4.33

Figure S1. Monthly flow (monthly mean values) of the Llobregat river at point #2 (Sant Joan Despi, Barcelona), during the period 2000-2008.



3.3.1. Estudios complementarios

Además de las 9 muestras de agua (superficial del río Llobregat y residual regenerada de la EDAR de El Prat) comentadas en la publicación científica #3, se analizaron otras 13 muestras de agua, según se indica en la Tabla 3-1. Varias de estas muestras se tomaron con anterioridad al inicio de la re-utilización de las aguas regeneradas:

- en el río Llobregat, en el punto de captación de la planta potabilizadora de Sant Joan Despí (M01 a M05, M10),
- a la salida de esta planta, es decir, agua potabilizada (M06 y M17-19), y
- a la salida del tratamiento secundario de la EDAR de El Prat de Llobregat (M20-22).

Todas estas muestras se recogieron y analizaron siguiendo lo expuesto en la publicación científica #3. Los resultados de los análisis se presentan en el apartado siguiente.

Tabla 3 - 1. Total de muestras analizadas en el estudio de evaluación del impacto de la re-utilización de aguas residuales tratadas.

Fecha de toma de muestra	Punto #1 Río Llobregat (blanco)	Punto #2 Río Llobregat (entrada de potabilizadora)	Punto #3 Aguas regeneradas (efluente de EDAR)	Punto #4 Agua potabilizada (salida de la potabilizadora)	Punto #5 Aguas tratadas (sin tratamiento terciario)
Muestras recogidas antes de la re-utilización de las aguas regeneradas					
16/06/2008		M01		M06	
04/08/2008		M02			
11/08/2008		M03			
18/08/2008		M04			
25/08/2008		M05			
Muestras recogidas después del inicio de la re-utilización de las aguas regeneradas					
13/10/2008		M10			
15/10/2008					M20
16/10/2008	M07*		M14*		
17/10/2008		M11*		M17	
21/10/2008	M08*	M12*	M15*	M18	M21
22/10/2008	M09*	M13*	M16*	M19	M22

* muestras citadas en la publicación científica #3.

3.4. Discusión de los resultados

Los estudios presentados en este capítulo engloban el análisis de 22 plaguicidas en aguas de 4 depuradoras, de las cuales dos regeneran parte de sus aguas para usos variados usando técnicas similares, además del análisis de varias muestras superficiales y potables relacionadas con las anteriores.

3.4.1. Presencia y eliminación de plaguicidas en las EDARs.

Los plaguicidas estudiados son, en su mayoría, de aplicación predominantemente agrícola, aunque muchos de ellos también son de uso urbano, lo que los hace plaguicidas urbanos y agrícolas (por ejemplo, diazinón, fenitrotión). Los plaguicidas de uso urbano acaban siendo arrastrados por las aguas domésticas o por la escorrentía pluvial, llegando finalmente a las EDARs. En nuestros estudios, los resultados del análisis de plaguicidas en las aguas de las 4 EDARs, revelaron que:

- el diazinón, el diurón y la terbutilazina son los compuestos más ubicuos,
- el diazinón es el que presenta las concentraciones más altas,
- la cianazina, el fenitrotión, el linurón, el metolacloro y el molinato no se detectaron en ninguna muestra,
- la simazina se detectó de forma irregular y en algunos casos a concentraciones muy altas.

El insecticida órganofosforado diazinón, antes de su prohibición, fue de uso predominantemente urbano, aunque también se aplicaba en la agricultura para combatir plagas en frutas y hortalizas. A nivel urbano se utilizaba, tanto en zonas exteriores como interiores, en fábricas de alimentos, hospitales, hoteles, oficinas, restaurantes, viviendas, etc. A pesar de estar prohibido en la CE desde 2007 (Decisión 2007/393/CE), los niveles detectados en las depuradoras son elevados. En nuestro estudio, este órganofosforado no sólo es el compuesto más ubicuo sino también el que presentó las concentraciones más altas.

El diurón, introducido en el mercado el año 1966, es un herbicida de amplio espectro de uso urbano y agrícola. En la agricultura se emplea fundamentalmente en el cultivo de la vid y el algodón, y en zonas urbanas se usa predominantemente en superficies duras como caminos, vías férreas y senderos como herbicida. También se usa, aunque menos, en el control de las malezas acuáticas (acuarios caseros y estanques de peces) y como biocida en las pinturas antiincrustantes (utilizadas sobre todo en los cascos de los buques), ya que aumenta la eficacia del cobre en estos productos (PAN-UK 2005). Con la entrada de otros

herbicidas de gran espectro (por ejemplo, glifosato) en el mercado de plaguicidas de uso agrícola, el uso del diurón se ha desplazado más hacia las ciudades, hecho que queda en evidencia al constatar su gran ubicuidad en las EDARs estudiadas a lo largo de esta Tesis Doctoral.

La terbutilazina es un herbicida que ha venido a cubrir la demanda que han dejado la simazina y la atrazina tras su prohibición en 2004 (Decisión 2004/247/CE y Decisión 2004/248/CE, respectivamente). Su uso agrícola se ha masificado y ya se han producido alertas de contaminación por terbutilazina en pantanos de abastecimiento (Córdoba, España en 2005), como ya ocurrió en los años 2000 y 2002 con la simazina, en Sevilla y Huelva, respectivamente (ABCdesevilla 2005; Eroski consumer 2005). Como consecuencia de ello, ya se han formulado algunas solicitudes de prohibición de este herbicida; sin embargo, su comercialización continúa vigente en la CE (vigente hasta el 2021 - Regulación (CE) No 820-2011). Como se trata de un herbicida que, además, se usa como esterilizante de suelos y tierras sin cultivar, esta triazina también se ha transformado en un plaguicida de uso urbano y, como consecuencia de ello, su presencia es una constante en las aguas residuales urbanas.

Como ya se ha comentado anteriormente, se restringió el uso de la simazina en la UE en el año 2004. Su uso no agrícola incluía el control de las malezas en bordes de carreteras (o vías), en árboles, arbustos ornamentales y en el césped (por ejemplo, campos de golf), y en algunos países como en los E.E.U.U. también se utilizó (hasta 1994) para controlar las algas en las piscinas, estanques y acuarios ornamentales. Todos estos usos han hecho que la simazina continúe detectándose en el ciclo del agua, aunque afortunadamente cada vez a concentraciones más bajas.

Los 4 plaguicidas anteriores son los más relevantes en las 4 EDARs estudiadas, y los datos obtenidos para los mismos guardan similitud con los obtenidos en otros estudios realizados en España. Masiá y colaboradores (2013) estudiaron la presencia de una serie de contaminantes (entre ellos 14 de los plaguicidas analizados en esta Tesis Doctoral) en aguas residuales tratadas y no tratadas de 14 EDARs españolas situadas a lo largo de cuatro ríos: Júcar, Guadalquivir, Ebro y Llobregat. En este estudio, el diazinón fue el único plaguicida presente en el 100% de las aguas de entrada de las depuradoras, alcanzando concentraciones de 316 ng/L. Por otro lado, el plaguicida más abundante fue el diurón, alcanzando concentraciones de 2526 ng/L en aguas residuales no tratadas. La simazina se detectó en un 43% de las muestras, pero a concentraciones inferiores a 15 ng/L.

Por lo que respecta a los plaguicidas no detectados en las EDARs en los estudios realizados, los resultados son coherentes. La comercialización (y el uso) de dos de ellos, cianazina y metolacloro, está prohibida desde 2002, y la de fenitrotión desde 2007, y los otros dos plaguicidas no detectados tienen usos estrictamente agrícolas: el molinato se usa

únicamente en el cultivo del arroz y el linurón en diversos cultivos agrícolas. En concordancia con nuestros resultados, Masiá y colaboradores detectaron fenitrotión y molinato en tan sólo una de las muestras analizadas (una muestra de agua residual no tratada), y a bajas concentraciones (< 24 y 20 ng/L, respectivamente).

Sobre la eliminación de los plaguicidas durante el tratamiento de depuración de las EDARs, se sabe que tal eliminación no es obviamente uno de los principales objetivos de las plantas. Las EDARs se crearon con la finalidad principal de reducir la materia orgánica y, con el tiempo, ha quedado en evidencia la falta de eficacia de las mismas para la eliminación de muchos contaminantes y las consecuencias ambientales de los vertidos de las mismas cargados de nutrientes, lo que ha llevado a la adición de tratamientos de eliminación de nitrógeno y fósforo. Más recientemente, la escasez de recursos hídricos ha hecho que la re-utilización de las aguas residuales tratadas sea una práctica cada vez más extendida, que conlleva la necesidad de establecer tratamientos terciarios para satisfacer las demandas de uso.

Dejando a un lado los tratamientos terciarios aplicados en una minoría de las EDARs debido a su alto coste (aspecto discutido en el apartado 3.4.2 de este capítulo), gran parte de las depuradoras sólo tienen un tratamiento para reducir o eliminar los sólidos en suspensión (tratamiento primario) y una segunda etapa biológica para eliminar (o reducir) del agua la materia orgánica y nutrientes (tratamiento secundario), y acaban aportando al medio natural una carga importante y significativa de contaminantes orgánicos que, como muestra la Figura 3-1, se transforma en un ciclo continuo de contaminación. La escasa eliminación de microcontaminantes orgánicos en los tratamientos de depuración de aguas residuales se ha puesto de manifiesto tanto en los estudios presentados en esta Tesis Doctoral, como en otros (Kahle et al. 2008; Morasch et al. 2010; Teijon et al. 2010).

De forma general se puede comentar que, la eliminación de los plaguicidas durante su paso por las EDARs es variable, con concentraciones de plaguicidas en las aguas tratadas frecuentemente por encima de las concentraciones en las respectivas aguas de entrada. Es el caso de la atrazina, la bentazona, el isoproturón y el malatión, que en el 100 % de los casos (Figura 3-2) estudiados en la publicación #2 dieron concentraciones en las aguas tratadas por encima de las concentraciones en las respectivas aguas de entrada.

Se formularon varias hipótesis con el objetivo de justificar tales observaciones, entre las cuales se citan la desconjugación de metabolitos y/o productos de transformación, la hidrólisis y la desorción de los plaguicidas de la materia orgánica durante la depuración de las aguas. Otros factores como las propiedades físico-químicas de cada analito, el tipo de toma de muestra, la conservación de las mismas y la deposición atmosférica durante la depuración de las aguas también se evaluaron pero no observó relación con los resultados.

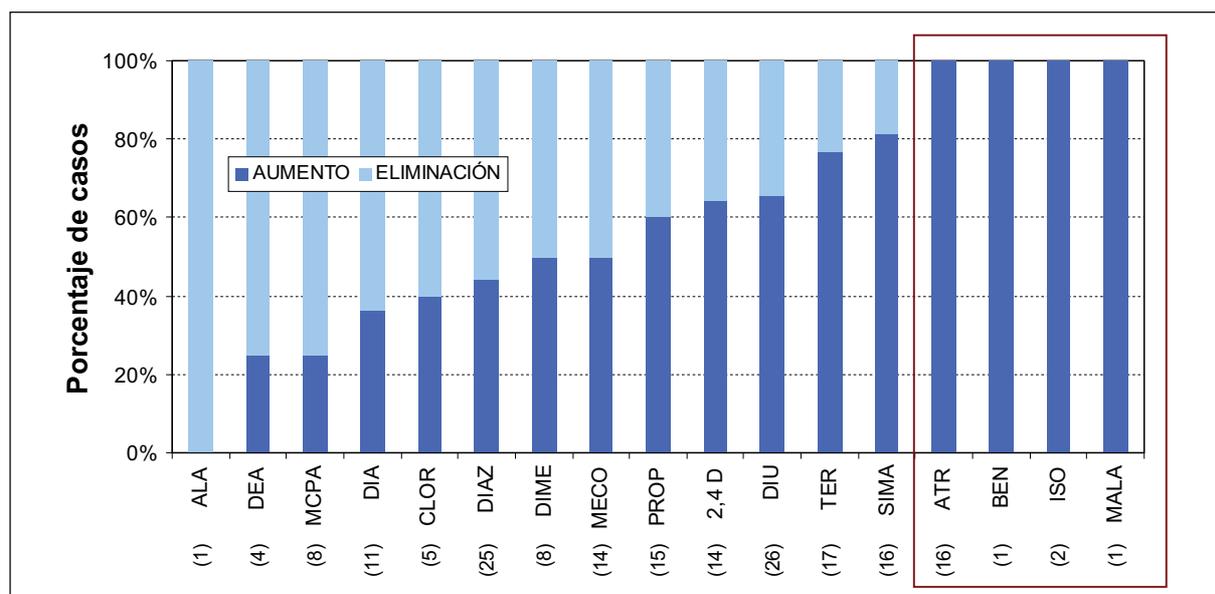


Figura 3 - 2. Eliminación de plaguicidas en las EDARs. Porcentaje de casos en los que se ha dado la eliminación parcial o total de los plaguicidas, o se han registrado aumentos de las concentraciones a la salida de las depuradoras cuando comparadas a las respectivas aguas de entrada. Sólo se han considerado los casos (en paréntesis) en que el analito se haya detectado en por lo menos una de las aguas, de entrada o de salida (ver las condiciones de los cálculos en la publicación #2).

En el caso de las aguas regeneradas, que han experimentado un tratamiento terciario, la situación es distinta. Los tratamientos son más complejos y con frecuencia, tal y como se comenta en las publicaciones #2 y #3 y en el siguiente apartado, llegan a eliminar de forma efectiva una gran cantidad de microcontaminantes orgánicos.

3.4.2. Tratamientos terciarios en las EDARs

Estos tratamientos se llevan a cabo en grupos de instalaciones en las que las aguas residuales tratadas (tratamiento secundario) se someten a tratamientos adicionales con el fin de mejorar la calidad de las mismas y en algunos casos cumplir con los requisitos mínimos imprescindibles para su uso posterior para otros fines. En general, este tratamiento tiene que eliminar la materia en suspensión, la turbidez y las sustancias peligrosas y, además, desinfectar el agua (Carrasco y Menéndez, 2010). A escala de laboratorio hay muchas técnicas en estudio, sin embargo, varias de ellas se aplican ya en plantas reales de tratamiento de agua. Las principales técnicas se presentan en la Tabla 3-2, así como cuáles de ellas se aplican en las dos EDARs con tratamiento terciario estudiadas en esta Tesis Doctoral.

El tratamiento terciario de la EDAR-El Prat combina, tras la eliminación de nutrientes,

una primera fase de decantación lastrada y una segunda fase de filtración terciaria con microtamices. La etapa de decantación lastrada se realiza mediante coagulación, floculación, maduración y decantación lamelar, a la que se le incorpora microarena, que actúa como lastre, consiguiendo una mejor calidad del agua clarificada, mayores velocidades de decantación y menor espacio de implantación en comparación con otros procesos convencionales. La etapa de MF (microfiltración) se realiza mediante 10 microtamices de 10 micras.

Tabla 3 - 2. Principales tratamientos terciarios existentes y su aplicación en las EDARs estudiadas en esta Tesis Doctoral.

Tratamientos terciarios	EDAR-A (publ. #2)	EDAR-EI Prat (publ. #3)
Eliminación de nutrientes		
- P _T : Eliminación de fósforo total		X
- N _T : Eliminación de nitrógeno total		X
Eliminación de materia en suspensión		
- Coagulación	X	X
- Floculación	X	X
- Decantación	X	X
Oxidación química / desinfección		
- Cl: Cloración	X	X
- UV: Ultravioleta		X
- O ₃ : Ozonización		
Filtración por membranas		
-- MF: Microfiltración (1-5 bares)	X	X
-- UF: Ultrafiltración (< 2 bares)		
-- NF: Nanofiltración (5-15 bares)		
-- Ol: Osmosis inversa (15-70 bares)		
Electrodialisis		
CA: Adsorción en carbón activo		
Intercambio iónico		
Destino de las aguas regeneradas	Riego y para uso del ayuntamiento	Riego y recarga de ríos

El tratamiento terciario de la EDAR-A es muy similar al de la EDAR EI Prat, con pequeñas diferencias. La EDAR-EI Prat, que sanea una población de 1 millón de habitantes,

elimina los nutrientes ($P_T + N_T$) y desinfecta con rayos UV, mientras que la EDAR-A, que sanea las aguas residuales de tan sólo 40 mil habitantes, no efectúa esos tratamientos (ver Tabla 3-2). La Figura 3-3 muestra las concentraciones de los cuatro plaguicidas más relevantes en términos de ubicuidad y abundancia (simazina, terbutilazina, diurón y diazinón) antes (agua tras tratamiento secundario) y después (agua regenerada) del tratamiento terciario aplicado en cada una de las dos EDARs.

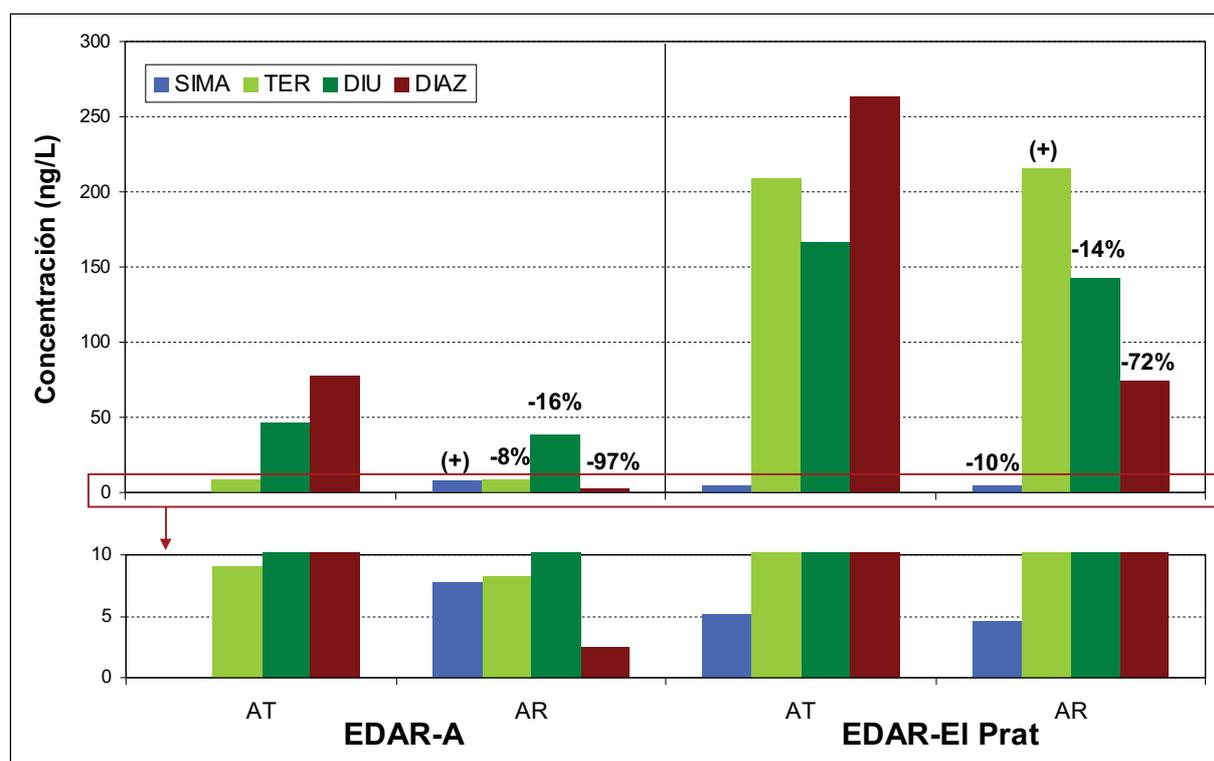


Figura 3 - 3. Concentración (ng/L) de simazina (SIMA), terbutilazina (TER), diurón (DIU) y diazinón (DIAZ) antes (AT – agua tratada) y después (AR – agua regenerada) del tratamiento terciario aplicado en la EDAR-A y en la EDAR de El Prat de Llobregat.

Es fácil constatar que, a pesar de las diferencias de concentraciones de plaguicidas detectadas en las dos EDARs, los perfiles son bastante similares. En ambos casos, las triazinas no se ven apenas afectadas por el tratamiento terciario, el diurón muestra una muy pobre eliminación, de alrededor del 15%, y el diazinón, el analito más abundante, presenta los mejores porcentajes de eliminación, llegando a un 97% en la EDAR-A.

Los resultados de los análisis comentados en el apartado 3.3.1, llevados a cabo en la EDAR El Prat en 2008, también son similares (ver Figura 3-4). La comparación de los niveles medidos en las aguas tratadas (punto #5) y en las regeneradas (punto #3) muestran una eliminación del 33 % (± 4) en la cantidad total de plaguicidas al cabo del tratamiento terciario. Sin embargo, es importante indicar que la eliminación no ocurrió para todos los plaguicidas en la misma proporción. El caso más evidente de eliminación es el del

órganofosforado diazinón, que responde positivamente a este tratamiento terciario mostrando eliminaciones del 54 al 94%. El diurón también muestra alguna atenuación aunque, de nuevo, no muy importante (11-18%). La triazina terbutilazina, por el contrario, no presenta diferencias significativas tras el tratamiento terciario. Estos resultados ponen en evidencia la falta de eficacia de este tipo de tratamiento para la eliminación de los plaguicidas objeto de estudio, lo que conlleva a cuestionar si los tratamientos terciarios son o no suficientes para la producción de aguas de calidad suficiente para los diferentes empleos a los que se destinan tras su tratamiento.

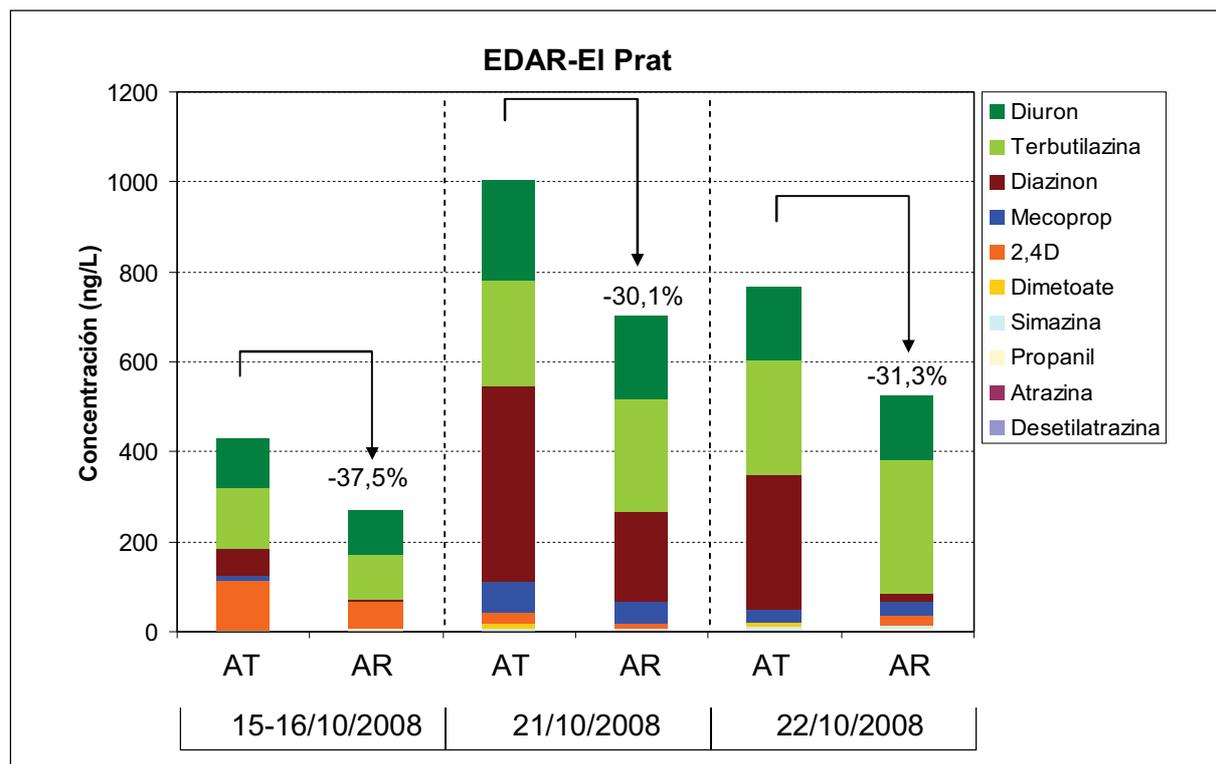


Figura 3 - 4. Concentración total de plaguicidas (ng/L) en aguas de la EDAR de El Prat de Llobregat: (AT) aguas tratadas (punto #5); (AR) aguas regeneradas (punto #3) (apartado 3.3.1).

Todos estos resultados son similares a los presentados por Teijón y colaboradores (2010) tras haber analizado una serie de contaminantes (entre ellos la simazina y el diurón) en la misma EDAR-EI Prat, en aguas de entrada, aguas regeneradas (con tratamiento terciario) y en aguas ultra puras, producto de un tratamiento adicional al terciario que incluye una UF (ultrafiltración), una OI (osmosis inversa) y una desinfección por UV. En este estudio, la concentración de la simazina no varió significativamente durante todo el proceso de depuración, sin embargo, el tratamiento adicional llevó a la simazina a niveles no detectables. En el caso del diurón, el tratamiento terciario convencional eliminó un 32% y

este porcentaje aumentó hasta el 90% tras el tratamiento adicional. El diazinón también se analizó, pero no se detectó en la planta.

La OI, técnica cara pero que cada vez tiene más adeptos, siempre se ha mostrado muy eficiente en la eliminación de microcontaminantes orgánicos persistentes (Pitarch et al. 2010; Teijón et al. 2010). Se trata de una tecnología de filtración por membrana diseñada para retener sales y otras sustancias disueltas de bajo peso molecular, lo que ha resultado en que suelen ser el tratamiento de elección cuando se necesita agua muy pura o de bebida.

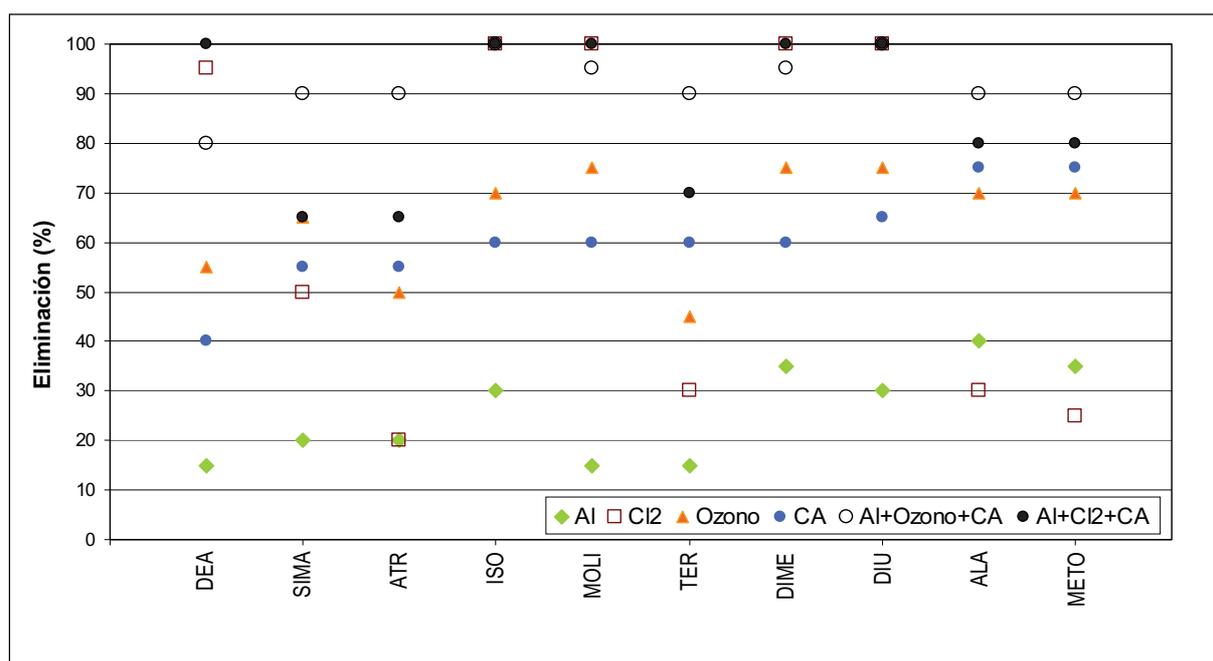


Figura 3 - 5. Estudio de la eliminación de plaguicidas con diferentes tratamientos: sulfato de aluminio (Al), oxidación con cloro (Cl₂), oxidación con ozono, adsorción con carbón activo (CA), y combinaciones de ellos. Resultados extraídos de Ormad et al. 2008.

Otras técnicas que presentan buenos rendimientos en la eliminación de microcontaminantes orgánicos como los plaguicidas son la desinfección por rayos UV y peróxido de hidrógeno (UV/H₂O₂ - Kruithof et al. 2013), la oxidación con ozono, y el uso de filtros a base de carbón activo (Moussavi et al. 2013). Ormad y colaboradores realizaron un estudio piloto en el que evaluaron la eliminación de plaguicidas mediante distintos tratamientos utilizados en los procesos de potabilización de aguas (Ormad et al. 2008). En él evaluaron la eficacia del uso de sulfato de aluminio para coagular-flocular-decantar los plaguicidas, del cloro y del ozono para oxidarlos, y del carbón activo para su adsorción. La Figura 3-5 presenta los resultados referentes a 10 plaguicidas en común con los analizados en esta Tesis Doctoral.

Como se observa, los bajos rendimientos asociados a la aplicación de sulfato de aluminio dejan en evidencia la necesidad de etapas complementarias a ésta para la eliminación eficaz de los analitos objeto de estudio. El tratamiento de oxidación con cloro mostró resultados muy variados dependiendo del compuesto. El tratamiento con ozono fue algo más uniforme en cuanto a los resultados y también más efectivo, con eliminaciones de entre el 45 y el 75%. El uso de CA presentó rendimientos en general por encima del 50%; sin embargo, tras un proceso previo de oxidación y decantación, la eficacia de eliminación aumentó al 100% para casi todos los analitos.

A pesar de los resultados favorables al uso del ozono como agente oxidante, por cuestiones de coste, muchas plantas de tratamiento de agua se inclinan por el uso de hipoclorito de sodio, a pesar de la consabida generación de subproductos del tipo de los trihalometanos (THM), con reconocida actividad cancerígena (Ormad et al. 2008).

En resumen, y según los resultados anteriores, para que los plaguicidas sean eliminados de forma eficaz en las plantas de depuración de aguas, lo ideal sería el uso del ozono como agente oxidante y la posterior adsorción de los contaminantes en carbón activo. Se trata de dos técnicas eficaces, pero costosas, lo que hace que su aplicación conjunta en plantas reales sea en muchos casos inviable.

3.4.3. Sobre la cantidad y calidad de las aguas regeneradas

La concienciación por la escasez de recursos hídricos, las nuevas tecnologías y las normativas en continua actualización hacen que cada vez más EDARs estén preparadas para regenerar sus aguas, o al menos parte de ellas. En 2007 se regeneraban en toda España más de 360 Hm³ de agua por año (ver Figura 3-6) y Cataluña era responsable del 12% de estas aguas (42,39 Hm³/año). Hoy, 6 años después, sólo la EDAR-EI Prat contribuye con aproximadamente 100 Hm³/año (300.000 m³/día) y la EDAR-A con otros 6 Hm³/año (16.500 m³/día).

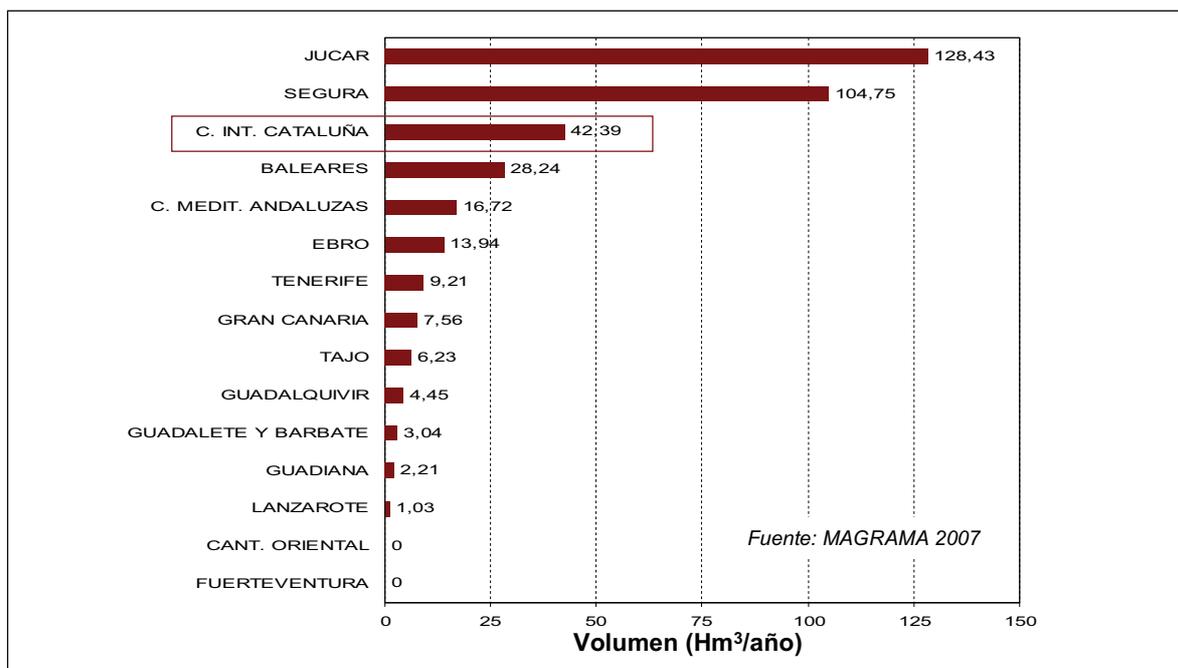


Figura 3 - 6. Volumen de agua residual regenerada que se re-utiliza en España, por zonas. Datos de MAGRAMA 2007.

Tabla 3 - 3. Principales usos de las aguas regeneradas permitidos por ley (Ormad et al. 2011).

Urbanos	Agrícolas	Industriales	Recreativos	Ambientales
<ul style="list-style-type: none"> • riego de jardines privados • riego de espacios verdes urbanos • limpieza de calles • sistemas contra incendios • limpieza industrial de vehículos 	<ul style="list-style-type: none"> • riego de cultivos que se consumen en forma fresca o que tienen un tratamiento industrial para su consumo • acuicultura • riego de cultivos diversos (no alimentarios) 	<ul style="list-style-type: none"> • limpieza • agua de proceso • en torres de refrigeración y condensadores evaporativos 	<ul style="list-style-type: none"> • riego de campos de golf • lagos • masas de agua • flujos de agua en arreglos ornamentales sin acceso público al agua 	<ul style="list-style-type: none"> • recarga de acuíferos por percolación o inyección directa • irrigación de bosques y otros lugares verdes no accesibles a las personas • silvicultura • mantenimiento de humedales • mantenimiento de caudales mínimos

La composición de estas aguas regeneradas depende principalmente de dos factores: la contribución industrial al vertido urbano y el tipo de tratamiento terciario aplicado en las respectivas EDARs. Estas aguas se caracterizan, entre otras cosas, por presentar

unos niveles máximos de turbidez (< 15 UNT) y de sólidos en suspensión ($SS < 35$ mg/L), y por la presencia de contaminantes inorgánicos, tales como cloruros, nitrógeno y fósforo, a diferentes concentraciones dependiendo de la planta de la que proceden (con o sin eliminación de nutrientes), y en algunos casos también de metales pesados que no han sido eliminados y cuya concentración depende principalmente de la contaminación industrial presente en el vertido urbano. Los parámetros de calidad se imponen en base al uso que se le dará al agua regenerada en cuestión (ver Tabla 3-3) y con el fin de no comprometer la salud humana.

En el caso del río Llobregat, el vertido de aguas regeneradas para el mantenimiento de sus caudales mínimos no parece afectar significativamente la calidad del agua del río ni el rendimiento del proceso de potabilización aplicado en la planta situada aguas abajo, por lo menos por lo que a plaguicidas respecta. Para comparar la calidad del agua del río Llobregat antes y después del vertido de aguas regeneradas (apartado 3.3.1) se evaluaron los datos del punto #2 (río Llobregat) antes (M1-5) y después (M10-13) del inicio de la reutilización de las aguas regeneradas para la recarga del río (ver Figura 3-7).

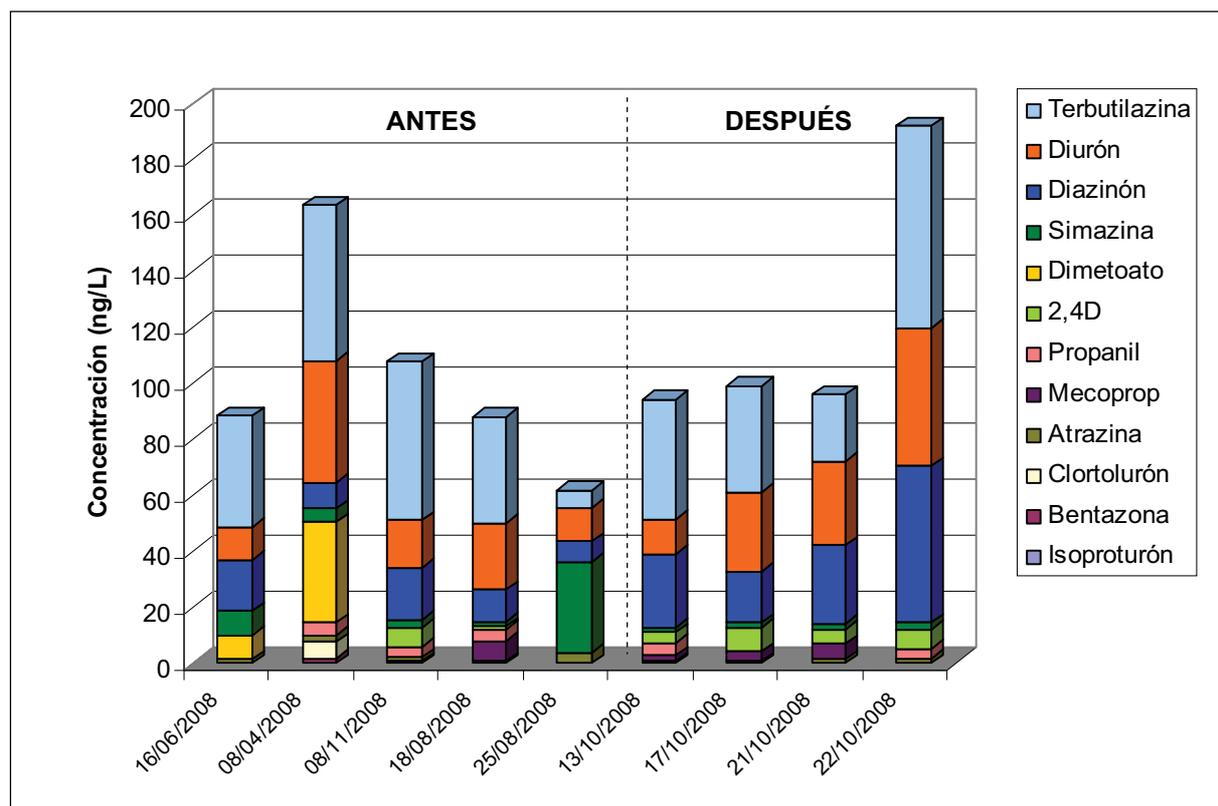


Figura 3 - 7. Concentración total de plaguicidas (ng/L) en el río Llobregat (punto #2) antes y después del inicio del vertido de aguas regeneradas.

Los resultados muestran que no hubo cambios evidentes en la concentración total de plaguicidas en las muestras de río tras el inicio del vertido de aguas regeneradas. Estos resultados tienen su lógica considerando que:

- el río Llobregat ya viene con su propia carga de plaguicidas, como producto de muchos otros efluentes (agrícolas, de otras depuradoras e industriales), y escorrentías (de zonas agrícolas y urbanas) que tienen lugar aguas arriba de los puntos de estudio, y

- el agua regenerada tiene una concentración total de plaguicidas aproximadamente 5 veces superior (~ 500 ng/L) a la encontrada en el río en el mismo punto (por ejemplo, 100 ng/L) y sufre un factor de dilución de 5 veces (promedio de $1,18$ m³/s de efluente en $4,96$ m³/s de río – apartado 2.2.2 de la publicación #3). Sin embargo, si se analiza la contribución de cada plaguicida proveniente del agua regenerada en contraste con su respectiva concentración en las aguas del río (Fig. 3, publicación #3), se observa claramente el aporte significativo de algunos plaguicidas como el diurón, el diazinón, la terbutilazina, el 2,4-D y el mecoprop a la contaminación del río Llobregat.

Finalmente, para evaluar el impacto de este tipo de re-utilización de aguas tratadas en el funcionamiento y el rendimiento de la Estación de Tratamiento de Agua Potable (ETAP) en estudio, se compararon las concentraciones de plaguicidas a la entrada (punto #2) y salida (punto #4) de la ETAP (apartado 3.3.1), antes del inicio de la re-utilización de las aguas regeneradas (M01 y M06) y después (M11-13 y M17-19).

Como ya se ha comentado anteriormente, no hubo cambios relevantes en la concentración total de plaguicidas en las muestras de río después del inicio del vertido de aguas regeneradas, por lo que el rendimiento de la ETAP a la hora de eliminar los plaguicidas presentes no debería en principio verse afectado. La Figura 3-8 muestra los resultados de este estudio en los que puede apreciarse que, si bien en la fecha de muestreo anterior al inicio de la reutilización parece darse alguna anomalía que afecta negativamente al rendimiento de la planta, ésta elimina en general de manera bastante satisfactoria los plaguicidas estudiados resultando en una carga final de los mismos en el agua potable inferior a 50 ng/L.

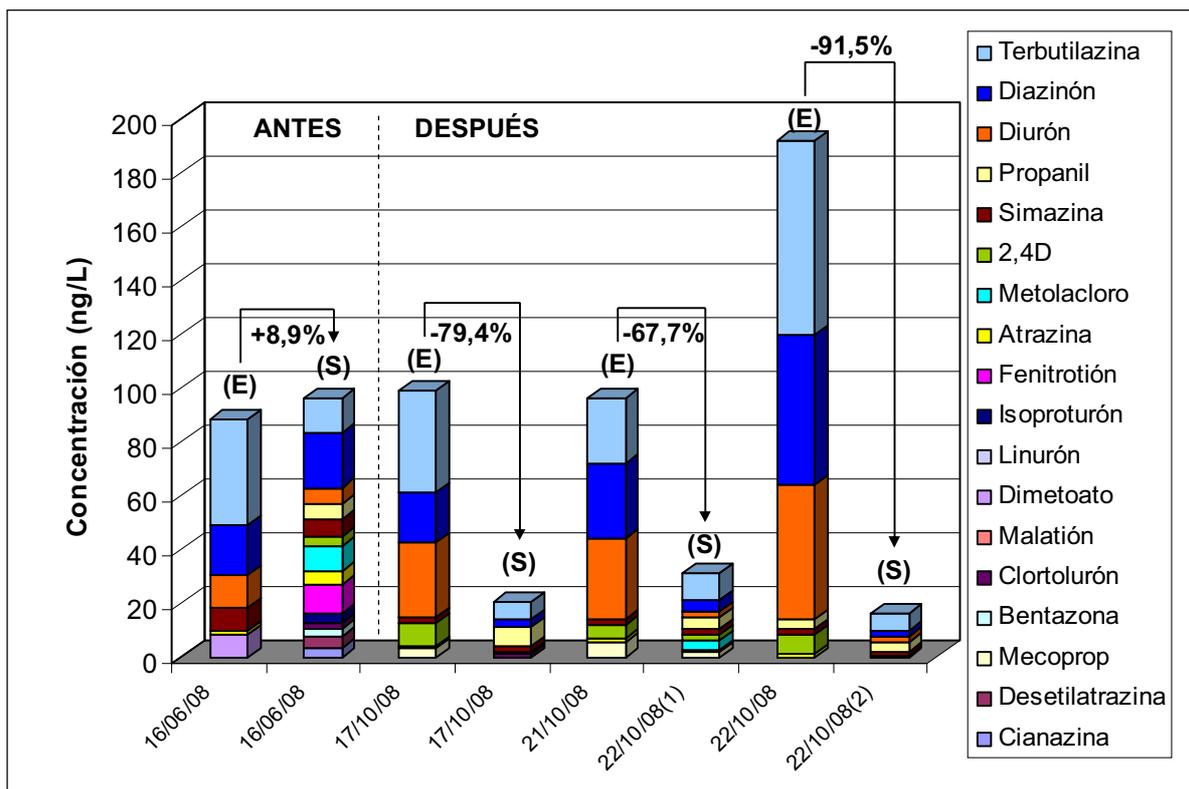


Figura 3 - 8. Concentración total de plaguicidas (ng/L) en aguas de (E) entrada (punto #2) y (S) salida (punto #4) de la potabilizadora, antes y después del inicio del vertido de aguas regeneradas en el río.

En resumen, estos estudios revelan que la re-utilización de las aguas regeneradas de la EDAR El Prat para usos ambientales como el mantenimiento de caudales mínimos en la parte baja del río Llobregat es viable y no compromete de forma significativa la salud de los ríos ni el rendimiento de la ETAP, por lo que se refiere a plaguicidas. Sin embargo, no puede decirse lo mismo de otros contaminantes como los estrógenos y fármacos (ver publicación científica # 3), por lo que la optimización de nuevas técnicas de regeneración de aguas es primordial para la preservación de la calidad química del ciclo del agua.

PLAGUICIDAS EN AGUAS Y SEDIMENTOS CONTINENTALES



4.1. Introducción y objetivos

En los últimos años, el crecimiento de la industria, la agricultura, la población y el consiguiente uso del agua ha aumentado la presión sobre la tierra y los recursos hídricos. Como muestra la Figura 4-1, sólo el 3% del agua de la tierra es dulce y de ella el 30,1% es agua subterránea y el 0,3% agua continental superficial; de ésta última, sólo el 2% corresponde a los ríos.

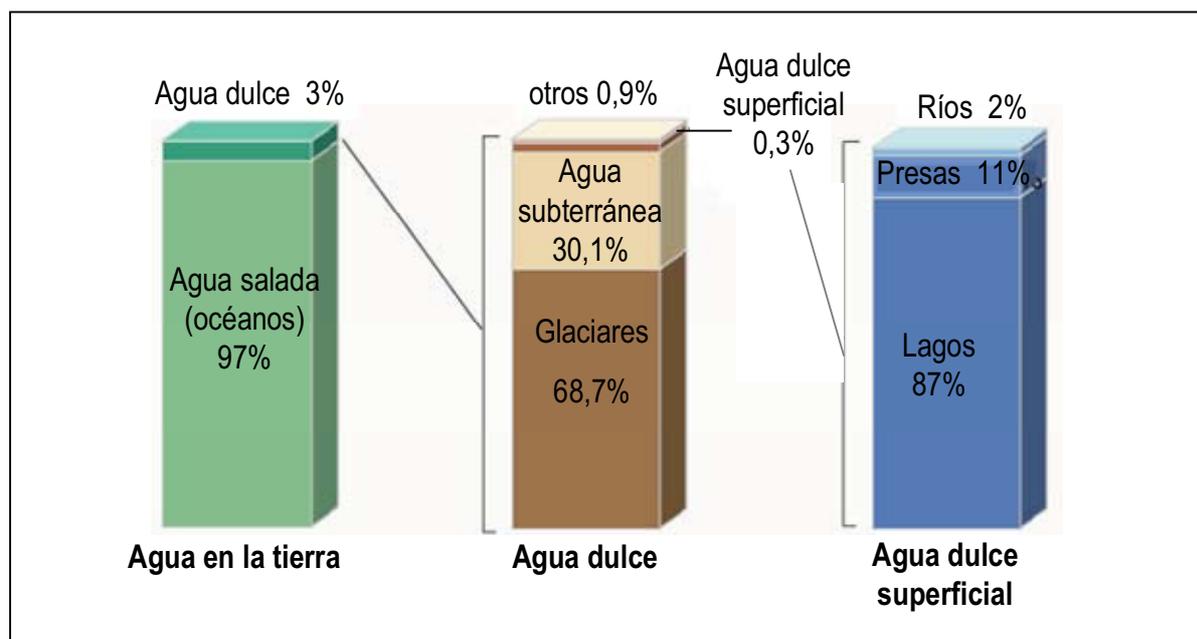


Figura 4 - 1. Distribución de agua en el mundo.

Como ejemplo de presión podemos citar a China, que en los últimos 10 años ha destruido 28000 ríos por medio de la creación de presas, cantidad de agua comparable al caudal del río Mississippi (Barceló y Navarro-Ortega, 2013).

En lo que a plaguicidas concierne, estas aguas han sufrido desde hace décadas el impacto del uso de estas sustancias, principalmente en la agricultura y, como consecuencia de ello, tanto ríos como lagos, manantiales y aguas subterráneas presentan plaguicidas. Esto se debe al transporte de estos compuestos a través de los diversos compartimentos ambientales, como se ilustra en la Figura 4-2.

Hay diferentes factores que controlan la circulación de los plaguicidas a través de los diversos compartimentos ambientales. La entrada de los plaguicidas a las aguas superficiales se da principalmente mediante la escorrentía urbana (provocada principalmente por las lluvias), la escorrentía agrícola (tras el uso agrícola de plaguicidas y del uso de agua subterránea contaminada con plaguicidas), y mediante los vertidos (urbanos e industriales). Su sedimentación depende principalmente de sus propiedades

físico-químicas. Su presencia en las aguas subterráneas se debe principalmente a la infiltración de aguas superficiales contaminadas a través del suelo o sedimento, como por ejemplo, en la recarga de acuíferos.

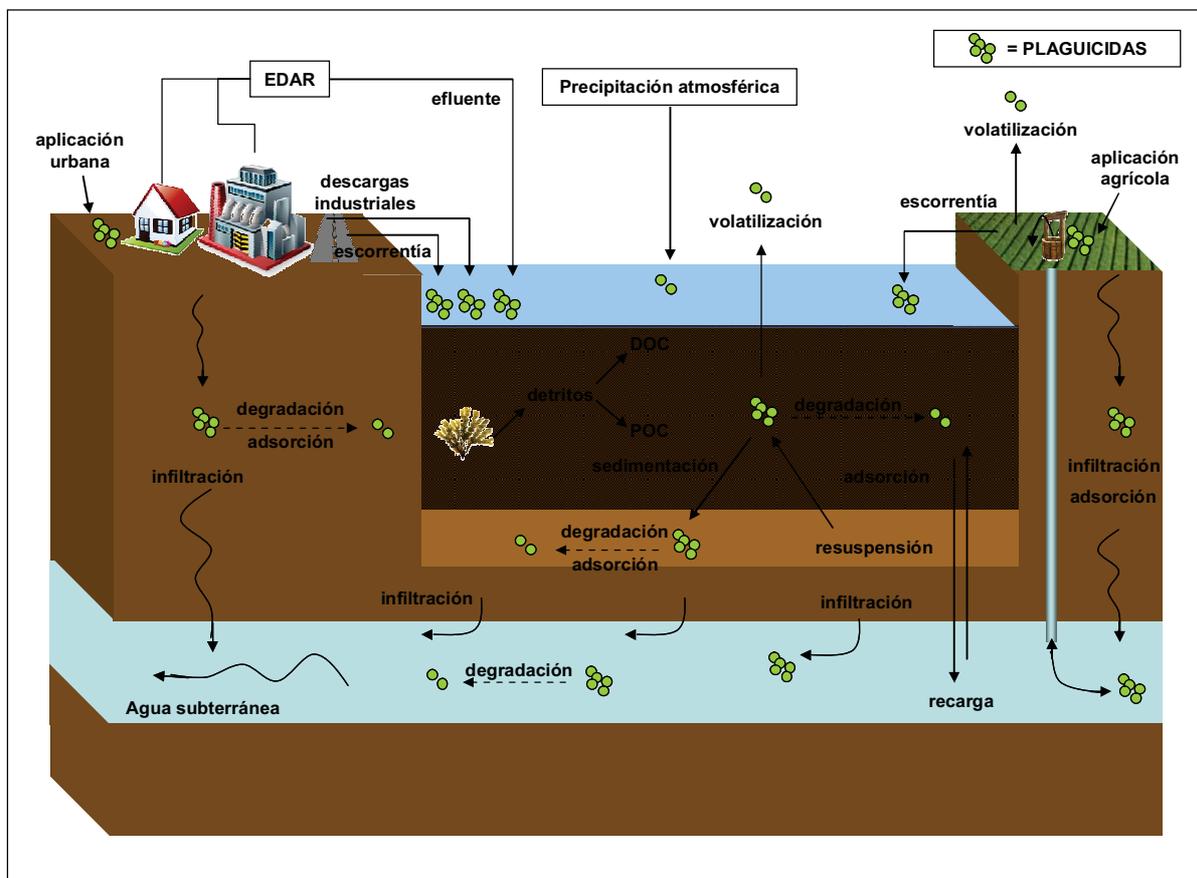


Figura 4 - 2. Ciclo de contaminación de las aguas y los sedimentos por plaguicidas. DOC: carbono orgánico disuelto (del inglés *dissolved organic carbon*); POC: carbono orgánico particulado (del inglés *particulated organic carbon*).

Como ya se ha comentado anteriormente, la presencia de plaguicidas en los diversos compartimentos ambientales es un tema complejo, y requiere del uso de diferentes herramientas, como por ejemplo las campañas de vigilancia, que ayudan a conocer su comportamiento y destino. Otros factores, como las propiedades físico-químicas de los plaguicidas, la meteorología, la localización geográfica así como las actividades realizadas en la zona, son de importancia para realizar un diagnóstico fiable de contaminación por plaguicidas.

En este sentido, el objetivo principal de este trabajo consistió en evaluar la presencia de los plaguicidas objeto de estudio en tres compartimentos ambientales diferentes (agua continental superficial, agua subterránea y sedimento) con el fin de trazar un perfil general de la presencia y el destino de estos contaminantes en el medio ambiente acuático.

Para ello, los objetivos específicos planteados en este trabajo fueron:

- aplicar las metodologías analíticas descritas en el Capítulo 2 de esta memoria en:
 - muestras de agua superficial:
 - del Delta del Ebro,
 - del río Llobregat,
 - muestras de agua subterránea:
 - de diferentes zonas de Cataluña,
 - de una zona piloto de estudio de procesos de recarga artificial de acuíferos localizada en la parte baja de la cuenca del Llobregat.
 - muestras de sedimentos:
 - de 4 ríos ibéricos,
 - de una capa reactiva usada en el anteriormente mencionado estudio de recarga artificial de acuíferos.
- comparar los resultados obtenidos en estos estudios con los publicados en otras zonas de España y en otros países
- evaluar la presencia de los plaguicidas objeto de estudio en los diversos compartimentos considerando los siguientes aspectos: propiedades físico-químicas de los plaguicidas, el factor temporal, la localización geográfica, las actividades realizadas en la zona, y la recarga de acuíferos.

Para ello, este capítulo está dividido en 3 apartados, correspondientes al estudio de plaguicidas en aguas superficiales, en aguas subterráneas y en sedimentos, seguidos de una discusión general de los resultados, e incluye las tres publicaciones siguientes:

- Publicación científica #4: Köck, M., Farre, M., Martinez, E., Gajda-Schranz, K., Ginebreda, A., Navarro, A., de Alda, M.L. and Barcelo, D., 2010. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology* 383 (1-2): 73-82.
- Publicación científica #5: Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Gonzalez, S., Cortina, J. L., Lopez de Alda, M. and Barcelo, D., 2012. Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain). *Chemosphere* 86 (1): 8-16.

- Publicación científica #6: Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., Garrido, T., Fraile, J., López de Alda, M., Barceló, D., 2014. Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain). *Science of the Total Environment*, 470-471 (2014) 1087-1098.

El estudio sobre la recarga artificial de acuíferos no se encuentra publicado, por lo que se presenta al completo, descrito en detalle, dentro del apartado dedicado a las aguas subterráneas; los resultados presentados en el apartado de sedimentos se han extraído de la publicación #1; y los estudios de toxicidad e impacto ambiental, llevados a cabo en los estudios incluidos en las publicaciones #4 y #5, se comentan en el Capítulo 5 de esta memoria.

4.2. Estudio de la presencia de plaguicidas en agua superficial

En este apartado se incluyen dos estudios, uno llevado a cabo en el Delta del Ebro, a petición y con la financiación de la Agencia Catalana del Agua (ACA), cuyo objetivo era tratar de dilucidar el posible efecto de los plaguicidas en la mortandad de marisco que se observa cada año en esta zona coincidiendo con la época de cultivo del arroz, y otro, llevado a cabo en la parte baja del río Llobregat, en el marco del proyecto español VIECO (desarrollo y validación de plataformas integradas de vigilancia biológica y química optimizadas económicamente), con la finalidad de estudiar la presencia y el impacto de los plaguicidas en esta zona del río, de un alto valor económico (por la intensa actividad agrícola e industrial), social (por utilizarse como recurso para la producción de parte del agua potable que se suministra a la ciudad de Barcelona) y ecológico (por el parque natural que se encuentra cerca de la desembocadura).

4.2.1. Caso de estudio: el Delta del Ebro

Publicación científica #4:

“Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain)”

Por:

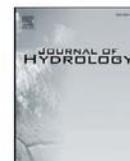
Marianne Köck, Marinella Farré, Elena Martínez, Krisztina Gajda-Schranz, Antoni Ginebreda, Asunción Navarro, Miren López de Alda, Damià Barceló

Publicada en “Journal of Hydrology”



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hydrology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhydrol

Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain)

Marianne Köck^a, Marinella Farré^a, Elena Martínez^a, Krisztina Gajda-Schrantz^b, Antoni Ginebreda^a, Asunción Navarro^a, Miren López de Alda^{a,*}, Damià Barceló^{a,c}

^aDepartment of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^bUniversity of Szeged, Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Szeged, Hungary

^cCatalan Institute for Water Research (ICRA), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, Edifici H2O, E-17003 Girona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Pesticides
Shellfish
Ecotoxicity
Water analysis
Ebro River delta
Monitoring

SUMMARY

Application of pesticides in the Ebro River delta (NE Spain) during the rice growing season is suspected to be one of the major causes behind the shellfish mortality episodes that occur yearly in this area at spring time. In an attempt to shed light on this suspicion, a monitoring study combining ecotoxicity measurements in water using three different bioassays and pesticides analysis in both water and shellfish has been carried out in this area in April–June 2008. Water and shellfish samples have been collected at six selected sites, two of them located in the bays where seafood (mussels and oysters) are grown, and four located in the main draining channels discharging the output water from the rice fields into the bays. Toxicity of the water samples has been evaluated using three standardized bioassays: 24–48 h immobilization of *Daphnia magna*, growth inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata* (formerly known as *Selemastrum capricornutum*) and bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. Analysis of pesticides (six triazines, four phenylureas, four organophosphorous, one anilide, two chloroacetanilides, one thiocarbamate and four acid herbicides) in water has been carried out by on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). Analysis of pesticides in shellfish has been performed by pressurized liquid extraction (ASE), followed by SPE clean-up and analysis by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS).

Results have shown individual pesticides concentrations in water above 100 ng/L for about 50% of the compounds investigated, and total pesticides levels above 5 µg/L in the draining channels some days. The most ubiquitous compounds have been bentazone and MCPA and the highest levels have been observed for malathion (up to 5825 ng/L) and MCPA (up to 4197 ng/L). In shellfish, malathion has shown the highest concentration (53 mg/kg). A reasonable coherence has been observed between pesticide concentration (in water and shellfish), toxicity, and mortality episodes of shellfish, for the different locations studied. Taking into consideration the pesticides concentrations found, the toxicity values for the individual compounds, and the toxicity data measured on real samples, the pesticides suspected to be the main contributors to the total ecotoxicity are malathion, and to a lesser extent diazinon and molinate.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The Ebro River (NE Spain) flows into the Mediterranean Sea after a course of more than 900 km (Ocampo, 2008), forming a delta, which goes some 20 km into the sea. The delta is a dynamic and complex structure originated from the alluvial sediments transported by the river, which have given rise, among other physical features, to two coastal shallow bays that extend along both sides of the river mouth (Manosa et al., 2001) (see Fig. 1).

The Ebro delta is considered one of the most important natural wetland areas in the western Mediterranean for birdlife preservation. The main economic activity of the area is agriculture, which is mostly dominated by rice (about 80% of the land is dedicated to its production) (Camp, 1994). Shellfish culture has been well developed in the shallow waters of the two aforementioned bays, and has become the second economic activity of the area after agriculture. 166 fixed mussel culture rafts are spread between the two bays, covering 1.8% and 6.5% of the total surface area of Alfacs (northern) and Fangar (southern) bays, respectively (Ramón et al., 2005). The relative importance of both activities is well reflected on the population labor distribution per activity: 70% is

* Corresponding author. Tel.: +34 934006100.
E-mail address: mllaqam@cid.csic.es (M.L. de Alda).

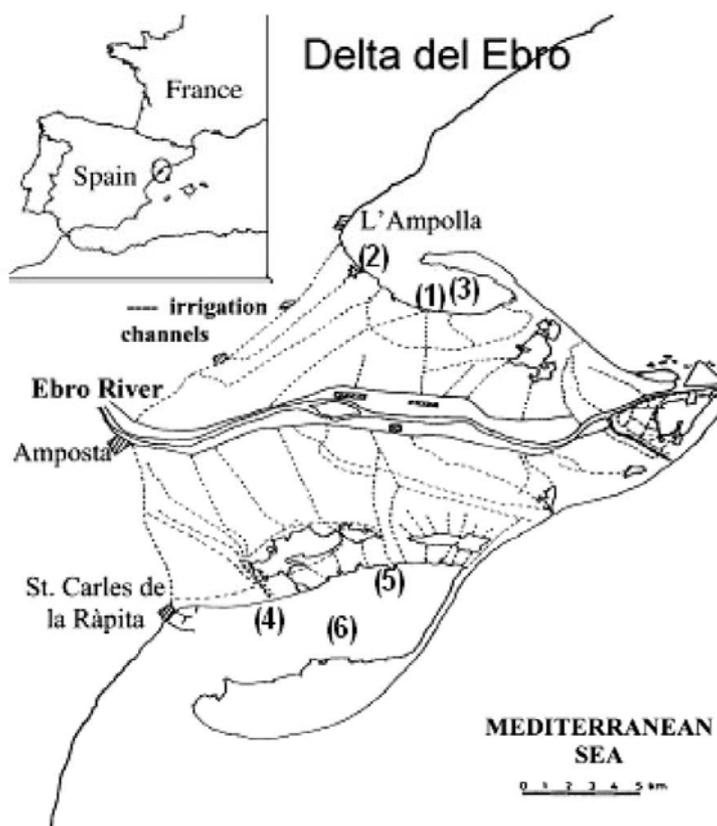


Fig. 1. Map of sampling sites at the Ebro River delta (NE Spain). Northern delta: (1) HEIMD: Illa de Mar draining channel; (2) HEOD: Olles draining channel; (3) HEM: Fangar bay. Southern delta: (4) HDCC: Campredó draining channel; (5) HDAD: Ala draining channel; (6) HDM: Alfacs bay.

dedicated to agriculture and 15% to shellfish production (Camp, 1994).

Agriculture related pollution, in the form of nutrients and pesticides, constitutes a major pressure to the quality of the water bodies of the delta (either lagoons, estuarine or marine waters), thus threatening their ecological status.

The extensive use of pesticides (herbicides, insecticides, plant growth regulators, fungicides, bactericides, etc.) in the area is well known from previously existing studies (Santos et al., 2000; Barata et al., 2007; Kuster et al., 2008) and has experienced changes, through the years, from persistent, not easily degradable compounds to more polar, readily degradable ones (Kampioti et al., 2005).

Recently, the shellfish farmers have complained about a loss of production in the periods of rice cultivation, which has raised public concern about the quality of the water in this area, thus pointing to the heavy pesticide loads discharged after rice field treatment, as the main responsible cause.

Environment quality standards (EQS) for 33 priority substances in surface aquatic bodies have been recently established in the Directive 2008/105/EC (Council of the European Communities, 2008), offspring of the Water Framework Directive (Council of the European Communities, 2000), and about a third part of the priority substances covered by this directive are pesticides. For other substances discharged in the basin the same WFD establishes that EQS must be derived from ecotoxicological data. This Directive

thus highlights the importance of combining data on chemical concentration and toxicological evaluation for integrated assessment of the status (chemical and ecological) of the water bodies, as stressed also by some authors (Blasco and Pico, 2009).

In this context, the purpose of the present study is to identify and assess major toxicants in the Ebro River delta on the basis of their adverse effects in combination with chemical analysis. The major goal is to explore potential cause–effect relationships for a reliable risk assessment of environmental contamination. To this end, a combined approach scheme using quantitative chemical analysis of pesticides and ecotoxicity bioassays has been carried out in order to assess the possible causes of the shellfish mortalities occurring in the Ebro River delta at spring time.

For this purpose, a fully automated multi-residue analytical method based on on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) (Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2008) has been applied for the determination of a selected group of 22 pesticides in surface water. These pesticides were selected on the basis of previously reported studies (Barata et al., 2007; Kuster et al., 2008), information gathered from the water authorities, and known use in rice crops. The monitoring study has been performed in six locations of the Ebro River delta between mid April and mid June 2008.

Ecotoxicity assessment of water samples has been carried out in parallel to chemical analysis using three standardized bioassays based on the micro-crustacean *Daphnia magna*, the algae *Pseud-*

okirchneriella subcapitata and the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri*.

In addition, biota samples have also been analyzed in order to assess the bioaccumulation of selected pesticides. The analysis of biota samples has been accomplished by pressurized liquid extraction (ASE) followed by gas chromatography–mass spectrometry with electron impact ionization (GC/MS-EI). Finally, pesticide concentrations, the ecotoxicity values for the individual compounds, and the toxicity data of real samples have been compared and interrelated in order to identify and assess the major toxicants in the surface waters of the Ebro River delta at spring time.

Experimental

Chemicals and standards

High purity (96–99.9%) standards of the selected pesticides were purchased from Sigma (St. Luis, MO, USA). Stock standard solutions of the individual analytes were prepared in methanol or a mixture of acetone:cyclohexane (1:9), and stored in the dark at 4 °C. Pesticide-grade solvents methanol, acetonitrile, dichloromethane and cyclohexane, and LC-grade water were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

Daphnia ephippias and the test algae *P. subcapitata* were obtained from Microbiotest Inc. (Mariakerke (Gent), Belgium). The *V. fischeri* assay used was the commercially available Microtox™ (Carlsbad, CA, USA).

Site description and sampling procedure

The Ebro River delta is among the three biggest rice growing areas in Spain. It has an approximate area of 20,600 ha of rice crop-

ping and a production of 113,500 Tm. The rice growth season extends from spring to early fall. The highest pesticide use goes approximately from April to June.

Surface water samples (a total of 104) were collected from the Ebro River delta (NE Spain) at six different locations: the two northern and southern bays (Fangar and Alfacs, respectively), and four main draining channels discharging the output water from the rice fields into them. Samples were taken on 18 days, in intervals of 4–6 days, between mid April and mid June 2008 (Fig. 1).

Water samples were collected in amber glass bottles and transported to the laboratory under cooled conditions (4 °C). Upon reception, samples were filtered through 0.45 µm Nylon filters (Whatman, Maidstone, UK) to eliminate particulate matter and other suspended solid matter and then stored at –20 °C in the dark until analysis.

The seven oyster and three mussel samples analyzed were collected alive from the two bays, Fangar (HEM) and Alfacs (HDM) during the same period as water samples (mid April to mid June). Oysters and mussels were lyophilized and blended with mortars before analysis. Each sample corresponded to the pool of 8–12 individuals.

Analysis of pesticides in water

The list of target pesticides measured in water included six triazines (atrazine, simazine, cyanazine, desethylatrazine, terbutylazine, deisopropylatrazine), four phenylureas (diuron, isoproturon, linuron, chlortoluron), four organophosphates (diazinon, dimethoate, fenitrothion, malathion), one anilide (propanil), two chloroacetanilides (alachlor, metolachlor), one thiocarbamate (molinate) and four acid herbicides (mecoprop, 2,4 D, bentazone, MCPA).

Table 1
Fifty percent effective concentration (EC₅₀) and toxicity units (TU) of the pesticides investigated against each of the three tested organisms.

Pesticide	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Daphnia Magna</i>		<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
	EC ₅₀ (µg/L)	TU (µg/L)	EC ₅₀ (µg/L)	TU (µg/L)	EC ₅₀ (µg/L)	TU (µg/L)
<i>Acids</i>						
Mecoprop	–	–	100	1.000	10,300	0.010
2,4 D	–	–	126	0.794	24,200	0.004
Bentazone	–	–	64,000	0.002	4500	0.022
MCPA	–	–	190,000	0.001	80,000	0.001
<i>Anilides and chloroacetanilides</i>						
Alachlor	160,000	0.001	10,000	0.010	10	10.000
Metolachlor	17,000	0.006	23,500	0.004	55	1.818
Propanil	–	–	2000	0.050	50	2.000
<i>Organophosphates</i>						
Diazinon	84,000	0.001	0.6	166.667	10,000	0.010
Dimethoate	55,500	0.002	1800	0.056	35,000	0.003
Fenitrothion	1500	0.067	50	2.000	800	0.125
Malathion	37,000	0.003	0.7	142.857	18,000	0.006
<i>Phenylureas</i>						
Diuron	43,240	0.002	8600	0.012	2.4	41.667
Isoproturon	96,000	0.001	580	0.172	21	4.762
Linuron	5500	0.018	310	0.323	67	1.493
Chlortoluron	45,000	0.002	6700	0.015	1	100.000
<i>Thiocarbamate</i>						
Molinate	2500	0.040	1830	0.055	70	1.429
<i>Triazines</i>						
Atrazine	39,800	0.003	50	2.000	21	4.762
Simazine	10,000	0.010	38	2.632	2	50.000
Cyanazine	78,500	0.001	23	4.348	27	3.704
Desethylatrazine	81,860	0.001	50	2.000	27	3.704
Terbutylazine	–	–	5000	0.020	16	6.250
Deisopropylatrazine	12,740	0.008	5000	0.020	25	4.000

EC₅₀: effective concentration that produces a specific measurable effect in 50% of the test organisms.
TU: toxic unit.

These pesticides were analyzed in water following a previously described method based on on-line SPE-LC-MS/MS (Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2008). Briefly, water samples (10 mL) are extracted with the aid of an automated on-line solid-phase extraction (SPE) sample processor Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), configured for high sample volumes and connected in series with the LC-MS/MS instrument, using two types of disposable trace enrichment polymeric cartridges: Hypsphere Resin GP and PLRP-s, both from Spark Holland. The Hypsphere Resin GP cartridge is used for extraction of the pesticides (six in total) that are measured in negative ionization (NI) mode in the subsequent analysis, and the PLRP-s cartridge is used for extraction of the pesticides measured in positive ionization (PI) mode (16 compounds). In both cases, after sample loading, the cartridges are washed with 1 mL of water and further eluted with the chromatographic mobile phase.

Chromatographic separation is performed in a Waters Alliance 2690 LC pump (Milford, MA, USA) using a Purospher STAR RP-18e column (125 × 2 mm, 5 µm particle diameter) and gradient acetonitrile/water as mobile phase. MS/MS detection is performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode acquiring two SRM transitions per compound using a Quattro triple-quadrupole mass spectrometer from Micromass (Manchester, UK) equipped with an electrospray interface.

Ecotoxicity bioassays

Three standard toxicity assays were applied for aquatic toxicity assessment: *D. magna* (ISO 6341, 1996), *P. subcapitata* (ISO 8692, 2004) and *V. fischeri* (ISO 11348-3, 1998).

Toxicity of each sample was evaluated in duplicate with the test based on immobilization of *Daphnia magna*, and the samples were run in triplicate with the tests based on inhibition of *P. subcapitata* and *V. fischeri*. Data treatment was performed using GrapPad Prism 4.00.

To assess the contribution of each pesticide to the total toxicity of a sample against a particular organism, and whether the presence of pesticides is the main cause of toxicity, a simple additive model has been applied. For each sample and organism a theoretical toxicity value has been calculated according to the following expression:

$$T_{\text{theor}j} = \sum C_i \times TU_{ij} \tag{1}$$

where C_i is the concentration of pesticide i on a given sample, and TU_{ij} is the value expressing the toxicity units of that pesticide i towards the specific test organism j .

In turn, the toxicity units TU_{ij} for each individual pesticide i and test organism j are calculated according to the Sprague equation (2) (Sprague and Ramsay, 1965):

$$TU_{ij} = (EC_{50})_{ij}^{-1} \times 100 \tag{2}$$

where $(EC_{50})_{ij}$ is the 50% effective concentration of compound i on organism j . $(EC_{50})_{ij}$ values for the compounds and organisms concerned in the present study, listed in Table 1, have been extracted from the existing bibliography (mainly from <http://www.pesticideinfo.org>).

Thus, for each sample a theoretical toxicity value $T_{\text{theor}j}$ for each test organism j has been calculated according to Eq. (1). The so obtained theoretical toxicities have been subsequently compared with the experimental toxicity values measured for each sample and the same test organism, expressed as the percentage of inhibition.

D. magna 24–48 h acute immobilization tests

Static acute 24–48 h assays were conducted according to internationally accepted Standard Methods (OECD and ISO). The tests are performed using neonates which are hatched in about 3 days from the eggs at 20–22 °C, under continuous illumination of 6000 lux. Immobility at 24 h and 48 h is the bioassay endpoint, assumed to be equivalent to mortality. For each test a control solution is measured. A bench of dilutions of each sample (0%, 10%, 25%, 50%, 75% and 90%) is tested using two replicates for each dilution with 10 neonates per replicate. *Daphnia* neonates exposed to the blanks and to the different dilutions are incubated in darkness at 20 °C. After 24 h and 48 h of exposure the number of immobilized organisms is determined.

Different standard substances are also evaluated and after the test the percentage of immobilization is plotted against Logarithm concentration. A four parameters equation is fitted, and the EC_{50} and the EC_{20} are determined as the concentrations producing 50% and 20% of immobilization, respectively.

Pseudokirchneriella subcapitata

The microalgae growth inhibition test with *P. subcapitata* was performed according to the OECD Guideline 201, and the ISO norm. In this test the optical density (at 670 nm) is used as the parameter to measure the algal growth inhibition. In brief, surface water samples are filtered through Watmann GF/C glass fibre filters and spiked with ISO 8692 algal growth medium concentrate. Then, series of dilution of each sample are prepared according to the instructions given in the Standard Operation Procedure Manual. The dilution series of each sample (5%, 10%, 25%, 50%, 75%, and 98.7%) are performed in triplicate. A blank dilution is included in each series. The sample dilutions and the blanks are inoculated with the microalgae from the concentrated suspension to obtain 1.10^4 cells/mL as the start algae concentration. The tests are performed in 10 cm path-length cuvettes which are used for the direct scoring of the optical density in a spectrophotometer. The cuvettes are incubated for 72 h in an incubator (Aqualytic by MicroBioTest Inc.) at 23 °C, with a continuous sideway illumination of 10,000 lux. The optical density of the algal suspensions is read prior to the addition of algae, immediately after addition of the algae (0 h), and after 24, 48 and 72 h of exposure, in a Jenway 6300 spectrophotometer (Essex, England). Specific growth rate is calculated from the logarithmic increase in cell density in each culture. The

Table 2
Analysis of pesticides in shellfish: selected monitoring ions and method validation parameters.

Pesticide	Selected ions	Recovery (%)	RSD ^a (%)	LOD ^b (ng/g)	LOQ ^c (ng/g)
Molinate	126 ^d /55/187	65.82	23.03	29.45	97.21
Propanil	161 ^d /163/217	89.11	7.14	32.24	96.72
Fenitrothion	277 ^d /125/109	74.28	19.88	62.06	186.88
Malathion	125 ^d /173/93	84.14	8.08	302.57	907.72
Bentazone	119 ^d /198/161				
Cipermetrin	163 ^d /208/415	76.25	22.67	75.76	227.29
Fenitrothion oxon	109 ^d /244	124.23	2.80	126.15	378.45
Malaoxon	127 ^d /99/200	99.58	23.83	87.79	263.39

^a Relative standard deviation.
^b Limit of detection.
^c Limit of quantification.
^d Ion used for quantification.

Table 3
Frequency of detection (DetF) and average and maximum concentration of individual pesticides in water samples.

Pesticide	HDAD			HDXD			HEOD			HEMD			HDM			HEM			All sites			EQS ^a		
	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	DetF (%)	Average (ng/L)	Max cone (ng/L)	Max cone (ng/L)	MAC (ng/L)	
<i>Acidic</i>																								
Metoprop	89	14	25	88	12	20	94	14	23	100	12	26	100	3	5	81	5	10	87	11	26	-	-	
2,4-D	89	31	168	88	18	86	94	12	26	94	11	42	94	9	21	81	5	13	84	15	168	-	-	
Benazone	100	1042	3285	100	557	1434	100	697	2479	100	714	2576	100	112	341	100	212	1239	100	567	3286	-	-	
MCPA	100	419	2073	100	448	1491	100	344	1253	100	675	4197	100	76	232	100	136	407	100	356	4197	-	-	
<i>Anilides</i>																								
Alachlor	39	491	1560	41	206	402	33	180	447	28	242	785	24	42	77	6	55	55	29	246	1560	700	-	
Metolachlor	56	6	11	35	5	8	39	6	14	61	7	15	6	4	4	6	2	2	35	6	15	-	-	
Propanil	28	218	586	59	29	172	22	93	355	33	101	294	47	62	190	50	105	361	39	90	586	-	-	
<i>Organophosphates</i>																								
Diazinon	100	26	215	94	4	9	100	15	83	100	8	25	100	2	4	100	3	7	99	10	216	-	-	
Dimethoate	67	13	59	59	21	75	56	33	60	44	23	54	18	7	11	31	10	25	46	20	75	-	-	
Fenitrothion	67	376	1197	47	137	221	22	373	652	33	325	740	6	51	51	6	145	145	31	289	1197	-	-	
Malathion	83	1070	2648	82	984	3164	83	1263	4565	78	1865	5825	35	133	400	44	64	201	68	1072	5825	-	-	
<i>Phenylureas</i>																								
Diuron	100	56	122	100	57	87	100	156	408	100	103	360	82	14	33	88	24	92	95	72	408	1800	-	
Isoproturon	33	5	7	24	4	4	22	5	9	33	6	9	6	2	2	13	1	2	22	5	9	1000	-	
Linuron	0	-	-	6	5	5	22	10	15	0	-	-	0	-	-	0	-	-	5	9	15	-	-	
Chlorotoluron	33	3	4	6	3	3	28	3	6	28	3	4	0	-	-	0	-	-	16	3	6	-	-	
<i>Thiocarbamate</i>																								
Molinate	100	554	3590	100	710	2994	94	722	3502	100	774	2201	82	85	420	81	122	275	93	526	3590	-	-	
<i>Triazines</i>																								
Atrazine	78	13	25	76	10	19	100	12	31	83	15	39	24	4	5	38	6	9	67	11	39	2000	-	
Simazine	100	65	170	100	99	667	94	36	95	94	25	50	71	23	47	63	11	27	88	47	667	4000	-	
Cyanazine	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-
Desethylatrazine	83	18	35	82	15	50	94	18	28	89	18	37	41	5	10	56	8	12	75	15	50	-	-	
Terbutylazine	83	505	1550	82	576	1476	94	88	169	94	215	669	82	86	250	81	40	144	87	250	1550	-	-	
Desopropylatrazine	44	10	13	71	10	19	6	2	2	6	3	3	0	-	-	0	-	-	21	9	19	-	-	

^a Environmental quality standards for priority substances and certain other pollutants (Directive 2008/105/EC). MAC: Maximum Allowable Concentration for inland surface waters.

growth rates are calculated as percentages of the mean growth rate of the controls and plotted against the logarithm of the concentration of water. A log–logistic model is used to fit a response curve to the data points. The concentrations causing 20% and 50% of growth inhibition (EC_{20} and EC_{50}) with 95% confidence limits are derived from the model. Toxicity is expressed relative to water sample percentage. Finally, the toxicity values are converted to toxic units, TU.

Bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*

The experimental procedure for conducting the bacterial bioluminescence assay was based on the ISO protocol. The analysis is carried out with all dilution and reagents tempered at 15 °C. For the good performance of the tests, the osmolality is adjusted in order to obtain a 2% of saline in each solution or sample. Bacterial reagents are reconstituted just prior to the analysis and the pre-incubation times follow standard protocols. In all measures, the percent of inhibition (% I) is determined by comparing the response given by a saline control solution to that corresponding to the diluted sample. Each dilution was tested in triplicate.

The concentration of toxicants in the test which causes a 50% of bioluminescence inhibition after exposure for 15 or 30 min is designed as the EC_{50} value. Tests are performed at 15 °C. The measurements of bioluminescence are made using the luminometer ToxAlert100 (Merck).

Analysis of pesticides in shellfish

The analysis of pesticides in shellfish was performed with a method specifically developed for the purpose of the study, based on pressurized liquid extraction (PLE), followed by SPE clean-up of the extract with Florisil, and analysis by GC/MS. A total of eight pesticides and metabolites, namely, molinate, propanil, fenitrothion, malathion, bentazone, cypermethrin, maloxon and fenitrothion oxon, are measured. Acetochlor D11, alachlor D13 and ethyl parathion D10 are used as surrogate standards for quantification.

Extraction of the samples is performed with a Dionex ASE 200 accelerated solvent extractor using 11 mL stainless-steel extraction cells. The lyophilized sample (0.25 g) is mixed with 50 μ L of the surrogate standard solution (10 ng/ μ L) and Hydromatrix (Varian, Palo Alto, USA) and extracted with a mixture of methanol:dichloromethane (1:1) under the following experimental conditions: pressure, 2000 psi; oven heat-up time, 5 min; oven temperature, 100 °C; flush volume, 100%. Extracts are blown down to 0.5 mL under nitrogen, cleaned by SPE with Florisil (5 g, from Biotage, Uppsala, Sweden), evaporated, and reconstituted in 1 mL with a mixture of acetone:cyclohexane (1:9).

GC–MS analysis of the purified extracts is performed with electron impact ionization (GC/MS-EI) at 70 eV using a Trace GC system coupled to a Voyager MS detector (ThermoQuest Finnigan, USA). Separation is carried out in a HP-5MS capillary column (30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μ m film thickness, from J&W Scientific, Folsom, CA, USA) with the following temperature programme: from 80 °C (holding time 1 min) to 150 °C at 20 °C/min, then to 300 °C at 3 °C/min, and finally to 330 °C at 20 °C/min (holding time 5 min). Injection (2 μ L) is performed in the splitless mode keeping the split valve closed for 0.8 min (injector temperature, 280 °C). Helium is used as carrier gas at a flow of 1.2 mL/min.

MS detection is performed in the selected ion monitoring (SIM) mode by acquiring three characteristic ions per compound (two in the case of fenitrothion oxon), as shown in Table 2. For the positive confirmation of analytes in the samples, the following criteria had to be met: the chromatographic retention time of the analyte in the sample can not vary more than 2%, and the relative abundance of the selected ions has to lie within the 20% margin, compared to the calibration standards. Other operating conditions are as follows: ion source temperature, 200 °C; interface temperature,

280 °C. The performance characteristics of the method in terms of accuracy, repeatability and sensitivity are listed in Table 2.

Results and discussion

Of the 22 pesticides analyzed in water, 21 were found to be present in some or all of the samples analyzed; cyanazine was the only undetected compound. The frequency of detection, the maximum and average concentrations determined for each individual pesticide in the various sampling sites monitored, and the EQS stipulated by the EU for 5 of the 22 pesticides investigated (Council of the European Communities, 2008), are given in Table 3. Bentazone and MCPA were identified in all the samples and malathion followed by MCPA were the compounds found at highest concentrations (5825 and 4197 ng/L, respectively, both in the draining channel HEIMD). In what compliance with the stipulated legislation is concerned, only alachlor was found to exceed the proposed EQS of 700 ng/L in two of the samples investigated.

Comparison of the results obtained in the present study with those reported in a previous one conducted in the same area in 2005 (Barata et al., 2007) shows, for the two sites investigated in both studies (the draining channels HDAD and HDAD discharging into the southern bay), a general good agreement for all pesticides except for bentazone, MCPA, propanil, and atrazine, which present now comparatively lower concentrations, and alachlor, malathion, diuron, and molinate, whose levels have increased considerably (see Table 4).

Comparing the different sampling points monitored in the present study (see Table 5), HEIMD, followed by HDAD, are the most

Table 4
Comparison of pesticides concentrations (ng/L) reported for sites HDAD and HDAD in this study and in a previous one carried out in 2005.

Pesticide	HDAD		HDAD	
	2005 ^a	2008 ^b	2005 ^a	2008 ^b
<i>Acids</i>				
Mecoprop	8	12	7	14
2,4 D	24	18	12	31
Bentazone	80,006	557	95,466	1042
MCPA	2242	448	897	419
<i>Anilide and chloroacetamides</i>				
Alachlor	218	206	32	491
Metolachlor	n.d.	5	n.d.	6
Propanil	398	29	1757	218
<i>Organophosphates</i>				
Diazinon	11	4	3	26
Dimethoato	n.m.	21	n.m.	13
Fenitrothion	165	137	317	376
Malathion	n.d.	984	n.d.	1070
<i>Phenylureas</i>				
Diuron	15	57	17	56
Isoproturon	2	4	2	5
Linuron	n.m.	5	n.m.	n.d.
Chlortoluron	n.d.	3	nd.	3
<i>Thiocarbamate</i>				
Molinate	318	710	331	554
<i>Triazines</i>				
Atrazine	412	10	445	13
Simazine	138	99	53	65
Cyanazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Desethylatrazine	n.m.	15	n.m.	18
Terbutylazine	n.m.	576	n.m.	505
Deisopropylatrazine	n.m.	10	n.m.	10

n.d.: not detected.

n.m.: not measured.

^a Barata et al. (2007) (average of four measurements performed monthly between May and August 2005).

^b This study (average of 18 measurements performed between April and June 2008).

Table 5
Total pesticides concentrations in water (ng/L) in the six sampling sites investigated.

Sampling sites	Description	Percentage of samples with total pesticides levels >5 µg/L (%)	Highest total pesticides values	
			Day	Concentration (ng/L)
HEIMD	More inside draining channel point (left side)	39	19/05/2008	9798
HEOD	More outside draining channel point (left side)	17	19/05/2008	9217
HEM	Bay (left side)	0	12/06/2008	1982
HDAD	More inside draining channel point (right side)	22	19/05/2008	6530
HDCD	More outside draining channel point (right side)	18	08/05/2008	6200
HDM	Ray (right side)	0	15/05/2008	1580

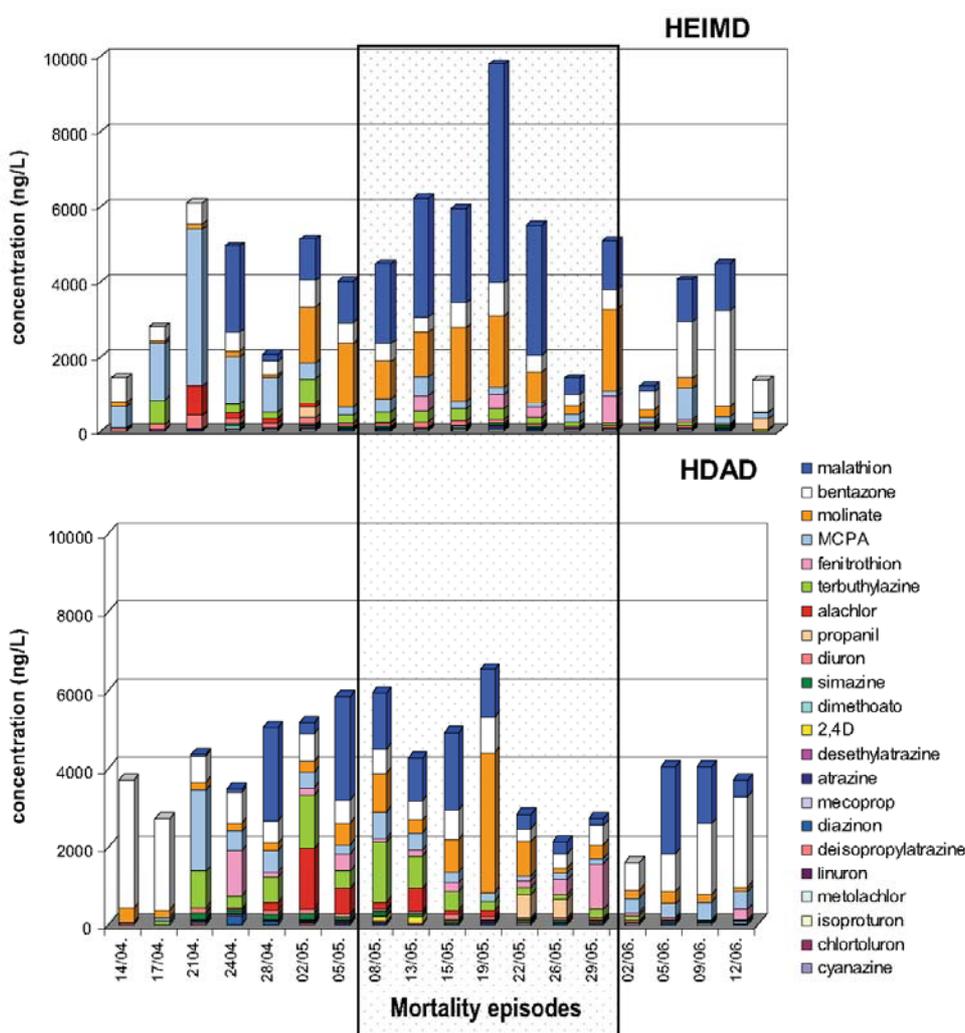


Fig. 2. Total pesticides concentration in water samples in the draining channels HEIMD and HDAD (the list starts with the most concentrated pesticides).

polluted ones, showing concentration levels of total pesticides exceeding 5 µg/L in 39% and 22% of the samples analyzed, respectively. Their time evolution during the period of study is depicted

in Fig. 2. Conversely, the sampling points located in the two bays (HEM and HDM) are the ones showing the lowest concentration values, as could be expected due to the dilution effect of the marine

water. This dilution effect explains also the higher pollution level found in the northern bay as compared to the southern bay, which is consistent with its comparatively smaller size and depth.

Due to breakage during sample transport and manipulation, toxicity was measured in only 14 of the 18 days screened for pesticides. The results of the toxicity evaluation of the water samples are summarized in Fig. 3. In 8 out of the 14 monitored days high toxicity values, i.e., above 50% inhibition, were recorded for at least one organism in at least one of the six studied sampling sites. It is worth noting that peak toxicity values were in fair concordance with the shellfish mortality episodes reported in the same period, considering that, in general, mortality episodes occurred with a slight delay in relation to toxic samples. Among the three toxicity bioassays tested, *D. magna* exhibited the best fitting with the re-

ported shellfish mortality episodes, which can be explained by its closer taxonomic proximity (micro-crustacean versus bacteria and algae).

Similar trends have been obtained between the theoretical toxicity values and the experimental data; the differences between theoretical and experimental toxicity might be explained by synergism, matrix effects, and other not investigated chemicals (such as different pesticides, heavy metals etc.). As an example, Fig. 4 shows this comparison for *D. magna*.

According to the results obtained, and assuming that the simple additive approach used in Eq. (1) is valid, the concentration of malathion determined in the samples appears to be the main contributor to *Daphnia* toxicity (98% toxic contribution on average for all samples), followed by diazinon. For *V. fischeri*, molinate, fenitrothi-

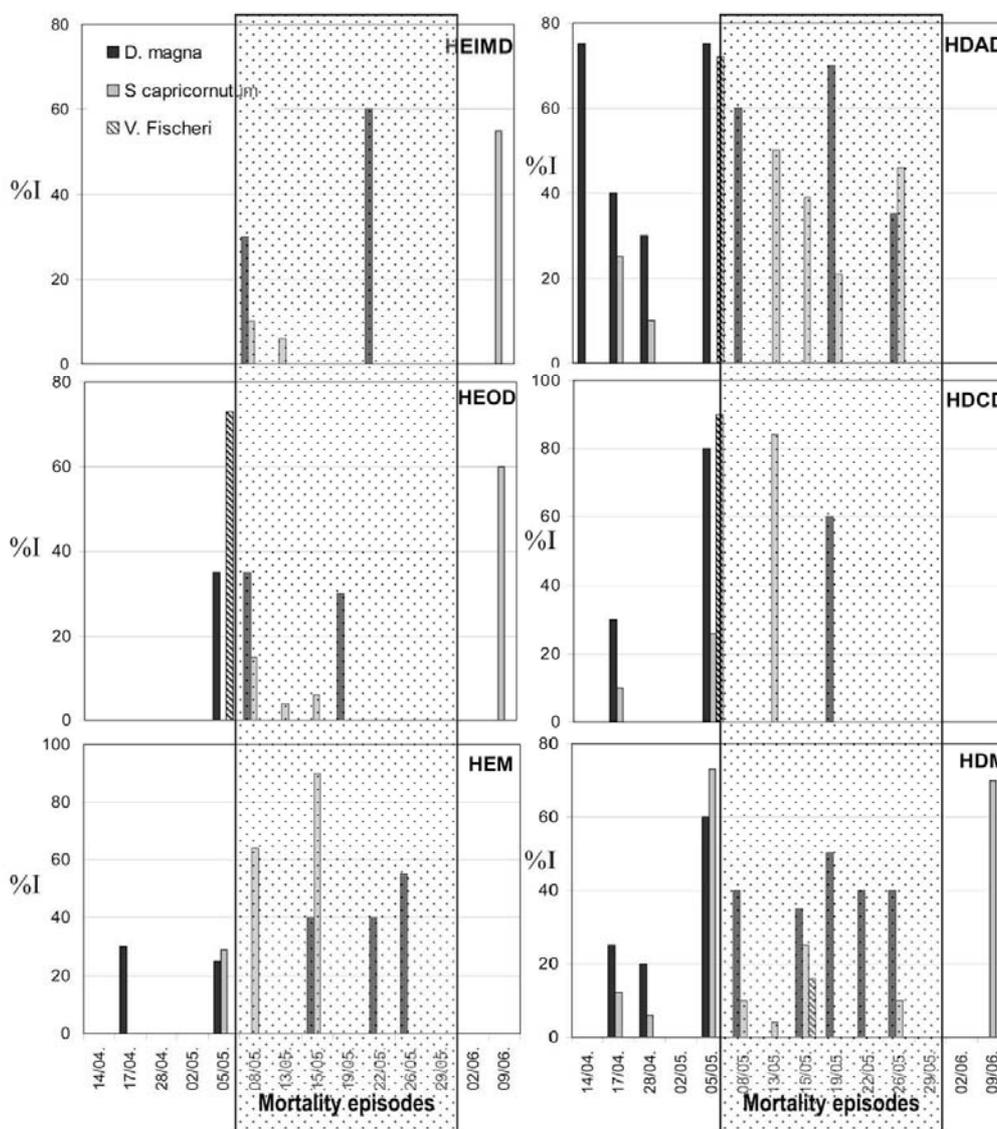


Fig. 3. Inhibition rates against the tested organisms of each water sample investigated.

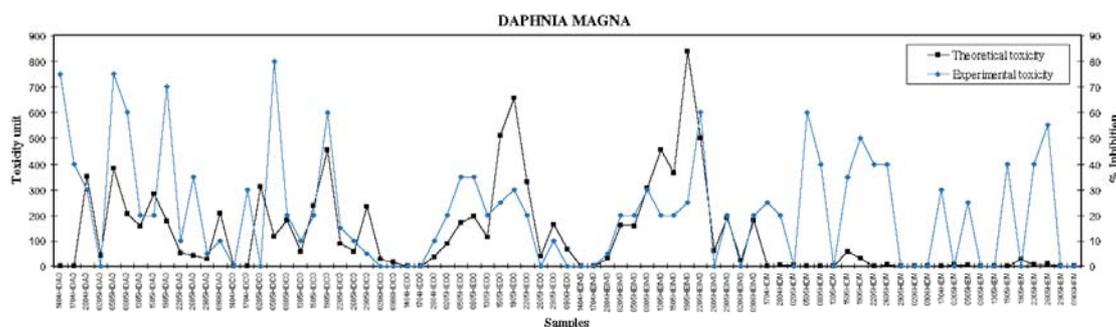


Fig. 4. Comparison between theoretical and experimental toxicity values versus *Daphnia magna* obtained for all samples.

Table 6
Levels of pesticides (mg/kg) in shellfish.

Data	Left side bay (HEM)		Right side bay (HDM)	
	Sample	Results (mg/kg)	Sample	Results (mg/kg)
17/04	Oyster	n.d.	Mussel	3.46 (Fenitrothion), 3.62 (maloxon)
07/05			Oyster ^a	n.d.
15/05	Oyster	n.d.	Mussel	n.d.
26/05	Oyster ^b	n.d.		
27/05	Oyster ^a	53.12 (Malathion)		
29/05	Oyster ^a	n.d.		
09/06	Oyster	2.53 (Maloxon)	Mussel	4.59 (Maloxon)

n.d.: not detected.

^a Mortality episodes.

^b Big mortality episode (around 60%).

on and malathion (69%, 21% and 8% toxic contribution, respectively) are the most relevant, while the alga *P. subcapitata* would exhibit more sensitivity towards some herbicides such as diuron, simazine and terbuthylazine (36%, 26% and 17% toxic contribution, respectively).

Regarding the analysis of pesticides in biota, carried out to assess potential bioaccumulation effects, only malathion, malaoxon (malathion degradation product) and fenitrothion were identified in a few mussels and oysters samples collected along the study (Table 6). Fenitrothion and malaoxon concentrations were in the low mg/kg range. However, the concentration of malathion found in oysters in the northern bay (Badia del Fangar) was higher (53 mg/kg) and it coincided with the mortality episodes observed in this bay during the same period and with high malathion levels in water. These levels, which reached 0.2 µg/L in the northern bay, and 5.8 µg/L throughout the monitoring study (considering all sites), are far below the LC50 (lethal concentration 50%) values reported for malathion in oysters (*Crassostrea virginica*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*, *Anodonta cygnea*), between 2.6 and 56 mg/L, based on which malathion is considered moderately toxic to molluscs (<http://www.pesticideinfo.org/>). However, it may be worth taking into account that these LC50 values express acute toxicity, that malathion might be bioaccumulated by molluscs (as its detection in the oyster sample suggests), and that aquatic organisms are exposed to a variety of contaminants, some of which could show synergetic or additive effects (KayLynn Newhart, 2006). A further matter of concern is that malathion is transformed in the aquatic environment to malaoxon, which is more toxic than the parent compound (Aker et al., 2008). On the other hand, it has to be noted that since June 2007 the use of malathion in plant protection products is forbidden by the European Commission (Coun-

cil of the European Communities, 2007) and that the period of grace granted for the use of existing stocks expired in December 2008.

The insecticide fenitrothion was detected also in some biota samples, although at lower concentrations than malathion. Its toxicity to molluscs varies from not acutely (*M. edulis*, LC₅₀ 123 mg/L) to very highly toxic (*Lamellidens marginalis*, LC₅₀ 10.3 µg/L) (<http://www.pesticideinfo.org/>), but again the concentrations measured in water (up to 51 ng/L in the bay where the positive mussel sample was collected, and up to 1.2 µg/L throughout the monitoring study) are considerably lower than the reported LC₅₀ values.

Finally, it may be worth mentioning that, in parallel with the present study, the water authorities recorded continuously in the same points indicated as HEM and HDM (i.e., the northern and southern bays, respectively) some physico-chemical parameters like temperature, dissolved oxygen, pH, redox potential and conductivity. These data are illustrated in the form of graphs in Fig. S1 (Supplementary information). Whereas the first four parameters showed a normal behavior in both points (thus excluding, for instance, anoxia episodes), variations on conductivity were notable (decrease up to 20%), especially in point HEM (northern bay). Such variations, attributable to inputs of fresh water from the draining channels, were coincident on time with peaks of pesticides, as well as, with the registered mortality episodes in point HEM, which constitutes a further support to the hypothesis of pesticides as the most likely cause of shellfish impairment.

Conclusions

The study performed has shown fairly consistent results between pesticides concentrations (in water and seafood), toxicity, and shellfish (oysters and mussels) mortality episodes along the monitored period. Modulation of toxicological responses might be attributed to synergistic effects, matrix effects and the possible presence of other pollutants not investigated, such as heavy metals, or different pesticides. The most representative bioassay organism tested has been *D. magna*, a micro-crustacean, probably due to its taxonomic relative proximity to the shellfish species investigated. The most remarkable mortality episodes have occurred in the left side (northern bay) of the delta, which has been identified as the most polluted area. Taking together all the information gathered in the study, the ecotoxicological effects caused by pesticide use during the rice growing season surveyed cannot be neglected and should be seriously considered as one of the main potential factors contributing to shellfish impairment. In this respect, malathion and to a lesser extent diazinon and molinate appear as the most relevant compounds.

Acknowledgements

This work has been supported by the Catalan Water Agency and by the Spanish Ministry of Science and Innovation [CGL2007-64551/HID] and reflects the author's view. Merck is acknowledged for the gift of LC columns, and Biotage and Spark Holland for the gift of SPE cartridges. Marianne Köck gratefully acknowledges the European Social Fund and AGAUR (Generalitat de Catalunya, Spain) for their economical support through a FI pre-doctoral grant.

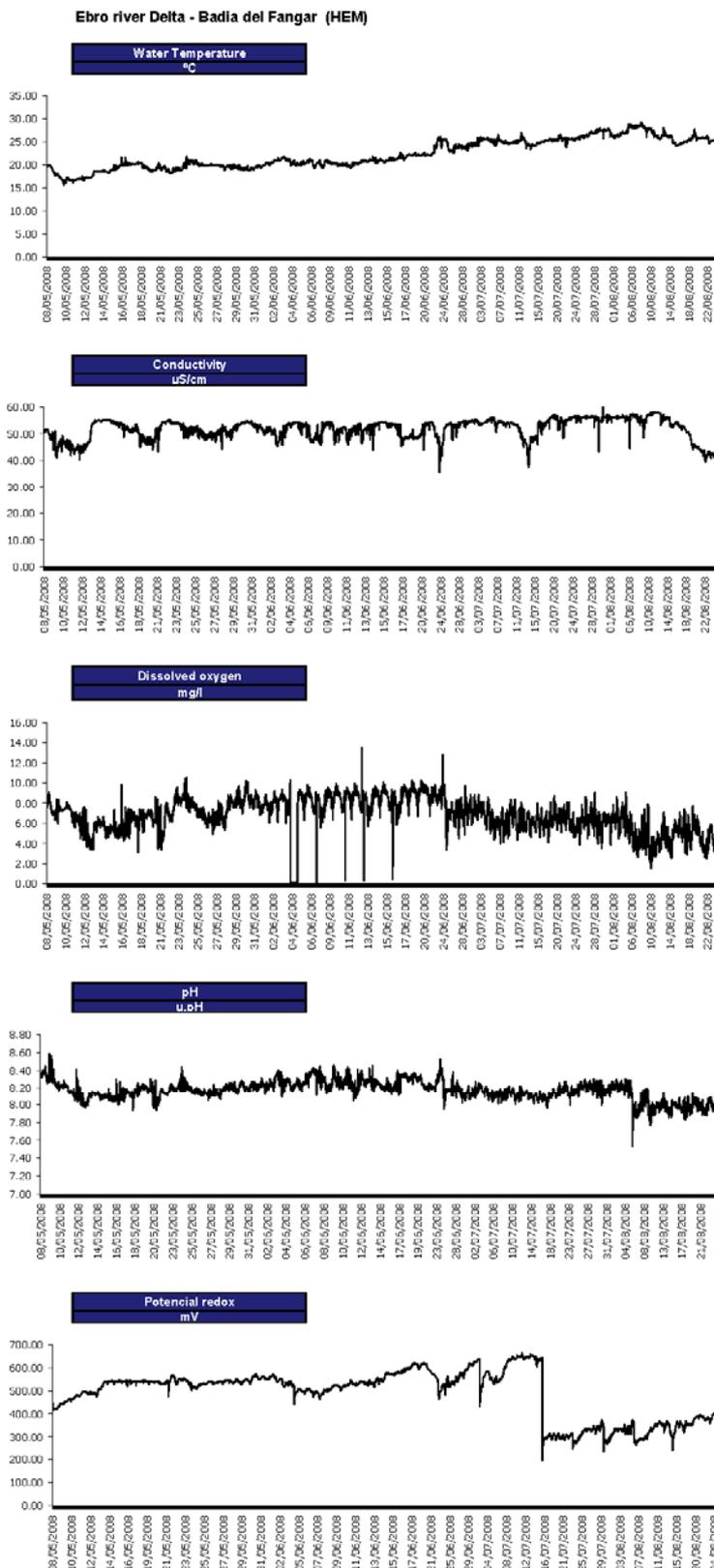
Appendix A. Supplementary material

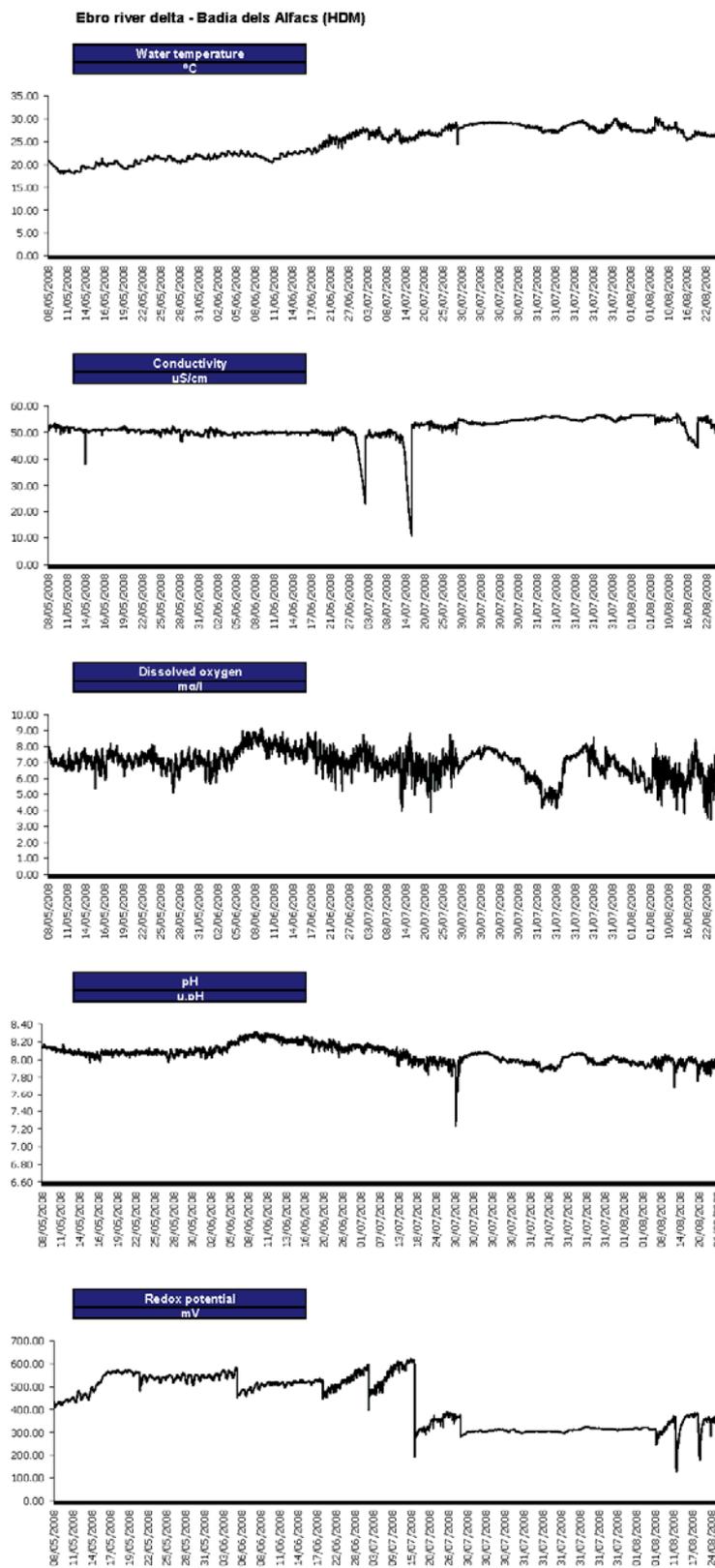
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jhydrol.2009.12.029.

References

- Aker, W.G., Hu, X.K., Wang, P., Hwang, H.M., 2008. Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus*. *Environmental Toxicology* 23 (4), 548–554.
- Barata, C., Damasio, J., López, M.A., Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D., Riva, M.C., Raldúa, D., 2007. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (2), 370–379.
- Blasco, C., Pico, Y., 2009. Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* 28 (6), 745–757.
- Camp, J., 1994. Aproximaciones a la dinámica ecológica de una bahía estuárica mediterránea. PhD thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Council of the European Communities, 2000. Directive 2000/60/EC establishing a framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of European Community* L 327, 1.
- Council of the European Communities, 2007. Decision 2007/389/EC concerning the non-inclusion of malathion in Annex I to Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of European Community* L 146, 19.
- Council of the European Communities, 2008. Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy. *Official Journal of European Community* L 348, 84.
- ISO 11348-3, 1998. Water quality – determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using freeze-dried bacteria. International Organization for Standardization.
- ISO 6341, 1996. Water quality – determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test. International Organization for Standardization.
- ISO 8692, 2004. Water quality – freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. International Organization for Standardization.
- Kampioti, A.A., da Cunha, A.C.B., de Alda, M.L., Barcelo, D., 2005. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382 (8), 1815–1825.
- KayLynn Newhart, 2006. Environmental fate of malathion. California Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation (Environmental Monitoring Branch).
- Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barata, C., Raldúa, D., Barcelo, D., 2008. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro River delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 75 (2), 390–401.
- Manosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment* 71 (2), 187–205.
- Ocampo, W.A., 2008. On the development of decision-making systems based on fuzzy models to assess water quality in rivers. PhD thesis, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.
- Ramón, M., Cano, J., Peña, B.J., Campos, M.J., 2005. Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* 21 (1–4), 361–373.
- Santos, T.C.R., Rocha, J.C., Barcelo, D., 2000. Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 879, 3–12.
- Sprague, J.B., Ramsay, B.A., 1965. Lethal effects of mixed copper and zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 22, 425–432.

SUPPORTING INFORMATION





4.2.2. Caso de estudio: tramo bajo del río Llobregat

Publicación científica #5:

“Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain)”

Por:

*Marianne Köck-Schulmeyer, Antoni Ginebreda, Susana González, Jose Luis Cortina,
Miren López de Alda, Damià Barceló*

Publicada en “Chemosphere”



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain)

Marianne Köck-Schulmeyer^{a,*}, Antoni Ginebreda^a, Susana González^b, Jose Luis Cortina^{b,c}, Miren López de Alda^a, Damià Barceló^{a,d,e}

^a Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research, IDAEA-CSIC, c/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Water Technology Centre, CETaqua, Carretera d'Esplugues 75, Cornellà de Llobregat, 08940 Barcelona, Spain

^c Department of Chemical Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

^d Catalan Institute for Water Research (ICRA), C/Emili Grahit, 101, Edifici H2O, Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, 17003 Girona, Spain

^e King Saud University, Box 2454, Riyadh 11451, Saudi Arabia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2011

Received in revised form 12 August 2011

Accepted 15 August 2011

Available online 16 September 2011

Keywords:

Pesticides

Llobregat River

Risk assessment

Mass spectrometry

Surface water

ABSTRACT

Contamination of surface waters by pesticides continues to be the focus of concern for water authorities due to the growing evidence of their deleterious effects on aquatic life. In this context, the present work investigates the occurrence of 16 selected pesticides belonging to the classes of triazines, phenylureas, organophosphates, chloroacetanilides and thiocarbamates in surface waters from the Llobregat River (NE Spain) and some of its tributaries (Anoia and Rubí) and assesses their potential impact on the aquatic organisms by applying a recently developed index, the Short-term Pesticide Risk Index for the Surface Water System (PRISW-1), which takes into account the pesticides concentrations and their overall toxicity against three aquatic organisms (algae, *Daphnia*, and fish). Chemical analysis, performed by means of a fully automated method based on isotope dilution on-line solid phase extraction–liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry (on-line SPE–LC–ESI–MS/MS), revealed diuron and diazinon as the most ubiquitous and abundant compounds with levels up to 818 and 132 ng L⁻¹, respectively. Total pesticide concentrations, which in only 1 out of 66 samples surpassed 500 ng L⁻¹, were higher in the tributaries than in the river but their contribution in terms of mass-loads to the overall pesticide pollution of the Llobregat River was relatively small. Contamination increased downstream of the river and was clearly influenced by rainfall and hence river flow. Application of the PRISW-1 index indicated that, although pesticides levels fulfilled the European Union Environmental Quality Standards (EQS) for surface waters, the existing pesticide contamination poses a low to high ecotoxicological risk for aquatic organisms, that algae and macro-invertebrates are at higher risk than fish, and that the organophosphates diazinon and malathion and the phenylurea diuron are the major contributors to the overall toxicity and therefore the most problematic compounds.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The growing concern on the potential effects of pesticides on the environment has increased in recent years, particularly in regard to water pollution. In this context, more and more researchers assess the environmental risk of these and other pollutants with the help of indices of toxicity (Fare et al., 2001, 2007; Trivasi et al., 2004; Tremolada et al., 2004; Liess and von der Ohe, 2005; Barata et al., 2007; Schafer et al., 2007; Munoz et al., 2009a; Kock et al., 2010; von der Ohe et al., 2011). In the search for effective pesticides risk management tools, many risk assessment methods have been adopted over time. Just in Europe, more than 10 indica-

tors have been created in order to assess the exposure to pesticides in the environment.

The objectives of these indicators as well as the underlying methods of calculation are diverse, but there is a general convergence towards the use of the concept of Toxicity-Exposure Ratio (TER) that corresponds to the ratio between a critical toxicological end point (i.e., EC₅₀, LC₅₀, NOEC) and a predicted environmental concentration (PEC) (Reus et al., 2002).

In order to optimize their use, the project CAPER (Concentrate Action on Pesticides Environmental Risk Indicators) gathered together European researchers to compare eight indices of environmental risk of pesticides (Leendertse and Reus, 1999; Reus et al., 2002), though other indicators not specific to pesticides have also been used over time as a tool for pesticide risk assessment. This is the case of the SERA index (Screening level Ecological Risk

* Corresponding author. Tel.: +34 93 400 6100; fax: +34 93 204 5904.

E-mail address: mkoqam@cid.csic.es (M. Köck-Schulmeyer).

Assessment), which was adopted in the risk assessment of pesticides for surface water in the US (Carriger and Rand, 2008).

In spite of the large number of existing indices (see some of them in Table S1 – Supplementary information), they continue to appear (Bockstaller et al., 2009). Among them, the index developed by the University of Milan on behalf of the Italian Environmental Agency (ANPA) (Finizio et al., 1999, 2001) differentiates itself from previous ones by taking into account ecotoxicity at three trophic levels, as prescribed by the Water Framework Directive (WFD).

The work reported hereby relies on this use of this index (PRISW-1) to interpret in terms of ecotoxicological significance pesticides monitoring data gathered from water samples from the Llobregat River. This method was chosen since it is full in line with the Directive 91/414/EEC (Council of the European Communities, 1991), and with our scenario analysis, the Llobregat River.

The present work is embodied within the project entitled “Development and Validation of Economically Optimized Integrated Platforms for Biological and Chemical Monitoring” (VIECO), whose main objective is to improve water quality by developing a cost-effective monitoring platform capable of delivering efficient environmental indicators of ecological status of surface waters. In the frame of this project, the purpose of this study was to investigate the occurrence and impact of 16 polar pesticides in the lower course of the Llobregat River.

The Llobregat River is the second longest river in Catalonia (NE of Spain) (Fig. 1) with 160.36 km. It is a typical mediterranean river subjected to large flow variations, closely related to the rainfall seasonal regime (Köck-Schulmeyer et al., 2011) and to catchments (more than 60) for irrigation, urban use or drinking water treatment plants (DWTPs), which represent about 1%, 11%, and 88%, respectively, of the total abstracted water.

However, discharges also contribute to the flow variation and contamination. In the Llobregat basin there are around 50 wastewater treatment plants (WWTPs) and 260 industries discharging

their output (89% and 8% of the total discharge, respectively) in the river, in the last case without treatment. Accordingly, during the last decades the river has been highly polluted by urban, industrial, and also mining wastewaters, and by surface runoff from agricultural areas as well. Both industrial and urban pressure increase significantly downstream due to the influence of the Barcelona metropolitan area.

The river has around 40 tributaries and the main ones are the Cardener and the Anoia Rivers. Clearly, this entire scenario compromises water quality. Moreover, the Llobregat River is one of the most important water supply sources to the metropolitan area of Barcelona; the DWTP that gives service to the southern part of the city treats more than 120000000 m³ year⁻¹ of surface water.

From the ecological point of view the Llobregat River has as added value its delta, which is one of the three most important humid areas in Catalonia. Considered of international importance by the EU, the Llobregat Delta is an area of undoubted ecological and landscape value, with nature reserves located within the migratory route between Europe and Africa of more than 300 species of birds, panoramic and faunistic observatories, and very varied habitats (long stretches of sandy coasts, coastal pine forests, permanent lagoons, coastal marshes, cultivated areas, canals, etc.) in a relatively small area (97 km²). The Delta is also one of the most fertile areas in Catalonia. It has an important agricultural activity, dominated by irrigated crops dedicated to the cultivation of artichokes, lettuce, and tomatoes, etc.

In the light of these considerations, the aims of the present study were (a) to investigate the occurrence and impact of 16 polar pesticides in the lower course of the Llobregat River using a multi-residue method based on isotope dilution on-line SPE–LC–ESI–MS/MS and (b) to perform a risk assessment study applying the Short-term Pesticide Risk Index for Surface Water System (PRISW-1) to the pesticide monitoring data gathered with the aim of quantifying the potential environmental effects attributable to the pesticides

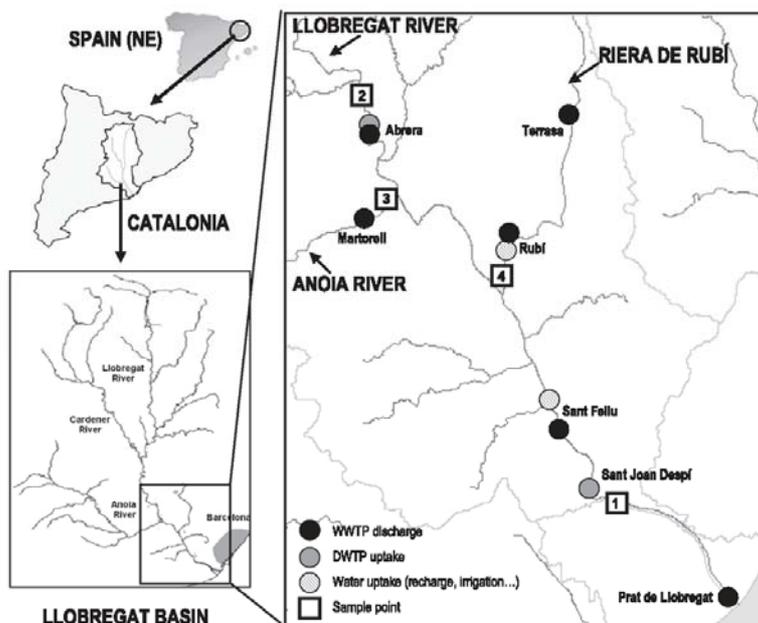


Fig. 1. Map of sampling sites at the Llobregat basin (NE Spain): (1) site SJD (Sant Joan Despi); (2) site MT (Mina Pública Aiguës Terrasa); (3) site AN (Anoia); and (4) site RUB (Rubí). WWTP: wastewater treatment plant; DWTP: drinking water treatment plant.

present in the river. The results were further interpreted on the grounds of the hydrological and weather conditions (e.g. flow and rain) occurring in the river during the time interval of study. Sampling as performed also allowed establishing spatial and temporal variations in pesticides levels. This work is one of the first to assess the environmental risk of pesticides in the Llobregat River and the first to apply the PRISW-1 index to pesticides in surface waters in Spain.

2. Methods

2.1. Site description and sampling procedure

Surface water samples (a total of 66) were collected from the Llobregat River at four different locations (Fig. 1): (1) site SJD (Sant Joan Despí), which is located in the Llobregat River, close to the mouth, at the intake of a water supply plant; (2) site MT (Mina Pública Aigües Terrasa), which is located also in the Llobregat River, some 30 km upstream, before the confluence of the Anoia tributary and, as well, at the intake of a water supply plant; (3) site AN (Anoia), a tributary, in the right side of the river, between SJD and MT; and (4) site RUB (Rubi), a tributary, in the left side of the river, also between SJD and MT. Samples were taken along three sampling campaigns: C1 (48 h-integrated samples, $n = 10$) between 23-November and 18-December 2009; C2 (48 h-integrated samples, $n = 13$) between 10-March and 12-April 2010; C3 (discrete samples, $n = 8$) between 9-June and 12-July 2010. Sites AN and RUB were sampled only in a few selected days of the third campaign. The samples were collected in triplicate in amber glass bottles and were transported to the laboratory under cooled conditions (4 °C). Upon reception, samples were filtered through 0.45 µm Nylon filters (Whatman, Maidstone, UK) to eliminate particulate matter and other suspended solid matter and then stored at -20 °C in the dark until analysis.

2.2. Analysis of pesticides in water

Target pesticides (listed in Table 1 according to their chemical class) were analyzed in water following a previously described method based on on-line SPE-IC-MS/MS (Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2008). The selection of the target compounds was based on extent of use, legal requirements of the EU, information gathered from the water authorities, and amenability to IC-MS analysis.

Briefly, water samples (100 mL) were spiked with a standard mixture of the isotopically labelled compounds at a concentration of 100 ng L⁻¹ and then 5 mL were extracted with the aid of an automated on-line solid-phase extraction (SPE) sample processor Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, The Netherlands) configured for high sample volumes and connected in series with the IC-MS/MS instrument, using PLRP-s disposable trace enrichment polymeric cartridges from Spark Holland. Chromatographic separation was performed with a Binary HPLC pump Model 1525 from Waters using a Purospher STAR RP-18e column (125 × 2 mm, 5 µm particle diameter, from Merck, Darmstadt, Germany) and gradient elution with acetonitrile and water as mobile phase. MS/MS detection was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode acquiring 2 SRM transitions per compound and 1 SRM transition per surrogate using a TQD triple-quadrupole mass spectrometer from Waters equipped with an electrospray interface. This method shows satisfactory sensitivity (with limits of determination below 11.7 ng L⁻¹ for all compounds except deisopropyl atrazine - 120.75 ng L⁻¹), precision (with relative standard deviations below 9% except for deisopropyl atrazine - 54%), and accuracy (with relative recovery percentages between 65% and 118%) in the determination of the target compounds.

2.3. Mass flow contribution

Knowing that the four sampling sites have very different flow rates, it was worth considered to calculate the mass flow of circulating pesticides. This variable gives a better idea of the contribution of pesticides to the river rather than concentrations.

In this context, as in previous studies (Köck-Schulmeyer et al., 2011), for every pesticide P and sample S the mass-flow (in appropriate mass/time units) was calculated as the product of concentration ($C_{P,S}$) per flow (Q_S):

$$\text{Mass flow (pesticide } P, \text{ sample } S) = Q_S \times C_{P,S} \quad (1)$$

Flow measurements in different points of the Llobregat basin are performed by the Catalan Water Agency (ACA). Measurements are recorded every 5 min and the data aggregated at day intervals (Agència Catalana de l'Aigua - Generalitat de Catalunya; <http://www.gencat.cat/jaca/>). The data relative to the studied period can be found in Table S2 (Supplementary information).

2.4. Risk assessment index

Toxic units for each organism and sample (TU_T) were calculated using a simple additive approach as the sum of the individual pesticide toxic units (TU_P), which correspond to the ratio between the concentration of the individual pesticide and its critical toxicological end point for the test organism (i.e., EC_{50} , LC_{50} , $NOEC$), according to the following equations:

$$TU_P = [\text{pesticide concentration/end point (} EC_{50}, LC_{50} \dots)]_P \quad (2)$$

$$\text{and } TU_T = \sum TU_P \quad (3)$$

where P is the pesticide and "end point" is relative to each aquatic organism, as presented in Table 2 for algae, *Daphnia* and fish.

A procedure for assessing the risk posed to aquatic ecosystems by pesticide mixtures has been proposed by Finizio et al. (2001). The PRISW-1 index was originally developed for individual chemicals but it has also been applied to mixtures of pesticides (Verro et al., 2009). This index is based on, first, the calculation of TERs (Toxicological Exposure Ratios) for each sample and the three non-target organisms algae, *Daphnia* and fish as the ratio between the critical toxicological "end point" (EC_{50} for algae and *Daphnia* and LC_{50} for fish) and the predicted environmental concentration (PEC), which in the present study is substituted for the real pesticides concentrations measured in the samples, and, second, the application of the following equation that assigns to each TER a score and a weight related to the type of organism:

$$\text{PRISW-1} = (A \times 3) + (B \times 4) + (C \times 5.5) \quad (4)$$

where A , B , C are the scores assigned to the TERs for algae, *Daphnia*, and fish, respectively, and 3, 4 and 5.5 are the corresponding weights. The scores (for all three organisms) are assigned as follows: 0 for TERs > 10000, 1 for TERs in the range 10000–1000, 2 for TERs in the range 1000–100, 4 for TERs in the range 100–10, 6 for TERs in the range 10–2, and 8 for TERs < 2. As it can be deduced from the explanations above the TERs are the reciprocal of the corresponding TUs (i.e. $TER = 1/TU_T$).

Finally, the environmental risks caused by the pesticides present in the samples are classified, according to the resulting PRISW-1 values, into negligible ($\text{PRISW-1} \leq 5$), low ($5 < \text{PRISW-1} \leq 15$), medium ($15 < \text{PRISW-1} \leq 40$), high ($40 < \text{PRISW-1} \leq 80$), and very high ($\text{PRISW-1} > 80$). More details on the calculation of this index and on the rationale behind it can be found in Finizio et al. (2001).

Table 1
Limit of determination (Ldet), frequency of detection (DetF), average and maximum concentration of individual pesticides in water samples. C1, C2 and C3: sampling campaigns. MT, SJD, AN and RUB: sampling sites.

Pesticides	Ldet ^a (ng L ⁻¹)	C1		C2		C3		AN		RUB		Max conc (ng L ⁻¹)								
		MT	DetF (%)	Average (ng L ⁻¹)	SJD	DetF (%)	Average (ng L ⁻¹)	MT	DetF (%)	Average (ng L ⁻¹)	SJD		DetF (%)	Average (ng L ⁻¹)						
Triazines																				
Atrazine	0.2–2.0	54	1.1 ± 0.4	82	2.7 ± 2.2	7.2 (SJD)	44	1.5 ± 0.9	44	1.5 ± 0.9	7.4 (MT)	54	1.1 ± 0.4	54	1.7 ± 2.6	67	0.9 ± 0.3	0	-	10.2 (SJD)
Simazine	0.2–2.1	96	1.4 ± 0.5	82	2.4 ± 1.2	7.2 (SJD)	39	2.2 ± 1.3	39	2.2 ± 1.3	11.7 (MT)	42	1.7 ± 1.2	54	13.3 ± 14.6	83	1.7 ± 0.3	67	3.6 ± 2.1 (SJD)	
Cyanazine	4.0–15.1	0	-	4	<Ldet	<Ldet (SJD)	0	-	0	-	4.9 (MT)	0	-	8	8.6 ± 0.0	0	-	0	-	8.6 (SJD)
Desethylatrazine	0.7–8.3	0	-	7	<Ldet	<Ldet (SJD)	0	-	0	-	5.8 (MT)	4	1.6 ± 0.0	17	5.0 ± 4.6	0	-	0	-	8.2 (SJD)
Deisopropyl atrazine	11.4–346.7	4	<Ldet	0	-	<Ldet (MT)	0	-	0	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Terbutylazine	0.1–1.7	32	32.9 ± 9.8	32	51.0 ± 20.8	81.5 (SJD)	100	13.2 ± 16.2	100	17.0 ± 17.7	72.9 (SJD)	100	4.2 ± 1.3	100	5.9 ± 2.9	100	8.2 ± 4.9	100	8.5 ± 4.3	17.4 (SJD)
Phenylurens																				
Duron	0.2–4.2	100	4.7 ± 1.3	100	20.3 ± 8.6	41.4 (SJD)	74	4.9 ± 1.5	74	10.7 ± 4.0	17.4 (SJD)	50	2.4 ± 1.6	71	5.8 ± 3.3	100	23.3 ± 14.3	100	460.6 ± 370.3 (RUB)	818.0 (RUB)
Isoproturon	0.6–5.3	21	3.6 ± 3.1	11	2.8 ± 1.0	9.9 (MT)	15	15.7 ± 20.6	85	13.7 ± 16.8	81.6 (MT)	50	1.9 ± 0.5	42	3.0 ± 3.4	17	2.9 ± 0.0	17	1.7 ± 0.0	10.5 (SJD)
Linuron	7.2–64.4	0	-	0	-	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
Chlorthaluron	1.2–8.7	4	<Ldet	39	4.5 ± 2.0	8.1 (SJD)	67	5.6 ± 2.1	56	5.4 ± 1.1	10.3 (MT)	33	<Ldet	25	9.1 ± 0.0	33	<Ldet	0	-	9.1 (SJD)
Organophosphates																				
Malathion	0.8–11.3	0	-	14	2.6 ± 0.4	2.9 (SJD)	3	6.5 ± 0.0	0	-	6.5 (MT)	4	<Ldet	4	11.8 ± 0.0	50	16.7 ± 1.9	0	-	18.9 (AN)
Diazinon	0.1–2.0	86	2.4 ± 0.8	96	8.7 ± 7.3	26.1 (SJD)	95	4.1 ± 4.0	100	31.8 ± 35.8	132.3 (SJD)	100	2.3 ± 1.5	100	7.7 ± 5.0	100	52.0 ± 46.6	100	38.6 ± 19.2	95.3 (AN)
Dimethoate	3.4–36.5	0	-	29	19.2 ± 15.5	42.7 (SJD)	5	<Ldet	10	5.7 ± 0.0	4.9 (SJD)	4	<Ldet	17	9.4 ± 0.0	83	26.8 ± 18.8	67	115.6 ± 80.0 (RUB)	189.9 (RUB)
Chloroacetanilides																				
Alachlor	2.0–30.2	0	-	0	-	-	3	4.3 ± 0.0	0	-	4.3 (MT)	4	<Ldet	4	11.1 ± 0.0	0	-	0	-	11.1 (SJD)
Metolachlor	1.3–5.5	18	2.5 ± 0.4	4	2.8 ± 0	3.0 (MT)	8	5.9 ± 1.0	10	<Ldet	6.6 (MT)	4	4.8 ± 0.0	21	8.1 ± 7.1	0	-	17	6.1 ± 0.0	13.1 (SJD)
Thiocarbamate																				
Molinate	3.8–61.9	0	-	0	-	-	0	-	0	-	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-

^a Limit of determination: minimum concentration that can be quantified (SRM1 signal > limit of quantification) and confirmed (SRM2 signal > limit of detection). Ldet: were calculated for each sampling point.

Table 2
Concentrations of the target pesticides reported in the Llobregat River in previous studies and their $\text{Log}K_{ow}$ and $\text{EC}_{50}/\text{LC}_{50}$ for algae, *Daphnia* and fish.

Pesticide	Concentration (ng L^{-1})						$\text{Log}K_{ow}^{(1)}$	Algae $\text{EC}_{50}^{(4)}$ (mg L^{-1})	<i>Daphnia</i> $\text{EC}_{50}^{(h)}$ (mg L^{-1})	Fish $\text{LC}_{50}^{(i)}$ (mg L^{-1})
	2000 ^(a)	2002 ^(b)	2003 ^(c)	2005 2006 ^(d)	2008 ^(e)	2009 2010 ^(f)				
Triazines										
Atrazine	25–29	5–463	7.8	0.05–1.1	1.0–1.2	n.d.–10.2	2.7	0.059 ⁽²⁾	6.9 ⁽³⁾	4.5 ⁽²⁾
Simazine	25–84	8–2218	9.9	0.1–53.6	1.5–2.2	n.d.–38.4	2.3	0.04 ⁽²⁾	1.1 ⁽²⁾	99 ⁽²⁾
Cyanazine	n.m.	n.m.	0.4	n.d.	n.d.	n.d.–8.6	2.1	0.2 ⁽⁴⁾	49 ⁽⁵⁾	10 ⁽⁶⁾
Desethyl atrazine	n.d.	n.d.–4	0.6	27.1–27.1	n.d.	n.d.–8.2	1.51	0.1 ⁽⁴⁾	Unknown	Unknown
Deisopropylatrazine	25–62	n.m.	1.2	0.1–14.4	n.d.	<Ldet	1.15	Unknown	Unknown	Unknown
Terbutylazine	n.d.	n.m.	12	0.1–21.9	18.6–44.6	n.d.–81.5	3.4	0.012 ⁽⁷⁾	21.2 ⁽⁵⁾	2.2 ⁽⁷⁾
Phenylureas										
Diuron	n.m.	64–239	9.5	0.4–99.7	10.5–36.0	n.d.–818.0	2.87	0.0027 ⁽⁴⁾	12 ⁽³⁾	4.3 ⁽⁵⁾
Isoproturon	n.m.	5–503	0.5	0.5–7.8	n.d.–0.5	n.d.–81.6	2.5	0.013 ⁽⁷⁾	507 ⁽³⁾	37 ⁽³⁾
Linuron	n.m.	n.m.	n.d.	0.2–327.0	n.d.	n.d.	3	0.016 ⁽⁷⁾	0.12 ⁽³⁾	3.15 ⁽³⁾
Chlortoluron	n.m.	n.m.	n.d.	0.5–3.1	n.d.–0.4	n.d.–10.3	2.5	0.024 ⁽⁷⁾	67 ⁽⁷⁾	20 ⁽⁷⁾
Organophosphates										
Malathion	n.m.	n.m.	n.m.	n.d.	n.d.	n.d.–18.9	2.75	13 ⁽²⁾	0.0007 ⁽⁷⁾	0.1 ⁽³⁾
Diazinon	n.m.	n.m.	8.4	0.8–785.0	17–34	n.d.–132.3	3.69	6.4 ⁽⁷⁾	0.001 ⁽⁷⁾	3.1 ⁽⁷⁾
Dimethoate	60–154	n.m.	42	0.6–87.8	n.d.	n.d.–189.9	0.704	90.4 ⁽²⁾	2 ⁽²⁾	30.2 ⁽²⁾
Chloroacetanilides										
Alachlor	n.m.	n.m.	n.d.	2.2–17.1	n.d.	n.d.–11.1	3.09	0.966 ⁽⁴⁾	10 ⁽⁴⁾	1.8 ⁽²⁾
Metolachlor	n.d.	n.m.	1.5	7.4	n.d.	n.d.–13.1	3.4	57.1 ⁽⁴⁾	23.5 ⁽⁸⁾	3.9 ⁽⁸⁾
Thiocarbamate										
Molinate	n.m.	n.m.	n.d.	1.0–3.8	n.d.	n.d.	2.86	0.5 ⁽⁷⁾	14.9 ⁽⁷⁾	16 ⁽⁷⁾

(a) Quintana et al. (2001); (b) Rodriguez-Mozaz et al. (2004); (c) Kampioti et al. (2005); (d) Ricart et al. (2010); (e) Köck-Schulmeyer et al. (2011); (f) this study; (g) 72 h; (h) 48 h; (i) 96 h; n.d.: not detected; n.m.: not measured; <Ldet: below limit of determination.

(1) Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2011. The PPDB, Pesticide Properties Database. University of Herfordshire, UK (see <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>).

(2) UK PSD ACP Evaluation Documents/and other DEFRA (UK) documents (see <http://www.pesticides.gov.uk/publications.asp?id=202>).

(3) Book: The pesticide Manual. Editor: Clive Tomlin, Editorial: Crop protection publications, 10th edition.

(4) U.S. EPA ECOTOX Database (see <http://cfpub.epa.gov/ecotox/>); US EPA Pesticide Fate Database (see <http://cfpub.epa.gov/pfate/home.cfm>); Miscellaneous WHO documents.

(5) Pesticide Action Network Database (see <http://www.pesticideinfo.org/>).

(6) US Department of Interior, Fish and Wildlife Service. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resource Publication No. 137. Washington, DC: US Government Printing Office, 1980, p. 23.

(7) EU Regulatory & Evaluation Data as published by EC and EFSA (DAR & Conclusion dossiers)/EU Annex III PIC DGD/EU MRL Database (see http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm).

(8) Extension Toxicology network Database EXTOTOXNET (see <http://extotoxnet.orst.edu/ghindex.html>).

3. Results and discussion

3.1. Individual pesticides levels

Table 1 shows the frequency of detection and the average and maximum concentrations of the individual pesticides in the water samples analysed in each site and campaign, and the method limit of determination (Ldet) for each compound. As it can be seen, the most ubiquitous pesticides were diuron, diazinon and terbutylazine. Linuron and molinate were not detected, while deisopropyl atrazine was detected but below the limit of determination. The maximum individual concentrations were observed for diuron (818 ng L^{-1} in RUB), dimethoate (169 ng L^{-1} in RUB) and diazinon (132 ng L^{-1} in SJD). With respect to the Maximum Allowable Concentrations (MAC) stipulated by the Directive 2008/105/EC for 5 of the 16 pesticides in inland and other surface waters (Council of the European Communities, 2008), any pesticide exceeded these limits (700 ng L^{-1} for alachlor; 2000 ng L^{-1} for atrazine; 1800 ng L^{-1} for diuron; 1000 ng L^{-1} for isoproturon; 4000 ng L^{-1} for simazine). In fact, the more restrictive limit of 100 ng L^{-1} imposed by the Directive 98/83/EC for individual pesticides in water intended for human consumption (Council of the European Communities, 1998) was only surpassed by the above mentioned pesticides diuron, dimethoate and diazinon, each in only one sample, whereas the limit of 500 ng L^{-1} set for total pesticides was only exceeded in one sample from Rubí. Nevertheless, it is important to emphasize that although the pesticides concentrations measured were relatively low (according to directives), this study analyzed just 16 of

them. A wide variety of other compounds, including other pesticides and pesticides transformation products, may contribute to the bad quality of the water in this zone, compromising the water supply.

Previous studies carried out in the Llobregat River have also shown the presence of some of these pesticides (see summary on Table 2). During the last 10 years, the highest concentrations were detected in samples from 2002, with values up to 2200 ng L^{-1} for simazine. However, direct comparison among them is not straightforward since sampling points, season of the year and hydrological conditions may be largely different. Thus, concentrations of some pesticides spread ca. one–two orders of magnitude during the last 10 years. For instance, dimethoate levels spread from 42 ng L^{-1} (2003) to 189.9 ng L^{-1} (2010) and diuron levels from 9.5 ng L^{-1} to 818 ng L^{-1} in the same years. Nevertheless, in general, simazine, diuron, diazinon, and dimethoate stand out for being the pesticides showing the largest contribution to the total pesticide concentration.

3.2. Total pesticides levels and mass flow

Fig. 2a shows the total pesticide concentration measured in each of the samples analysed. Considering the geographical location of the sampling points, the season, and the respective flows, the results are in general terms consistent. In the Llobregat River, between MT and SJD, there are significant contaminant contributions coming mainly from industrial and municipal WWTPs, from tributaries (e.g., Anoia) and from surface runoff from agricultural

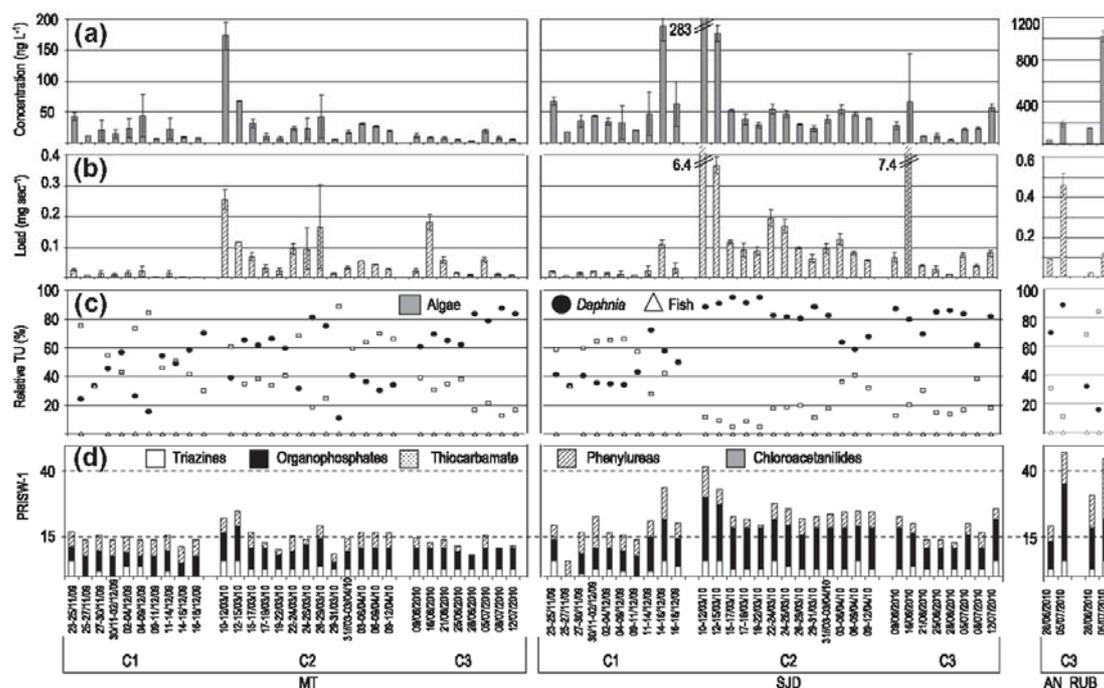


Fig. 2. (a) Total pesticide concentration; (b) pesticide mass load; (c) relative toxicity of the samples against the three aquatic organisms tested; and (d) PRISW-1 index for each of the samples analysed. C1 to C3: sampling campaigns. MT, SJD, AN and RUB: sampling sites.

areas. All that pollution is evident when looking at the total pesticide concentrations measured in the Llobregat River, which are clearly higher at SJD than at MT. Looking at Fig. 2a it is worth noting also that the two tributaries, and specially RUB, show total pesticides concentrations higher than those found in the main river in the same sampling days (28/06/2010 and 05/07/2010). Conversely, if one considers mass-loads instead of concentrations (see Fig. 2b) it is clearly evident that the contribution of these tributaries to the overall pesticide pollution of the Llobregat River is relatively small, due to their relatively low circulating flow (<2 m³ s⁻¹).

But not only is the input of pollutants responsible for the increasing levels of pesticides downstream the river. Existing water abstractions for supply, irrigation, etc., decrease the natural river flow causing less dilution of pollutants, thereby increasing their concentration in the lower part of the river. Moreover, it is worth mentioning that one of the tributaries (Riera de Rubí) as well as one WWTP (Sant Feliu) potentially affecting the Llobregat main-stream quality status are derived through a lateral channel in order to preserve the water quality in SJD where it is located an important abstraction point for drinking water production.

Further evidence is the consistency between the seasons. C1 took place in a cold and dry season (mean daily river flow 5.3 and 4.1 m³ s⁻¹ in MT and SJD, respectively), when agricultural activities are not relevant, thus justifying low levels of pesticides in the river. In contrast, high river flows (which are strongly associated to rainfall) cause two opposite effects on the concentration of pesticides: whereas rain promotes runoff and sediment remotion thus increasing the concentrations of pollutants, a higher flow tends to compensate it somewhat, by increasing the dilution factor. C2 was performed at the beginning of the raining season (mean daily river flow 25.0 and 25.9 m³ s⁻¹ in MT and SJD, respectively) causing a big input of pesticides into the river mainly by runoff.

C3 took place at the beginning of the agricultural season, causing an important contribution of pesticides in the river. However the heavy rains (mean daily river flow 52.7 and 35.1 m³ s⁻¹ in MT and SJD, respectively) in this campaign also cause a greater water dilution, making levels remain similar to those found in the C2.

3.3. Risk assessment index

To assess the real effect of pesticides on aquatic life, both exposure (i.e., concentrations) and harmful effects on aquatic organisms must be jointly considered. Some pesticides may be present at low concentrations, but because of their high toxicity they can be more relevant than more concentrated ones.

On the other hand, the octanol–water partition coefficient K_{ow} (usually expressed as $\log K_{ow}$) is often used in environmental fate studies as an indicator of the potential bioaccumulation of a substance. In this way, pesticides can be classified according to their $\log K_{ow}$ as compounds having low (<2.7), moderate (2.7–3.0) and high (>3.0) bioaccumulation potential (Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2011). As it can be seen in Table 2, 9 pesticides out of the 16 analyzed have moderate to high potential for bioaccumulation. Two of these nine pesticides, namely, diuron and diazinon, were found at relatively high concentrations (up to 818 and 132 ng L⁻¹, respectively) and hence may deserve special attention when assessing their potential harmful effects on aquatic organisms.

As indicated in Section 2, TUs for each sample and organism (algae, *Daphnia* and fish) were calculated from the concentrations of the pesticides measured in the samples and their toxicity (EC50 or LC 50) towards the corresponding organisms. Their relative contribution to the overall sample toxicity (sum of the TUs calculated for the three organisms) is shown in Fig. 2c. As it can be seen in this

figure, in all samples analysed the expected toxicity in fish is negligible as compared to that calculated for algae and *Daphnia*. This figure also shows quite distinct patterns with regards to the relative toxicity of the samples against algae and *Daphnia* between sites, and some differences also in time. Thus, the MT samples, which are characterized by comparatively lower total pesticides concentrations and variable pesticides profiles along the study, do not show a clear trend, meaning that both algae and crustacean can eventually be affected by the pesticides found to be present at this site. Meanwhile, the SJD samples show a clearly different pattern characterized by a drastic change between the first and the second sampling campaigns that is consistent with the relevant presence of the herbicides terbutylazine and diuron (the most toxic compounds for algae according to the EC50 values shown in Table 2) in the first campaign, and with the relevant presence of the organophosphate insecticides diazinon and malathion (the two most toxic compounds for macro-invertebrates such as *Daphnia*) in the second and third sampling campaigns, respectively. In addition, these two pesticides would have, according to the $\log K_{ow}$ values shown in Table 2, high bioaccumulation potential. Finally, in the tributaries the results indicate that algae would be the organism most affected in RUB (due mainly to the predominant presence of the herbicide diuron) whereas in AN the most sensitive organisms would be the micro-invertebrates (due to the predominant presence of organophosphates such as diazinon and dimethoate).

Fig. 3 summarizes in the form of boxplots the absolute TUs calculated for each sample and organism, discriminating between main river samples and tributary samples. According to this figure, the most vulnerable organisms in the river would be aquatic invertebrates, with TUs up to 0.130 for *Daphnia*, whereas in the tributaries the most sensitive organisms would be algae, with TUs between 0.0001 and 0.304, levels that are ca. three times more toxic than those of the main river.

Finally, the Short-term Pesticide Risk Index for the Surface Water System (PRISW-1) for each sample considering the pesticides toxicity against three representative nontarget aquatic organisms was calculated using Eq. (4) (see Section 2). The results are shown in Fig. 2d. Sensitivity of the generated PRISW-1 index was checked by altering the concentrations of pesticides according to their corresponding RSD (relative standard deviation, from $\pm 0.96\%$ to $\pm 8.61\%$ depending on the pesticide), without any noticeable changes in the indices calculated. This test was performed on three samples considered representative of low, medium and high pesticide risk (with PRISW-1 values of 8.7, 34, and 48, respectively).

As it can be seen in Fig. 2d, no single sample fell into the negligible risk category. Low pesticide risk, which would mean a potential moderate alteration of the aquatic biotic communities (Travisi et al., 2004), was found in 58% and 16% of the MT and SJD samples, respectively. Medium risk, observed in 42% and 81% of the MT and SJD samples, respectively, might signify alterations of the aquatic biotic communities, with a local dying out of the most sensitive species of fishes and invertebrates. In turn, high pesticide risk, as found in the tributaries (50% of the samples) and in one sample at the beginning of the second campaign in SJD, means a potential alteration of the aquatic biotic communities, with reduction in sensitive species of fishes and invertebrates, as well as a potential reduction in the community productivity (Travisi et al., 2004). Fig. 4 illustrates for these three samples showing high pesticide risk the individual contribution of the various detected pesticides to the overall PRISW-1 index. As it is shown in this figure, the organophosphate diazinon in all three samples, plus the also organophosphate malathion in the Anoia sample and the phenylurea diuron in the Rubí sample are the major contributors to the overall toxicity and therefore the most problematic compounds. By

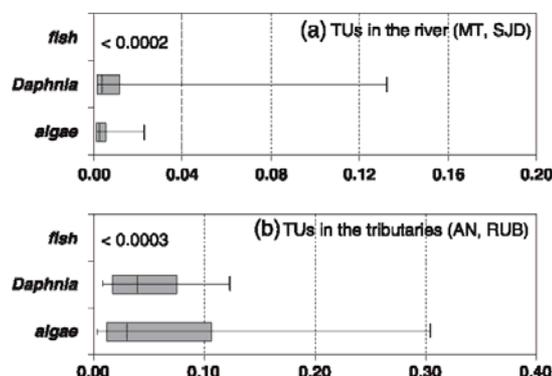


Fig. 3. Boxplot of the TUs calculated for each organism in the samples from the main river and from its tributaries.

chemical class, organophosphates followed by phenylureas and triazines are the most relevant pesticides families.

Although pesticides levels found in the Llobregat basin fulfill the Environmental Quality Standards (Council of the European Communities, 2000, 2008), the risk assessment indicates that the control of pesticides in the Llobregat River should not be neglected, as far as there is a low to high ecotoxicological risk for aquatic organisms in the river and in two of its tributaries.

Various works combining chemical analysis of pesticides (sometimes together with other organic pollutants) and toxicity or ecotoxicity studies have also identified pesticides as the contaminants likely responsible for the ecotoxicity effects observed, and often in situations where the EQS were not exceeded either. For example, a study conducted in the Llobregat River by Ricart et al. (2010) revealed a potential relationship between triazine-type herbicides and the distribution of the diatom community, as well as certain effects of organophosphates and phenylureas in both structural and functional aspects of the biofilm community, although no evidence of disruption in the invertebrate community distribution was observed. In this study where 22 pesticides were analyzed in 7 sampling sites along four sampling campaigns performed in 2005 and 2006, none of the priority pesticides investigated surpassed the EQS.

In another study conducted in the delta of the Ebro River (Kock et al., 2010), the fairly consistent results obtained between pesticides concentrations (in water and seafood), water toxicity, and shellfish (oysters and mussels) mortality episodes in surface water pointed out pesticides, and especially malathion and diazinon, as main potential factors contributing to the observed shellfish impairment, even though, in what compliance with the EQS is concerned, only alachlor surpassed its maximum allowable concentration (700 ng L^{-1}) and in only two out of 104 water samples.

Another example is the work carried out by Schafer et al. (2011) in 24 southeast Australian stream sites over 5 months where the negative linear relationships exhibited by the pesticide-selective SPEAR_{pesticides} and the general SIGNAL index for macro-invertebrates with pesticide contamination ($r^2 = 0.67$ and 0.36 , respectively) also suggested macro-invertebrate community change due to exposure to current-use insecticides and fungicides.

Interestingly, the above mentioned most problematic pesticides are in the highest positions in the risk assessment ranking list drawn up by von der Ohe et al. (2011) for the prioritization of 500 classical and emerging organic contaminants as potential river basin specific pollutants under the European WFD. The approach applied for this prioritization first classifies chemicals into six

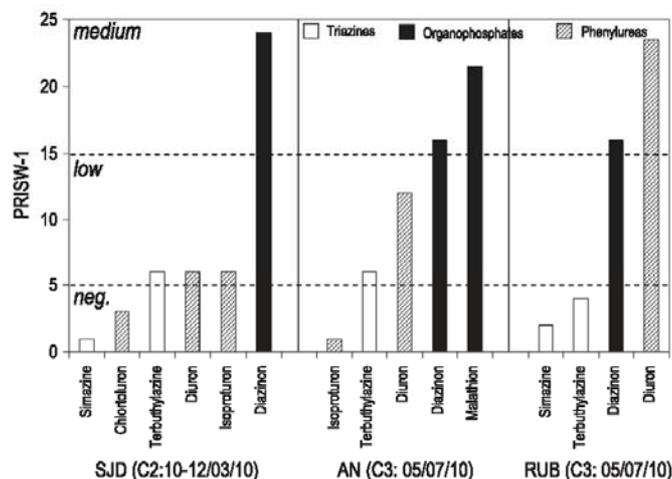


Fig. 4. Individual contribution of the pesticides detected in the three samples showing high risk to the overall PRISW-1 index value.

categories depending on the information available, which allows water managers to decide on future actions (e.g. derivation of EQS, improvement of analytical methods, monitoring, etc.), and then the priority within each category is evaluated based on two indicators, the *Frequency of Exceedance* and the *Extent of Exceedance* of Predicted No-Effect Concentrations (PNECs). Diazinon is in the very first place of the list, within category one, reserved to compounds with sufficient toxicity data for the derivation of EQS and whose observed exposure levels indicate potential hazard (action in this case is derivation of EQS and inclusion in monitoring programs). Within the same category list, terbutylazine and diuron occupy the third and seventh positions, respectively. Meanwhile, malathion falls within the second category (in the 9th position), corresponding to compounds with comprehensive hazard assessment and few observations in the environment, for which screening studies to collect more information about their risk are required.

4. Conclusions

Using the low Llobregat basin as illustrative case study, it has been shown in the present work how pesticide monitoring data (typically quantified as concentrations) can be interpreted beyond the mere comparison to some regulated Environmental Quality Standards. Thus, for instance, the joint consideration of concentrations and hydrological conditions (expressed as flows) are conveniently handled in terms of mass-loads (concentration \times flow). Similarly, the potential effects caused by pesticide concentrations on aquatic communities can be assessed through their transformation into TU's (Toxic Units) defined with the help of existing ecotoxicity data (i.e., EC50, LC50, NOEC and alike) as concentration/toxicity, and eventually integrating them on appropriate risk indexes (such as the PRISW-1). Both approximations provide alternative and complementary pictures to that provided by the simple use of concentrations, which can be very valuable from the management point of view.

The application of the PRISW-1 index in the present study and of other toxicity indices has shown for pesticides (Köck et al., 2010; Ricart et al., 2010), but also for other contaminants such as endocrine disrupting compounds (Brix et al., 2010) and pharmaceuticals (Ginebreda et al., 2010), that compliance with the EQS does not necessarily mean absence of risk. Nevertheless, these indices still need

validation. To this end, field studies integrating the chemical analysis of pollutants in water and the simultaneous study of different aquatic communities (biofilm, macro-invertebrates, fish), as performed, for instance, within the EU project MODELKEY (GOCE 511237) (Munoz et al., 2009b; Brix et al., 2010; Ricart et al., 2010), and undergoing within the Spanish project SCARCE (Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065), may be useful.

Acknowledgements

The work described was supported by the Spanish Ministry of Environment and Rural and Marine Media through the Project VIE-CO (009/RN08/01.1) and the Spanish Ministry of Science and Innovation through the projects SCARCE (Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065) and CEMAGUA (CGL2007-64551/HID). Merck is acknowledged for the gift of LC columns. Marianne Köck acknowledges the European Social Fund and AGAUR (Generalitat de Catalunya, Spain) for their economical support through the FI pre-doctoral grant. Thanks are given also to Victoria Osorio for the collection of samples and to the Catalan Water Agency (ACA) for the provision of discharge data.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.034.

References

- Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2011. The PPDB, Pesticide Properties Database. University of Herfordshire, UK. <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>>.
- Barata, C., Damasio, J., Lopez, M.A., Kuster, M., de Alda, M.L., Barcelo, D., Riva, M.C., Raldua, D., 2007. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 370–379.
- Bockstaller, C., Guichard, L., Keichinger, O., Girardin, P., Galan, M.-B., Gaillard, G., 2009. Comparison of methods to assess the sustainability of agricultural systems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 223–235.
- Brix, R., Postigo, C., Gonzalez, S., Villagrana, M., Navarro, A., Kuster, M., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., 2010. Analysis and occurrence of alkyphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1301–1309.

- Carriger, J.F., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: II. Probabilistic analyses. *Ecotoxicology* 17, 680–696.
- Council of the European Communities, 1991. Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. *Off. J. Eur. Commun. L* 230, 0001.
- Council of the European Communities, 1998. Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Commun. L* 330, 32.
- Council of the European Communities, 2000. Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Commun. L* 327, 1.
- Council of the European Communities, 2008. Decision 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy. *Off. J. Eur. Commun. L* 348, 84.
- Farre, M., Garcia, M.J., Tirapu, L., Ginebreda, A., Barcelo, D., 2001. Wastewater toxicity screening of non-ionic surfactants by Toxalert (R) and Microtox (R) bioluminescence inhibition assays. *Anal. Chim. Acta* 427, 181–189.
- Farre, M., Martinez, E., Barcelo, D., 2007. Validation of interlaboratory studies on toxicity in water samples. *TrAC-Trends Anal. Chem.* 26, 283–292.
- Finizio, A., Calliera, M., Villa, S., Vighi, M., 1999. Predictive approach to ecotoxicological properties for use in a rating system in the hazard assessment of pesticides. In: Attilio A. Del Re et al., (Eds.), *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics: Proceedings of the XI Symposium Pesticide Chemistry*. La Goliardica Pavese, Pavia, pp. 533–541.
- Finizio, A., Calliera, M., Vighi, M., 2001. Rating systems for pesticide risk classification on different ecosystems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 262–274.
- Ginebreda, A., Munoz, I., Lopez de Alda, M., Brix, R., Lopez-Doval, J., Barcelo, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ. Int.* 36, 153–162.
- Kampioti, A.A., da Cunha, A.C.B., de Alda, M.L., Barcelo, D., 2005. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1815–1825.
- Kock, M., Farre, M., Martinez, E., Gajda-Schranz, K., Ginebreda, A., Navarro, A., de Alda, M.L., Barcelo, D., 2010. Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *J. Hydrol.* 383, 73–82.
- Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., López-Serna, R., Pérez, S., Brix, R., Llorca, M., Alda, M.L., Petrovic, M., Munné, A., Tirapu, L., Barcelo, D., 2011. Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: the impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain). *Chemosphere* 82, 670–678.
- Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barata, C., Raldúa, D., Barcelo, D., 2008. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 75, 390–401.
- Leendertse, P.C., Reus, J., 1999. Evaluation of pesticide risk indicators in Europe: results of the CAPER project. In: Del Re, Attilio A. et al. (Eds.), *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics: Proceedings of the XI Symposium Pesticide Chemistry*. La Goliardica Pavese, Pavia, pp. 809–821.
- Liess, M., von der Ohe, P.C., 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 954–965.
- Munoz, I., Gomez-Ramos, M.J., Aguera, A., Garcia-Reyes, J.F., Molina-Diaz, A., Fernandez-Alba, A.R., 2009a. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *Trac-Trends Anal. Chem.* 28, 676–694.
- Munoz, I., Lopez-Doval, J.C., Ricart, M., Villagrasa, M., Brix, R., Geislinger, A., Ginebreda, A., Guasch, H., Lopez, Jose, de Alda, M., Romani, A.M., Sabater, S., Barcelo, D., 2009b. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat River basin (Northeast Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2706–2714.
- Quintana, J., Marti, I., Ventura, F., 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *J. Chromatogr. A* 938, 3–13.
- Reus, J., Leendertse, P., Bockstaller, C., Fomsgaard, I., Gutsche, V., Lewis, K., Nilsson, C., Pussemier, L., Trevisan, M., van der Werf, H., Alfarroba, F., Blumel, S., Isart, J., McGrath, D., Seppala, T., 2002. Comparison and evaluation of eight pesticide environmental risk indicators developed in Europe and recommendations for future use. *Agric. Ecosyst. Environ.* 90, 177–187.
- Ricart, M., Guasch, H., Barcelo, D., Brix, R., Conceicao, M.H., Geislinger, A., de Alda, M.J.L., Lopez-Doval, J.C., Munoz, I., Postigo, C., Romani, A.M., Villagrasa, M., Sabater, S., 2010. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: pesticide effects on biological communities. *J. Hydrol.* 383, 52–61.
- Rodriguez-Mozas, S., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045, 85–92.
- Schafer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Sci. Total Environ.* 382, 272–285.
- Schafer, R.B., Pettigrove, V., Rose, G., Allinson, G., Wightwick, A., von der Ohe, P.C., Shimeta, J., Kuhne, R., Kefford, B., 2011. Effects of pesticides monitored with three sampling methods in 24 sites on macroinvertebrates and microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1665–1672.
- Travis, C.M., Nijkamp, P., Vighi, M., Giacomelli, P., 2004. Managing Pesticide Risks for Non-target Ecosystems with Pesticide Risk Indicators: a Multicriteria Approach. Tinbergen Institute, Amsterdam, TI 2004-009/3.
- Tremolada, P., Finizio, A., Villa, S., Gaggi, C., Vighi, M., 2004. Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment. *Aquat. Toxicol.* 67, 87–103.
- Verro, R., Finizio, A., Otto, S., Vighi, M., 2009. Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of complex mixtures in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* 43, 530–537.
- Von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R.-U., Ginebreda, A., De Cooman, W., Schüürmann, G., Brack, W., 2011. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Sci. Total Environ.* 409, 2064–2077.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Risk indicators applied to pesticides.

Risk Indicator	Acronym (country)	References
Pesticide Risk Index for Surface Water systems	PRISW (Italy)	1,2
Yardstick for Pesticides	EYP (Netherlands)	3,4,5
Hasse Diagram rank pesticides	HD (Denmark)	3,5,6
Synops 2	SYNOPS (Germany)	3,5,7
Environmental performance indicator for pesticides	p-EMA (UK)	3,5,8
Pesticide environmental impact Indicator	Ipest (France)	3,5,9
Environmental Potential Risk Indicator for Pesticide	EPRIP (Italy)	3,5,10
System for Predicting the Environmental impact of Pesticides	SyPEP (Belgium)	3,5,11
Pesticide Occupational and Environmental Risk indicator	POCER (Belgium)	12
Pesticide Environmental Risk Indicator	PERI (Sweden)	3,5
SPEcies At Risk (pesticides)	SPEAR	13,14,15
Belgium Biotic Index	BBI (Belgium)	15
Biological Monitoring Working Party	BMWP (Belgium)	15
Saprobic Index	SI (Germany)	15
Ratio of EXposure to TOXicity	REXTOX (OECD Expert Group)	16
Norwegian Aquatic Risk Indicator	NARI (Norway)	17
Environmental Impact Quotient model	EIQ	17
SurfaceWater Attenuation model	SWAT	17

(1) Finizio, A., Calliera, M., Vighi, M., 2001. Rating systems for pesticide risk classification on different ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 262-274.

(2) Travisi, C.M., Nijkamp, P., Vighi, M., Giacomelli, P., 2004. Managing Pesticide Risks for Non-Target Ecosystems with Pesticide Risk Indicators: a Multicriteria Approach. *Timbergen Institute, Amsterdam*.

(3) Leendertse, P.C., Reus, J., 1999. Evaluation of pesticide risk indicators in Europe: Results of the CAPER project. in: DelRe, A.A.M., Brown, C., Capri, E., Errera, G., Evans, S.P., Trevisan, M. (Eds.) *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics. La Goliardica Pavese*, 27100 Pavia, pp. 809-821.

(4) Reus, J., Leendertse, P.C., 2000. The environmental yardstick for pesticides: a practical indicator used in the Netherlands. *Crop Protection* 19, 637-641.

(5) Reus, J., Leendertse, P., Bockstaller, C., Fomsgaard, I., Gutsche, V., Lewis, K., Nilsson, C., Pussemier, L., Trevisan, M., van der Werf, H., Alfaro, F., Blumel, S., Isart, J., McGrath, D., Seppala, T., 2002. Comparison and evaluation of eight pesticide environmental risk indicators developed in Europe and recommendations for future use. *Agric. Ecosyst. Environ.* 90, 177-187.

(6) Galassi, S., Provini, A., Halfon, E., 1996. Risk assessment for pesticides and their metabolites in water. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 65, 331-344.

(7) Hernandez-Hernandez, C.N.A., Valle-Mora, J., Santisteban-Hernandez, A., Bello-Mendoza, R., 2007. Comparative ecological risks of pesticides used in plantation production of papaya: Application of the SYNOPS indicator. *Sci. Total Environ.* 381, 112-125.

(8) Brown, C.D., Hart, A., Lewis, K.A., Dubus, I.G., 2003. P-EMA (I): simulating the environmental fate of pesticides for a farm-level risk assessment system. *Agronomie* 23, 67-74.

(9) van der Werf, H.M.G., Zimmer, C., 1998. An indicator of pesticide environmental impact based on a fuzzy expert system. *Chemosphere* 36, 2225-2249.

(10) Padovani, L., Trevisan, M., Capri, E., 2004. A calculation procedure to assess potential environmental risk of pesticides at the farm level. *Ecol. Indic.* 4, 111-123.

(11) Pussemier, L., 1999. SyPEP: A system for predicting the environmental impact of pesticides in Belgium. *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics*, 851-859.

(12) Verduyssen, F., Steurbaut, W., 2002. POCER, the pesticide occupational and environmental risk indicator. *Crop Protection* 21, 307-315.

- (13) Liess, M., von der Ohe, P.C., 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 954-965.
- (14) Schafer, R.B., Caquet, T., Simes, K., Mueller, R., Lagadic, L., Liess, M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Sci. Total Environ.* 382, 272-285.
- (15) von der Ohe, P.C., Prub, A., Schafer, R.B., Liess, M., de Deckere, E., Braek, W., 2007. Water quality indices across Europe - a comparison of the good ecological status of five river basins. *J. Environ. Monit.* 9, 970-978.
- (16) Probst, M., Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Schulz, R., 2005. Scenario-based simulation of runoff-related pesticide entries into small streams on a landscape level. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 145-159.
- (17) Stenrød, M., Heggen, H.E., Bolli, R.I., Eklo, O.M., 2008. Testing and comparison of three pesticide risk indicator models under Norwegian conditions--A case study in the Skuterud and Heiabekken catchments. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 123, 15-29.

Table S2 (supplementary information): River flow during sampling.

	sampling days	MT (m ³ sec ⁻¹)	SJD (m ³ sec ⁻¹)	AN (m ³ sec ⁻¹)	RUB (m ³ sec ⁻¹)
C1	d1 (23-25/11/09)	6.1	3.0		
	d2 (25-27/11/09)	6.4	3.4		
	d3 (27-30/11/09)	6.2	4.0		
	d4 (30/11-2/12/09)	6.1	4.6		
	d5 (02-04/12/09)	6.1	4.1		
	d6 (04-09/12/09)	4.7	3.5		
	d7 (09-11/12/09)	4.7	3.3		
	d8 (11-14/12/09)	5.8	4.8		
	d9 (14-16/12/09)	4.3	5.9		
	d10 (16-18/12/09)	2.5	4.7		
C2	d1 (10-12/03/10)	14.8	22.5		
	d2 (12-15/03/10)	17.4	20.7		
	d3 (15-17/03/10)	22.5	22.7		
	d4 (17-19/03/10)	27.2	24.5		
	d5 (19-22/03/10)	30.2	30.7		
	d6 (22-24/03/10)	41.1	35.6		
	d7 (24-26/03/10)	41.2	36.6		
	d8 (26-29/03/10)	39.4	33.5		
	d9 (29-31/03/10)	24.2	27.9		
	d10 (31/03-3/04/10)	18.6	25.4		
	d11 (03-06/04/10)	17.7	23.6		
	d12 (06-09/04/10)	16.0	18.3		
	d13 (09-12/04/10)	14.9	14.9		
C3	d1 (06/06/10)	18.5	24.5		
	d2 (16/06/10)	215.1	111.7		
	d3 (21/06/10)	75.9	34.9		
	d4 (25/06/10)	27.3	23.4		
	d5 (28/06/10)	27.9	21.6	1.2	0.1
	d6 (05/07/10)	31.2	33.7	1.6	0.1
	d7 (08/07/10)	12.4	16.6		
	d8 (12/07/10)	13.1	14.5		

C1: campaign 1; C2: campaign 2; C3: campaign 3.

4.3. Estudio de la presencia de plaguicidas en aguas subterráneas

Las aguas subterráneas constituyen un medio especialmente vulnerable a los contaminantes, donde alteraciones de sus propiedades químicas y físicas son difícilmente reversibles. Es por ello, y por el uso que se hace de ellas, entre otros, como recurso para la producción de agua potable y para el riego de zonas agrícolas, que las aguas subterráneas reciben una especial atención.

El presente apartado recoge dos estudios llevados a cabo en esta línea de trabajo: uno, realizado en la Comunidad Autónoma de Cataluña, por encargo y con la financiación de la Agencia Catalana del Agua (ACA), con el fin de investigar la presencia de plaguicidas en las distintas masas de agua subterránea de la Comunidad a lo largo de los años 2007-2010 en conformidad con lo establecido en la legislación Europea (Directiva 2006/118/EC), y otro, realizado en el marco del proyecto europeo *Life +*, de acrónimo ENSAT y título “Enhancement of Soil Aquifer Treatment”, cuyo objetivo era evaluar la eficacia de los procesos de recarga artificial de acuíferos, y el posible valor añadido de la colocación de una capa reactiva en el fondo de la balsa de infiltración, en la eliminación de microcontaminantes orgánicos prioritarios y emergentes, entre ellos varios plaguicidas, de las aguas residuales regeneradas o superficiales de origen.

El primero de estos estudios se encuentra descrito en la publicación científica #6 incluida a continuación (apartado 4.3.1), y el segundo se encuentra descrito en el apartado 4.3.2.

4.3.1. Presencia y distribución de plaguicidas en aguas subterráneas de Cataluña

Publicación científica #6:

*Four-year advanced monitoring program of polar pesticides
in groundwater of Catalonia (NE-Spain)*

Por:

*Marianne Köck-Schulmeyer, Antoni Ginebreda, Cristina Postigo, Teresa Garrido, Josep
Fraile, Miren López de Alda, Damià Barceló*

Publicada en "Journal of Total Environment"



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain)



Marianne Köck-Schulmeyer^a, Antoni Ginebreda^a, Cristina Postigo^a, Teresa Garrido^b, Josep Fraile^b, Miren López de Alda^{a,*}, Damià Barceló^{a,c}

^a Water and Soil Quality Research Group, Dept. of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Catalan Water Agency, Provença 204-208, 08036 Barcelona, Spain

^c Catalan Institute for Water Research (ICRA), H₂O Building, Scientific and Technological Park of the University of Girona, Emili Grahit 101, 17003 Girona, Spain

HIGHLIGHTS

- Polar pesticides were monitored in groundwater of Catalonia, Spain, for 4 years.
- Twenty-two pesticides were reliably measured by isotope dilution and LC–MS/MS.
- Pesticide concentrations in groundwater tend to decrease with time.
- Several aquifers had pesticide concentrations that exceeded EU quality standards.
- Results were consistent with pesticide properties and the extent of irrigation.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2013

Received in revised form 23 October 2013

Accepted 23 October 2013

Available online xxx

Keywords:

Polar pesticides
Groundwater
Catalonia
Monitoring

ABSTRACT

Pesticide contamination of groundwater is of paramount importance because it is the most sensitive and the largest body of freshwater in the European Union. In this paper, an isotopic dilution method based on on-line solid phase extraction–liquid chromatography (electrospray)–tandem mass spectrometry (SPE–LC(ESI)–MS/MS) was used for the analysis of 22 pesticides in groundwater. Results were evaluated from monitoring 112 wells and piezometers coming from 29 different aquifers located in 18 ground water bodies (GWBs), from Catalonia, Spain, for 4 years as part of the surveillance and operational monitoring programs conducted by the Catalan Water Agency. The analytical method developed allows the determination of the target pesticides (6 triazines, 4 phenylureas, 4 organophosphorous, 1 anilide, 2 chloroacetanilides, 1 thiocarbamate, and 4 acid herbicides) in groundwater with good sensitivity (limits of detection <5 ng/L), accuracy (relative recoveries between 85 and 116%, except for molinate), and repeatability (RSD < 23%), and in a fully automated way. The most ubiquitous compounds were simazine, atrazine, desethylatrazine and diuron. Direct relation between frequency of detection of each target compound and Groundwater Ubiquity Score index (GUS index) is observed. Desethylatrazine and deisopropylatrazine, metabolites of atrazine and simazine, respectively, presented the highest mean concentrations. Compounds detected in less than 5% of the samples were cyanazine, molinate, fenitrothion and mecoprop. According to the Directive 2006/118/EC, 13 pesticides have individual values above the requested limits (desethylatrazine, atrazine and terbuthylazine lead the list) and 14 samples have total pesticide levels above 500 ng/L. The GWB with the highest levels of total pesticides is located in Lleida (NE-Spain), with 9 samples showing total pesticide levels above 500 ng/L. Several factors such as regulation of the use of pesticides, type of activities in the area, and irrigation were discussed in relation to the observed levels of pesticides.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In Spain, one third of the territory contains groundwater, distributed in around 700 groundwater bodies (GWBs) constituted by one or more

aquifers of different natures (e.g., porous, granular type, fissured) (ACA, 2013). As a result of the thousands of tons of pesticides used per year (the Spanish market of plant protection products was 646 million Euros in 2012 – AEPLA, 2012), several studies over time have shown pesticide contamination in several aquifers in Spain (Bono-Blay et al., 2012; Garrido et al., 2000; Jurado et al., 2012; Kampioti et al., 2005; Martins et al., 2013; Teijon et al., 2010) and the need to change and reduce crops in order to ensure groundwater sustainability in the current climate change context (Candela et al., 2012) is growing.

* Corresponding author at: IDAEA-CSIC, Department of Environmental Chemistry, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 400 6100; fax: +34 93 204 5904.
E-mail address: mllaqam@cid.csic.es (M. López de Alda).

In Europe, it was not until the 80s that the survey and consequently the preservation of groundwater started to be promoted through different EU Directives (Fait et al., 2010). In 1980, the Directive 80/68/EEC (Council of the European Communities, 1980) came into force to regulate the discharge of certain toxic, persistent and bioaccumulable substances into groundwater. In 1991, the so-called "nitrates directive" (91/676/EEC) (Council of the European Communities, 1991b) was issued with the aim of reducing water pollution caused or induced by the intensive use of nitrogen fertilizers in agriculture. In the 90s, the European Council also approved the Directives 91/414/EEC (Council of the European Communities, 1991a) and 98/8/EC (European Parliament and Council of the European Union, 1998), which aimed at regulating the use and application of pesticides, and their commercialization. Later on, in 2000, the approval of the Water Framework Directive (WFD) (Directive, 2000/60/EC – European Parliament and Council of the European Union, 2000), marked a change in the EU water policy and contained general provisions for the protection and conservation of groundwater. Successive amendments of the WFD have led to the establishment of environmental quality standards (EQS) for pesticides, including their relevant metabolites and degradation and reaction products in groundwater (0.1 µg/L for individual substances and 0.5 µg/L for the sum of pesticides) and in surface waters (maximum allowable concentrations and annual averages in the range 8×10^{-6} and 4 µg/L for various specific pesticides like alachlor, atrazine, diuron, isoproturon and simazine), according to Directives 2006/118/EC (European Parliament and Council of the European Union, 2006) and 2013/39/EC (European Parliament and Council of the European Union, 2013), respectively.

To comply with the policy directives and guidelines, optimal analytical methods must be validated to detect pesticides in groundwater at satisfactory levels. SPE has been used for extraction because it integrates extraction with purification in a single step, and can be automated (on-line SPE) (Ibáñez et al., 2005; Kampioti et al., 2005; Kuster et al., 2010; Postigo et al., 2010). For detection, gas chromatography (GC) coupled to MS (Bono-Blay et al., 2012; Garrido et al., 2000; Hildebrandt et al., 2008; Kolpin et al., 2004) or MS/MS (Baugros et al., 2008) has been frequently used. However, LC coupled to MS (Estévez et al., 2012; Rodríguez-Mozaz et al., 2004) or MS/MS (Carvalho et al., 2008; Fenoll et al., 2011; Kampioti et al., 2005; Postigo et al., 2010; Zhao et al., 2011) has gained importance because this technique allows the analysis of a wide range of different compounds, and is more suitable for the analysis of molecules with a polar character, such as most of the currently used pesticides and their transformation products (Kuster et al., 2009).

The aim of this paper is to describe a highly reliable analytical method based on isotope dilution on-line SPE–LC–MS/MS optimized for the analysis of 22 pesticides in groundwater, and the results of a 4-year monitoring program carried out by the responsible water authority (Catalan Water Agency, ACA) as part of the surveillance and operational monitoring networks in terms of the WFD in 18 GWBs (29 aquifers, 112 wells and piezometers) from Catalonia (NE Spain) that are subjected to significant agricultural pressures. Possible factors that may explain those results are tentatively discussed as well.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Standards of 22 selected pesticides and 20 related isotopically labeled compounds used as surrogate standards were purchased from Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) or Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Stock standard solutions of the individual analytes and mixtures at different concentrations were prepared in methanol and stored in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Calibration solutions (0.1 to 1000 ng/L) were prepared in HPLC water by appropriate dilution of the above standard solutions (final methanol content <0.1%).

Pesticide-grade solvents methanol, acetonitrile (ACN) and LC-grade water were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Analytical method

Analysis of the 22 pesticides (see Table 1) in groundwater was performed with a previously described on-line SPE–LC–MS/MS method (Postigo et al., 2010) in which quantification by external calibration is replaced by isotope dilution. Briefly, 5 mL samples (filtered and spiked with deuterated surrogate standards at 100 ng/L), calibration standards and blanks were extracted using an automated on-line SPE sample processor (Prospekt-2, Spark Holland, Emmen, The Netherlands) connected in series with the LC–MS/MS instrument, using HySphere Resin GP and PLRP-s trace enrichment polymeric cartridges (Spark Holland). The HySphere Resin GP cartridge was used for extraction of 6 pesticides measured in negative ionization (NI) mode, and the PLRP-s cartridge was used for extraction of the pesticides measured by positive ionization (PI) (16 compounds). After sample loading, cartridges were washed with 1 mL of LC-grade water and eluted with the chromatographic mobile phase.

Chromatographic separation was performed with a binary HPLC pump model 1525 from Waters using a Purospher STAR RP-18e column ($125 \times 2\text{ mm}$, 5 µm particle diameter, from Merck, Darmstadt, Germany) and a gradient elution with acetonitrile and water as the mobile phase. The 40 min gradient started with ACN/H₂O (10:90), increased to 50:50 in 5 min, then to ACN/H₂O 80:20 in another 20 min, and finished with 100% ACN at 26 min. During the following 5 min the column was cleaned with 100% ACN, adjusted to the initial conditions in 1 min, and finally equilibrated for an additional 8 min.

MS/MS detection was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode acquiring 2 SRM transitions per compound (the first, and more abundant, is used for quantitation and the second for confirmation), and 1 SRM transition per surrogate using a TQD triple-

Table 1
Method performance parameters.

Pesticide (surrogate)	Linearity r^2	Relative recovery (100 ng/L, n = 6)				Limits	
		HPLC water		GW		in GW (ng/L)	
		RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	LOD	Ldet
2,4-D (2,4-D d3)	0.9996	108	5	91	18	0.3	1.7
Alachlor (alachlor d13)	0.9963	98	9	101	6	1.2	3.9
Atrazine (atrazine d5)	1.0000	101	4	101	2	0.0	0.6
Bentazone (bentazone d6)	0.9998	104	7	107	8	0.1	0.4
Chlortoluron (chlortoluron d6)	1.0000	103	1	104	2	0.1	0.6
Cyanazine (cyanazine d5)	1.0000	102	3	98	4	0.2	1.0
DEA (DEA d6)	0.9992	111	4	116	4	0.4	1.2
DIA (DIA d5)	0.9967	109	18	102	22	1.1	4.7
Diazinon (diazinon d10)	0.9999	101	2	100	2	0.1	0.3
Dimethoate (dimethoate d6)	0.9993	118	7	112	11	0.3	1.2
Diuron (diuron d6)	0.9997	92	6	91	5	0.1	0.4
Fenitrothion (fenitrothion d6)	0.9997	103	5	102	8	3.7	34.1
Isoproturon (isoproturon d6)	1.0000	91	6	90	2	0.2	0.8
Linuron (linuron d6)	0.9994	95	6	85	3	4.4	14.5
Malathion (malathion d6)	0.9988	101	4	101	7	1.0	3.4
MCPA (MCPA d3)	0.9998	109	8	100	9	0.4	63.6
Mecoprop (mecoprop d3)	0.9991	102	4	104	5	0.4	3.6
Metolachlor (metolachlor d6)	0.9998	101	3	100	2	0.3	1.2
Molinate (linuron d6)	0.9996	68	3	50	12	4.3	14.5
Propanil (fenitrothion d6)	0.9976	100	6	98	6	0.6	1.3
Simazine (simazine d10)	0.9997	100	7	97	5	0.2	0.6
TBA (TBA d5)	1.0000	107	3	115	2	0.2	0.7

GW: groundwater; RR: recovery of the analyte relative to the isotopically labeled analog; RSD: relative standard deviation; linearity: calibration range Ldet – 1000 ng/L; LOD: limit of detection of the first SRM transition; Ldet: limit of determination (minimum concentration that can be quantified (>LOQ, SRM1) and confirmed (>LOD, SRM2)).

quadrupole mass spectrometer from Waters equipped with an ESI interface (Köck-Schulmeyer et al., 2013).

Validation was conducted in a six-fold study ($n = 6$) with groundwater spiked with the analytes and surrogates at individual concentrations of 100 ng/L. Two criteria were considered in the analysis: (1) analyte retention time in the sample should not vary by more than 2% of that in standard solution (when this limit was exceeded, the identification/confirmation was deemed positive if the corresponding internal standard showed similar retention time deviation); and (2) the relative abundances of the two selected analyte SRM transitions (SRM1/SRM2) in the sample should not differ by more than 20% for SRM ratios between 1 and 2 (25%, 30%, and 50% for ratios 2–5, 5–10, and 10–100, respectively) from the same relative abundances in the previously injected standard. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were defined as the concentration of the analyte that produced a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. Besides that, the limit of determination (Ldet) was established as the minimum concentration that could be quantified with the first transition ($>LOQ$, SRM1) and confirmed with the second transition ($>LOD$, SRM2).

2.3. Samples

A total of 265 groundwater samples from 18 GWBs (Fig. 1) and 112 sampling stations (wells, wellspring and piezometers) were investigated. According to the Catalan Water Agency (ACA, 2013), the sampling was designed following the requirements of the WFD (Directive 2000/60/EC, article 8). For that reason, the sampling points belong to the operational network of the Pesticide Monitoring Program which is implemented in groundwater bodies with qualitative pesticide risk. The results are used to assess the status of water bodies in relation to pesticides. These samples were collected and analyzed for 4 consecutive years: 2007 (June–November), 2008 (June–November), 2009 (May–October) and 2010 (April–September). More details on the sampling sites can be found in Table 2 and in Table SI.1 (Supplementary information).

Water samples were collected from wells and some piezometers (see protocol in Fig. SI.1 – Supplementary information) in amber glass bottles and transported to the laboratory at 4 °C. Upon receipt, the samples were filtered (0.45 µm membrane filters) and stored at –20 °C in the dark until analysis. Samples from 2007 and 2008 were analyzed by on-line SPE-LC-MS/MS with external calibration (Postigo et al., 2010). The 2009 and 2010 samples were analyzed using isotope dilution on-line SPE-LC-MS/MS, which was previously validated and applied to the analysis of wastewaters (Köck-Schulmeyer et al., 2013). General hydrogeochemistry data of the sampling stations (NO_3 , NO_2 , NH_4 , SO_4 , Mn, Fe, pH, conductivity, and total organic carbon (TOC)) were available from the Catalan Water Agency (ACA, 2013).

2.4. Data evaluation

Because not all sites were monitored in all campaigns, statistical evaluation using PASW Statistics 18 (Predictive Analytics Software – SPSS Inc., USA) was only performed on data from sites with at least two values. Data corresponding to sampling stations analyzed only once (32 sampling stations), and hence not considered in the statistical evaluation, are shown in Table SI.2 (Supplementary information). Thus, instead of 18 masses, 112 sampling stations and 265 samples, the final database contained quantitative data corresponding to 14 GWBs, 80 sampling stations and 233 samples.

The significance of differences in concentration was checked by means of the Student *t*-test or ANOVA (analysis of variance), depending on the case. Principal component analysis (PCA) was also applied. To avoid dealing with missing cases (values below the Ldet), the PCA was applied to pesticide classes (i.e., sum of triazines, phenylureas, etc.; see Table 3) rather than to individual compounds. In all cases, a 95% confidence interval was considered.

Mean and total pesticide concentrations were calculated according to the Directive 2009/90/EC (Commission of the European Communities, 2009). Thus, in calculating mean concentrations, values below the Ldet were considered as half the corresponding pesticide limit ($<Ldet = Ldet/2$); whereas for total pesticide (or pesticides belonging

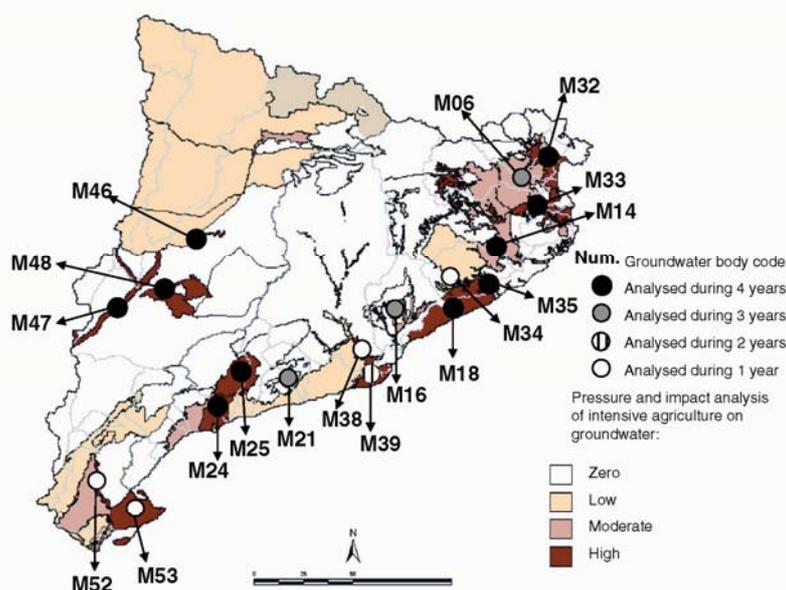


Fig. 1. Map showing the location of the groundwater bodies sampled in 2007, 2008, 2009 and 2010, and results of the pressure and impact analysis of intensive agriculture on the groundwater bodies from Catalonia, as estimated by the Catalan Water Agency (ACA) – Generalitat de Catalunya; <http://www.gencat.cat/aca/>.

Table 2 (continued)

Code	Groundwater body Name	Aquifer code	Station code ⁽⁺⁾	Total pesticides (ng/L)				Organic TOC ^a	Anions			Cations NH ₄ ⁺	General Conduct ^{**}	Metals	
				2007	2008	2009	2010		NO ₃ ^{-*}	NO ₂ ^{-*}	SO ₄ ^{2-*}			Fe ^{***}	Mn ^{***}
M35	Alluvial of the lower Tordera and delta	AQ-26	08110-0185	7.69	0.61	0.00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M35	Alluvial of the lower Tordera and delta	AQ-26	08155-0084	30.63	42.27	81.41	20.82	1.7	7.6	0.16	103	<0.2	880	<25	37.0
M39	Llobregat delta	AQ-28	08089-0040	0.00	0.72	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M39	Llobregat delta	AQ-28	08200-0022	5.37	16.97	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M39	Llobregat delta	AQ-28	08301-0028	0.74	0.12	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M46	Alluvial of the middle Segre	AQ-06	25172-0005	202.15	66.27	118.71	35.62	<1.0	11.8	<0.04	51	<0.2	461	30	<1.0
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	25102-0001	16.50	23.25	9.54	10.51	2.4	17.6	<0.04	935	<0.2	2175	132	112.5
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	25120-0020	135.50	65.80	483.14	33.42	1.1	47.4	<0.04	177	<0.2	1077	<25	2.0
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	25174-0001	n.a.	70.22	295.12	n.a.	<1.0	17.4	<0.04	86	<0.2	722	<25	<1.0
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	25254-0004	328.78	244.45	69.28	78.92	<1.0	24.8	<0.04	114	0.1	723	31	<1.0
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25048-0003	n.a.	n.a.	227.13	452.87	n.a.	33.8	0.05	n.a.	0.3	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25050-0006	n.a.	1095.57	n.a.	893.48	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25096-0008	n.a.	n.a.	124.47	340.16	1.7	74.5	0.04	208	<0.2	1148	<25	3.0
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25158-0004	n.a.	n.a.	477.93	604.37	1.5	67.4	<0.04	331	<0.2	1360	<25	1.8
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25168-0001	1676.40	2155.29	n.a.	499.97	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25168-0003	1086.22	201.13	n.a.	319.34	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25168-0004	1630.47	1778.46	n.a.	453.31	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25225-0001	326.97	66.45	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25225-0003	559.63	286.78	27.10	91.65	1.5	28.4	<0.04	481	<0.2	1662	103	26.0
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25248-0002	n.a.	n.a.	234.59	262.53	n.a.	52.7	<0.04	n.a.	<0.2	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: not analyzed (+) sampling station code.

* mg/L.

** µS/cm at 20 °C.

*** µg/L (total).

to a given class) concentrations, values below the limit of determination were considered as zero (<Ldet = 0). Concerning physical–chemical data (NO₃, NO₂, NH₄, SO₄, Mn, Fe, pH, conductivity, and TOC), if more than one value per parameter and sampling stations (corresponding to different sampling years) were available, they were averaged (Table 2).

Correlations between the triazine transformation products desethyltriazine (DEA) and deisopropyltriazine (DIA) with hydro-chemical groundwater levels of NO₃, SO₄, conductivity, Fe, Mn, and TOC as explanatory variables were studied. Average concentration in each sampling point was taken for both the dependent and the explanatory

Table 3

Target pesticides, properties, frequency of detection, minimum, maximum, median and mean concentrations in the groundwater samples analyzed (233 from 80 sampling stations), and number of noncompliances with the EU regulation.

Substances	CAS no.	Chemical group	Used as	Introduction ^a	GUS ^a	Frequency (n = 233)	Concentration (ng/L) in positive samples				Dir. 2006/118/EC Cases > 100 ng/L	
							%	(Cases)	Min	Max		Median
2,4-D	94-75-7	Acid	Herbicide	–1950	2.25	12	(28)	0.63	160.28	3.04	13.28	1
Alachlor ^b	15972-60-8	Chloroacetanilide	Herbicide	1969	2.19	7	(16)	0.97	9950.00	5.16	639.33	1
Atrazine ^b	1912-24-9	Triazine	Herbicide	1957	3.75	65	(151)	0.10	756.00	3.16	29.00	12
Bentazone ^c	25057-89-0	Acid	Herbicide	1972	2.55	20	(46)	0.37	291.36	2.42	11.78	1
Chlortoluron	15545-48-9	Phenylurea	Herbicide	1994	2.79	12	(28)	0.33	163.00	1.63	7.98	1
Cyanazine	21725-46-2	Triazine	Herbicide	–1957	2.07	2	(4)	0.79	3.44	2.47	2.29	0
DEA	6190-65-4	Triazine	Herbicide	–	3.54	56	(131)	0.31	1370.00	5.51	84.70	25
DIA	1007-28-9	Triazine	Herbicide	–	–	34	(79)	0.19	761.00	3.47	32.58	4
Diazinon	333-41-5	Organophosphate	Insecticide	1953	1.14	51	(118)	0.32	30.80	1.87	4.39	0
Dimethoate	60-51-5	Organophosphate	Insecticide	–1957	1.05	10	(23)	0.24	2277.49	1.99	146.55	2
Diuron ^d	330-54-1	Phenylurea	Herbicide	–1951	1.83	53	(124)	0.07	178.00	2.79	9.32	2
Fenitrothion	122-14-5	Organophosphate	Insecticide	1962	0.64	3	(6)	8.15	19.50	12.37	13.25	0
Isoproturon ^b	34123-59-6	Phenylurea	Herbicide	Unknown	2.07	13	(30)	0.42	16.90	1.21	2.54	0
Linuron	330-55-2	Phenylurea	Herbicide	–1965	2.03	14	(32)	0.76	1010.00	2.11	38.43	1
Malathion	121-75-5	Organophosphate	Insecticide	1991	–1.28	7	(17)	2.57	86.60	8.77	17.12	0
MCPA	94-74-6	Acid	Herbicide	1950	2.51	7	(17)	0.21	199.97	3.16	26.26	1
Mecoprop ^c	7085-19-0	Acid	Herbicide	–1956	2.29	5	(11)	0.32	42.82	2.77	6.29	0
Metolachlor	51218-45-2	Chloroacetanilide	Herbicide	1976	3.32	8	(19)	1.43	602.98	7.49	49.81	2
Molinate	2212-67-1	Thiocarbamate	Herbicide	1964, USA	2.49	2	(5)	0.71	5.21	2.30	2.70	0
Propanil	709-98-8	Anilide	Herbicide	1961	0.42	39	(90)	0.21	20.50	2.75	3.65	0
Simazine ^b	122-34-9	Triazine	Herbicide	–1960	3.35	78	(181)	0.19	98.60	4.99	9.59	0
TBA	5915-41-3	Triazine	Herbicide	1967	3.07	44	(103)	0.38	855.00	6.12	42.59	12

DEA, desethyltriazine; DIA, deisopropyltriazine; GUS, Groundwater Ubiquity Score; TBA, terbuthylazine.

^a Agriculture & Environment Research Unit (AERU), 2011. The PPDB. Pesticide Properties Database. University of Herfordshire, UK. <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>>.

^b Included in the Directive 2013/39/EC as priority substances in the field of water policy.

^c Included in the Directive 2008/105/EC as substances subject to review for possible identification as priority substances or priority hazardous substances.

variables. Nondetected values were treated as described above and sampling stations where both DEA and DIA were missing (nondetected) were excluded, yielding a final set of 33 points.

Univariate and multivariate general relationships as described respectively in Eqs. (1) and (2) were considered:

$$Y = A \cdot X^a \tag{1}$$

$$Y = A \cdot \prod_{i=1}^6 X_i^{\alpha_i} \tag{2}$$

Where Y is DEA, DIA, DEA/atrazine, and DIA/simazine; X_i is NO_3 , SO_4 , conductivity, Fe, Mn, and TOC; and A and α_1 to α_6 are numerical constants.

For that purpose, log transformed variables were used, so that the above equations become linear (Eqs. (3) and (4) respectively):

$$\log Y = \alpha \cdot \log X + \delta \tag{3}$$

$$\log Y = \sum_{i=1}^6 \alpha_i \cdot \log X_i + \delta \tag{4}$$

Eqs. (3) and (4) (α coefficients and intercept δ) were determined by least squares single or multiple regression.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

The results of the method validation study presented in Section 2.2 showed satisfactory performance for pesticides in groundwater (Table 1) in terms of linearity ($r^2 > 0.996$), sensitivity ($\text{LOD} < 5 \text{ ng/L}$ and $\text{Idet} < 65 \text{ ng/L}$), accuracy (85–116% recoveries relative to the corresponding deuterated surrogate standards, except for molinate (68%), which has no deuterated analog), and repeatability (relative standard deviations (RSD) < 23%). Fig. S1.3 in the Supplementary information shows representative chromatograms corresponding to the on-line SPE–LC–MS/MS analysis of a groundwater sample spiked with the analytes at 100 ng/L.

3.2. Overall pesticide levels

Table 3 presents properties of the target compounds and details on their presence in all 233 samples evaluated. The triazines simazine and atrazine appear to be the pesticides most commonly found in Europe's groundwater (Loos et al., 2010; Scheidleder et al., 1999) and the present study corroborates this finding. The most ubiquitous compounds (found in more than 50% of the samples) were the herbicides simazine, atrazine and DEA, followed by the herbicide diuron (frequency of detection 78, 65, 56 and 53%, respectively). In 2002, herbicides were the second most important class of pesticides sold in the EU after fungicides (Guzzella et al., 2006), whereas in Spain in 2010 the most consumed pesticide classes were insecticides followed by herbicides (31.2 and 28.7%, respectively – MARM, 2012). According to the most recent and extensive monitoring study in the EU (Loos et al., 2010), triazines and their degradation products (specifically, atrazine, DEA, desethylterbutylazine, simazine, and terbutylazine) are the most ubiquitous and abundant polar pesticides found in aquifers. Although simazine and atrazine have been banned in the European market since 2004 (Commission of the European Communities, 2004a, 2004b), and both have been considered priority substances in the field of water policy since 2001 (European Parliament and Council of the European Union, 2001), their occurrence and persistence in groundwater are of concern. Within the category of insecticides, dimethoate is the most abundant compound (>2200 ng/L). A broad-spectrum of organophosphate insecticides is used worldwide against a wide range of sucking and chewing

insects, and in a large number of crops such as citrus, cotton, olives, potatoes, cereals, tea and snuff. As a result of their intensive use in agricultural crops, several studies have detected dimethoate at high concentrations. Herrero-Hernández et al. (2013) detected dimethoate in water samples (mainly in groundwater) from La Rioja region (North Spain) at concentrations above 7500 ng/L, while Sánchez-González et al. (2013) detected more than 2100 ng/L of the same organophosphate in groundwater samples from the center of Spain.

The frequency of detection of the target pesticides as a function of their GUS index (Groundwater Ubiquity Score index – Gustafson, 1989) is illustrated in Fig. 2A, showing the utility of this index to predict the behavior and occurrence of pesticides in groundwater. Triazines (widely used years ago) are the target compounds with the highest GUS index and frequency of detection. At the opposite extreme, malathion, with the lowest GUS index, was detected in just 7% of the samples, indicating that it is a little lixiviable. Compounds

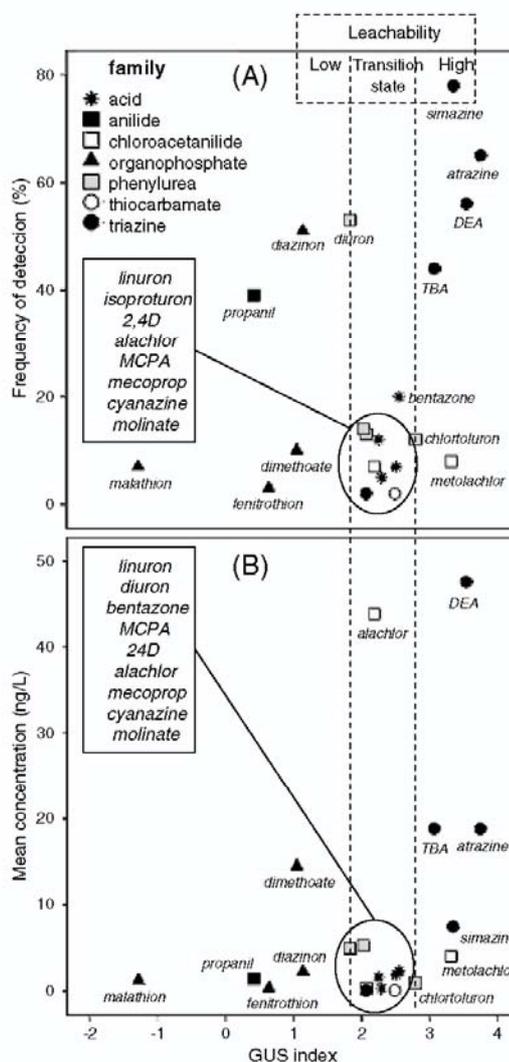


Fig. 2. Plot of (A) the frequency of detection and (B) the mean concentration of each pesticide vs. its GUS index.

detected in less than 5% of the samples included cyanazine, molinate, fenitrothion and mecoprop, which have low or medium leachability. The relation between mean concentrations and GUS indexes (Fig. 2B), also showed consistent results. DEA (the main metabolite of atrazine and to a lesser extent of propazine (Mills and Thurman, 1994)) followed by DIA (the main metabolite of simazine and to a lesser extent of atrazine), presented the highest mean concentrations (Table 3). Alachlor, a chloroacetanilide forbidden for use since 2008 (Commission of the European Communities, 2006) and included in the list of 33 priority substances in water (European Parliament and Council of the European Union, 2001), showed also a high mean concentration, despite its medium leachability. The finding in ground water of nonleachable compounds according to their GUS index (<1.8) is explained by the fact that this index is based on the compound Koc (organic-carbon partitioning coefficient) and $T_{1/2}$ (half-life time), and both parameters are generally obtained in laboratory conditions. Sampling station with code 17199-0031 exhibited levels of alachlor near 10 $\mu\text{g/L}$, and comparatively high concentrations of many other compounds like atrazine, chlortoluron, DIA, linuron, and terbutylazine. This area (M33, Baix Empordà and part of Girona) is known for its intense agricultural activity, marked by fruit and corn since 2008 (Generalitat de Catalunya, 2011), for which several of the above pesticides are used. The environmental quality standards of 100 ng/L for individual pesticides and 500 ng/L for total pesticides set in groundwater by the Directive 2006/118/EC (European Parliament and Council of the European Union, 2006) were surpassed in several cases. Thirteen of the 22 target compounds exceeded 100 ng/L at least once. DEA, atrazine and terbutylazine (TBA) led the list with 25, 12 and 12 noncompliances, respectively. Considering levels of total pesticides, 14 samples showed levels above 500 ng/L, from which 3 belonged to the NE area of the Girona province (M32, M33), 2 to the NE area of Barcelona province (M35), and 9 to Lleida (M48).

3.3. Spatial and temporal distribution of pesticides

The occurrence of pesticides in groundwater is typically a consequence of seasonal agricultural practices, with the corresponding delay in time due to the usually slow transport of the compounds through the vadose zone. Variability over time in a specific area is most likely related to the corresponding aquifer recharge, which is strongly dependent on rainfall. We observed differences over time in some areas, with an overall decrease in the total pesticide concentration over the 4 years in 50% of the GWBs investigated (M25, M06, M32, M46, M33, M47, M48), and increasing total pesticide levels with time in M14 and M35, two neighboring GWBs located in La Selva, Girona.

Additional factors, as discussed below, may also play a significant role.

3.3.1. Regulation of pesticide use

Comparing our results with previous studies in Catalonia (Table 4), levels of several compounds decreased over time. This is most likely because in the last 10 years many pesticides have been banned, as is the case of atrazine and simazine in 2004, and diazinon and fenitrothion in 2007 (Commission of the European Communities, 2007a, 2007b). On the other hand, the gradual implementation of good agricultural practices has undoubtedly contributed to such decrease.

3.3.2. Type of activities in the area

In Catalonia, Lleida (M46, M47, M48) stands out for its intensive agricultural activity, dedicated mainly to cereals, fresh and dry fruits, corn, olives and vineyards, followed by Empordà (M32, M33), located in the Girona region. The collateral effect of agricultural activities is reflected in the comparatively high levels of pesticides found in those regions, in contrast to the levels found in other areas like the

Baix Llobregat (M39), where urban and industrial activities coexist with agriculture. As it can be seen in Table 4, pesticide levels in the Llobregat delta compared with levels in the Ebro basin are also very different. The Ebro basin, well known to be an intensively exploited area in terms of agriculture and groundwater abstraction for irrigation (with citrics, fruit, olive, vegetables, and in the delta also rice, as predominant crops), shows comparatively higher levels of pesticides than the Llobregat basin, where agriculture is also important (fruit and vegetable) but the relative contribution of other pressures, mainly urban, is remarkable (Fig. S1.4 in the Supplementary information presents the relative land uses of the target groundwater bodies). The urban pressure in the Llobregat delta's groundwater is well known. Cabeza et al. (2012) found in groundwater samples from 2008 to 2010 a profile of pesticide contamination similar to that observed in the present study, characterized by a high frequency of detection of terbutylazine, atrazine and diuron, but at relatively low concentrations (<100 ng/L). The presence of these pesticides has been linked to agricultural activities in the region, but also to the direct injection of reclaimed water (highly loaded with urban use pesticides not efficiently removed during waste water treatment) for aquifer recharge.

The type of crop and the type of pest to be treated are also important since they determine the application mode and the active compound(s). Thus, while for cereals treatment with a single type of pesticide may be sufficient, horticulture and flowers often require the application of various active compounds. As an example, La Rioja wine-growing region is one of the Spanish regions with the highest investment per hectare in crop protection products and recently some studies have shown high levels (>5000 ng/L) of terbutylazine and diuron (herbicides extensively used in vineyards) in groundwater samples (Herrero-Hernández et al., 2013). Fig. S1.5 in the Supplementary information shows the geographical distribution of the various types of crops (rice, corn, fresh fruit, dry fruit, citrus, vegetables, olives, and vineyards) cultivated in Catalonia. Nevertheless, since aquifers are dynamic systems, their qualitative and quantitative status reflect the pressures and activities carried out not only in their own area but also in their surroundings as well (Bono-Blay et al., 2012).

3.3.3. Water availability and irrigation

Agricultural production is closely related to water availability and irrigation. Unfortunately, irrigation also facilitates the transport of pesticides from the soil into the groundwater, giving rise to a "vicious circle", i.e., more irrigation, more agricultural activity, more use of pesticides, and finally more pesticides in groundwater. Fig. 3 shows that in Lleida where 60–80% of the soil is irrigated, pesticide concentrations are among the highest measured. Other factors that can influence the occurrence of pesticides in groundwater are the soil characteristics (permeability, vadose zone thickness, geologic material, etc.), the characteristics of the applied compounds (some compounds are initially retained in the soil and only the more recalcitrant may leach afterwards), the depth of the drilled-wells, and the quality of the irrigation water. Often, the use of treated waste water in irrigated agriculture may contribute to the increase of the concentration of pesticides in groundwaters, especially in Spain, where most of the reclaimed water is used in agriculture (Bixio et al., 2006). Jurado et al. (2012), in their review about the occurrence of emerging organic contaminants in groundwater in Spain, also support the idea that WWTP effluents may be the main source of groundwater pollution due to their continuous input of emerging organic contaminants into the aquatic environment. Previous studies in the same area (Köck-Schulmeyer et al., 2013) have revealed high levels of pesticides in WWTP effluents and even in plants with tertiary treatment, despite the frequent belief that this treatment produces water of sufficient quality for reuse in different sectors.

Table 4
Range of concentrations (ng/L) of detected pesticides in groundwater samples and an overview of their presence in previous studies, sorted by date.

Analytes	R1 Catalonia 1997–1998	R2 Salamanca and Zamora 1999	R3 Llobregat delta 2000	R4 Ebro basin 2000–2001	R5 Llobregat 2002	R6 Llobregat 2003	R7 Ebro basin 2004	R8 Llobregat delta 2007–2008	R9 Spain 2007–2008	R10 Aguda river basin 2012	This study Catalonia 2007	This study Catalonia 2008	This study Catalonia 2009	This study Catalonia 2010
2,4-D	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.6–8.6	4.1–8.6	1.8–1603	1.0–74.4
Alachlor	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	Not detected	Not detected	50–510	n.a.	n.a.	n.a.	1.8–96.8	1.0–9950	4.1–51	Not detected
Atrazine	3–1100	160	25–59	10–2460	7–14	2.3	10–170	Not detected	7	40–327	0.1–498.0	0.1–756.0	0.9–72.4	0.6–167.9
Bentazone	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.6–26.3	0.5–6.4	0.6–291.4	0.4–64.9
Chlorotoluron	n.a.	160–1700	n.a.	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.3–5.8	0.3–163.0	0.6–4.1	3.7–7.8
Cyanazine	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	n.a.	1.33	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	0.8–2.9	Not detected	3.4	Not detected
DEA	n.a.	n.a.	25–36	10–1980	2–3	1.5	110–570	n.a.	2–24	64–369	0.3–1370	0.3–813.0	1.5–394.6	0.3–559.1
DJA	n.a.	n.a.	25–63	10–790	n.a.	1.1	n.a.	n.a.	9–59	n.a.	0.3–174.0	0.2–761.0	4.9–48.3	2.0–80.0
Diazinon	10–400	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	3.4	20–60	n.a.	n.a.	Not detected	0.5–30.8	0.3–20.0	0.3–20.0	0.5–19.0
Dimethoate	10–100	Not detected	Not detected	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	n.a.	n.a.	54–2144	0.3–2.0	0.2–913.0	1.5–36.8	17.1–227.8
Diuron	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	4	3.7	n.a.	0.27–155	n.a.	41–88	0.1–178.0	0.1–104.0	0.5–49.2	1.6–29.7
Fenitrothion	10–800	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	150	n.a.	n.a.	n.a.	8.2–19.5	Not detected	Not detected	Not detected
Isoproturon	n.a.	60–100	n.a.	n.a.	Not detected	1.4	n.a.	Not detected	n.a.	n.a.	0.5–5.6	0.4–16.9	0.7–3.6	1.3–7.9
Linuron	n.a.	80–100	n.a.	n.a.	n.a.	Not detected	n.a.	n.a.	n.a.	61–541	0.8–24.2	0.8–1010	14.8–68.4	Not detected
Malathion	10–1300	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2.6–26.0	13.0–86.6	8.8	4.0–11.6
MCPA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.4–47.8	0.2–6.1	83.3–200.0	62.6
Mecoprop	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.71	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.3–3.9	4.7	Not detected	7.5–42.8
Metolachlor	n.a.	Not detected	Not detected	10–2000	n.a.	3.3	5370	n.a.	Not detected	38–548	3.1–24.9	1.4–171.0	3.6–23.6	10.7–603.0
Molinate	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.64	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.7–4.4	5.2	Not detected	Not detected
Propanil	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0.4–7.0	0.4–20.5	2.3–13.3	0.2–18.6
Simazine	3–150	n.a.	25–164	10–540	22–153	54	40–80	n.a.	1.8	n.a.	0.3–98.6	0.2–60.0	0.7–53.3	0.5–47.8
TBA	n.a.	n.a.	30–83	10–1270	n.a.	5.2	10–90	n.a.	Not detected	38–252	2.5–184.0	1.6–855.0	1.0–143.1	0.4–329.9

n.a.: not analyzed; R1: Garrido et al. (2000); R2: Carabias-Martínez et al. (2003); R3: Quirana et al. (2003); R4: Hildebrandt et al. (2008); R5: Rodríguez-Mozaz et al. (2004); R6: Kampouri et al. (2005); R7: Hildebrandt et al. (2007); R8: Tejón et al. (2010); R9: Bono-Blay et al. (2012); R10: Sánchez-González et al. (2013).

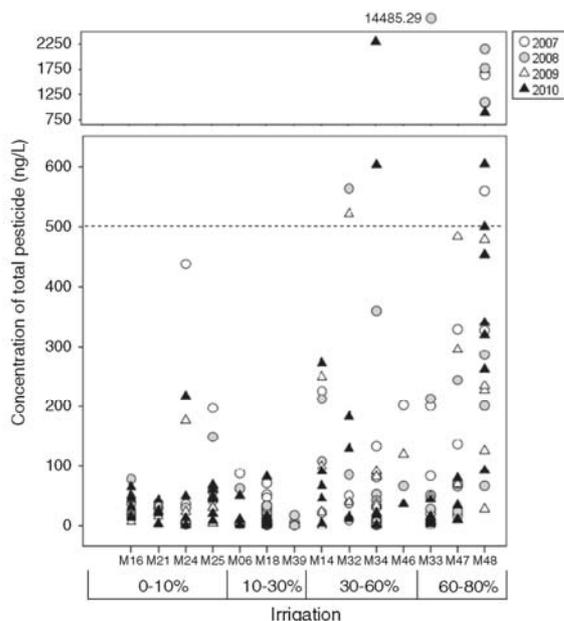


Fig. 3. Total pesticide levels measured along the 4 monitoring campaigns in the various sampling stations, grouped by GWB, with indication of the percentage of irrigated land.

3.4. Pesticide profiles

Lleida and Empordà are the areas with the highest levels of pesticides in groundwater, and irrigation seems to be one of the main contributing factors. To explore potential relations between pesticide levels and areas, the principal component analysis (PCA) statistical

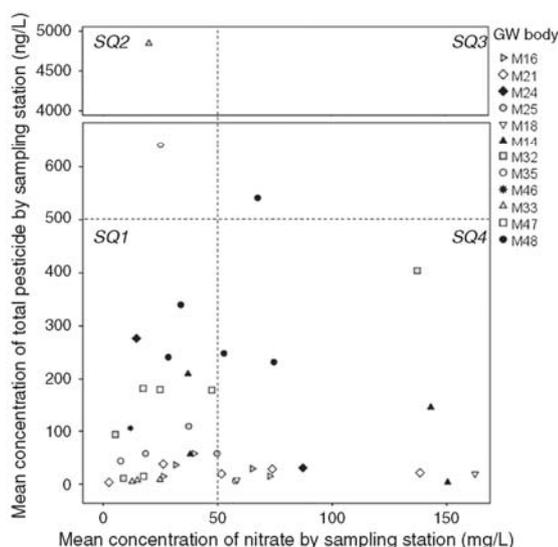


Fig. 5. Plot showing the relation between total pesticides and nitrates, by sampling station.

test was applied to pesticide families (rather than to individual pesticides to avoid missing cases). Two principal components were identified (Fig. 4), justifying together 94.3% of the cases. In PC1 there is a predominance of organophosphates, phenylureas, chloroacetanilides and triazines, whereas PC2 is dominated by acids, thiocarbamates and anilides. Regarding GWBs, M18 and M48 present clearly distinct profiles, which in the case of M18 (located in Maresme) corresponds to the PC2 profile and in the case of M48 (located in Lleida) to the PC1 profile. Both GWBs present aquifers with similar physical characteristics

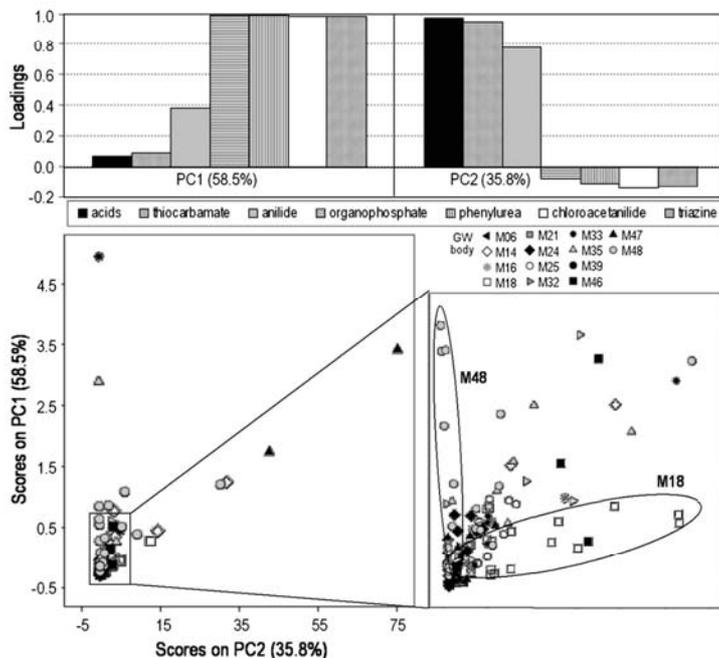


Fig. 4. Principal component analysis results: loadings for the two principal components and score plots for the PC1&PC2, by groundwater bodies.

(see Table SI.1. in the Supplementary information), but their respective agricultural activities differ substantially. Thus, whereas Lleida is one of the most important areas in Catalonia in terms of agriculture (dominated by fruits and corn), Maresme is located in the coast and its agriculture is characterized by production of flowers, ornamental plants and vegetables, although woodland areas are also present (Fig. SI.4, Supplementary information). M48 is the most contaminated GWB in Catalonia, exceeding several times the limit of 500 ng/L for total pesticides, whereas M18 never presented levels for total pesticides above 100 ng/L (Figs. 1 and 3). Another difference between these two GWBs is the sampling depth. Water samples from M18 were taken at a depth of 15–44 m, depending on the well (see Table SI.1 and Fig. SI.2 in the Supplementary information), while samples from M48 were taken at a depth of only 3–9 m. This observation is in agreement with the preliminary assumption that the greater the depth of the well, the lower the concentration of pesticide. PCA between pesticide families and irrigation zones was also tested, without conclusive results (Fig. SI.6. in the Supplementary information).

3.5. Other pollution indicators

Besides pesticides, other indicators help assess the environmental risk that contaminants may have on groundwater. Other important groundwater quality indicators include nitrate, chloride, alkalinity, pH-value and electrical conductivity (Scheidleder et al., 1999).

In Spain, nitrate concentrations in groundwater are related to pressure from crop production and livestock practices (MARM, 2011). Transport of nitrate depends on many factors, including the vertical flow of water, which can take up to 20 years (Quevauviller et al., 2009; Scheidleder et al., 1999). Table 2 shows the nitrate concentrations measured in each of the sampling stations monitored and Fig. 5 shows their correlation with the total pesticide levels. The purpose of the correlation is to rapidly identify the most affected GWBs from an environmental standpoint. As it can be seen in Fig. 5 in square 3 (SQ3) of the graphic, only one sampling station (25158-0004) from M48 shows levels of total pesticides and nitrate above the corresponding quality standards. M14, M18, M21 and M32 showed nitrate above 100 mg/L, and total pesticide levels under 500 ng/L. Finally, around 37.5% of the nitrate levels listed in Table 2 (corresponding to 40 sampling stations) were higher than 50 mg/L. It is worth noting that GWBs M14, M16, M18, M21, M32, M33 and M48 are located in areas designated as “vulnerable zones” under the provisions of the aforementioned nitrates directive (Council of the European Communities, 1991b). These results are consistent with those reported by the Spanish Government (MARM, 2011). Nitrate levels were above 50 mg/L in 35%, 30%, and 36% of the aquifers in Catalonia in 2007, 2008, and 2009, respectively.

3.5.1. Regarding conductivity

Table 2 shows that all monitored GWBs exhibited conductivities below the established threshold (2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (at 20 °C) – Council of the European Union, 1998). Nevertheless, knowing that coastal groundwater has a higher possibility of high conductivity because of seawater intrusion, coastal GWBs (M32, M18, M24) were compared with inland GWBs, but no significant differences were found. In fact, the highest conductivity value (2175 $\mu\text{S cm}^{-1}$) was measured in an inland GWB (M47), where the presence of a gypsum lithology pattern with halite crystals causes high concentrations of sulfate and chloride in the groundwater. Other natural processes that can contribute to increase the salt content of aquifers are the evaporation and subsequent concentration/precipitation of dissolved salts, and the mixing with fossil waters (Appelo and Postma, 2005). Finally, potential relations between the conductivity (and also the TOC) with the total pesticide concentrations were assessed, but not found (see Figs. SI.7 and SI.8 in the Supplementary information).

3.6. Fate of metabolites

Pesticide transformation products (TPs) may significantly contribute to the overall pesticide pollution of both soil and groundwater (Guzzella et al., 2006).

In the present study we monitored two metabolites (DEA and DIA) that result from microorganism-mediated reductive dealkylation of some triazine herbicides. They correspond to loss of an ethyl (DEA) or an isopropyl (DIA) moiety from the parent atrazine. DIA can also result from deethylation of simazine. Deethylation is faster than deisopropylation (Mills and Thurman, 1994); therefore, in practice, DIA is exclusively attributed to simazine while DEA is to atrazine.

As it can be seen in Table 3, both DEA and DIA were present in a significant number of the samples (56% and 34%, respectively), at concentrations spanning several orders of magnitude. DEA and DIA profiles were not correlated ($R = 0.007$), which is in fairly good agreement with previous reports (Mills and Thurman, 1994).

The ratio DIA/DEA is assumed by some authors (Mills and Thurman, 1994) to reflect the system's (soil + groundwater) dealkylation “ability”. Accordingly, values below 0.4 would be characteristic of groundwaters where long residence times are likely to occur; conversely, those exceeding this level would be indicative of surface waters or shallow groundwaters having short residence times. In this study, only 8 sites out of 33 showed DIA/DEA values over 0.4. Remarkably, 5 of these sites were located in areas declared as “vulnerable zones” under the provisions of the nitrates directive (Council of the European Communities, 1991b). Moreover most of these sites corresponded to shallow depth (i.e., fluviodeltaic) relatively polluted aquifers, such as M21, M24, M25, M33 and M35.

On the other hand, the DEA/atrazine ratio also has been used to estimate the interaction between atrazine and soil (Guzzella et al., 2006). According to Goolsby et al. (1997) values <0.4 are indicative of a poor interaction, whereas values >0.4 indicate considerable transformation. Here we report 28 cases out of 33 in which this situation occurred (with maximum DEA/atrazine values up to 350) and 5 (minimum DEA/atrazine value 0.03) reflecting no appreciable interaction with soil.

Transformation patterns of micropollutants in the soil–groundwater system is heavily dependent on, among other biotic and abiotic conditions, the existing local redox conditions which in turn are tightly related to chemical species present (Barbieri et al., 2011). We attempted to correlate DEA and DIA as well as their respective normalized values to the corresponding parent compounds (DEA/atrazine and DIA/simazine) with the hydrochemical species as explanatory variables, i.e., NO_3 , SO_4 , Fe, Mn, and TOC, all of them known to directly influence the redox conditions. Even though it is not directly related to the redox status, conductivity was also added since it reflects well the total dissolved amount of ionic species. Univariate correlations of the log-transformed variables were in general statistically not significant (see Fig. SI.9 in the Supplementary information), being the only exception log SO_4 ($R = 0.470$ to 0.123). In contrast, multivariate correlations yielded moderate but statistically significant correlations between transformation products and groundwater chemistry variables ($R = 0.727$ to 0.459 ; Table SI.3 in the Supplementary information). In general (log transformed) DEA and DIA provided better correlations than their normalized counterparts (DEA/atrazine, DIA/simazine). As far as the influence of different factors is concerned, the coefficients' sign indicate for both (log) DEA and DIA that NO_3 , SO_4 , Mn and TOC have a direct (positive) effect while Fe and conductivity show an inverse (negative) effect. On the other hand, main contributing variables are (log) SO_4 and conductivity (Fig. SI.10 in the Supplementary information).

4. Conclusions

The isotopic dilution method described, based on on-line SPE-LC(ESI)–MS/MS, allows the reliable analysis of the 22 selected pesticides in groundwater with satisfactory sensitivity and repeatability. Other

advantageous feature of the method is its automation due to the use of on-line SPE.

The analysis of 265 groundwater samples revealed that, despite the levels of some compounds decreased with time, mainly because many have been banned or because of the implementation of good agricultural practices, some GWBs subjected to significant agriculture pressure continue to show high levels of pesticides. A direct relationship was apparent between pesticide levels in groundwater and their leaching properties (GUS index) and with the extent of irrigation and the depth of the sampled well. The most relevant compounds in groundwater were simazine, atrazine (both banned in the European market since 2004), diuron (priority substance according with the Directive 2013/39/EC), and the transformation products DEA and DIA. Thirteen of the 22 target compounds exceeded at least once the limit of 100 ng/L and 14 samples exceeded the limit of 500 ng/L for total pesticides (Directive 2006/118/EC). Lleida and Empordà, known for their intensive agriculture, were the most affected GWB regions from an environmental standpoint: the collateral effect of agricultural activities is reflected in the comparatively high levels of pesticides found in those regions.

Conflicts of interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Acknowledgments

The work was supported by the Catalan Water Agency (Agència Catalana de L'Aigua), by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the projects CEMAGUA (CGI2007-64551/HID) and SCARCE (Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065), and by the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group: Water and Soil Quality Unit 2009-SGR-965). Merck is acknowledged for the gift of LC columns. Marianne Köck Schulmeyer and Cristina Postigo acknowledge the European Social Fund and AGAUR (Generalitat de Catalunya, Spain) for their economical support through FI pre-doctoral grants. Damià Barceló acknowledges financial support from the Visiting Professor Program of King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.079>.

References

- ACA (Agència Catalana de L'Aigua). Generalitat de Catalunya. Available: <http://www.gencat.cat/aca/>, 2013. [Accessed: March 13].
- AEPLA — Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas. Memoria. Madrid: AEPLA; 2012.
- Agriculture & Environment Research Unit (AERU). The PPDR, Pesticide Properties Database. UK: University of Herfordshire; 2011. Available in: <http://item.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>.
- Appelo CAJ, Postma D. Geochemistry, groundwater and pollution. Amsterdam: Taylor & Francis Group PLC; 2005.
- Barbieri M, Carrera J, Sanchez-Vila X, Ayora C, Cama J, Koeck-Schulmeyer M, et al. Microcosm experiments to control anaerobic redox conditions when studying the fate of organic micropollutants in aquifer material. *J Contam Hydrol* 2011;126:330–45.
- Baugros JB, Giroud B, Dessalces G, Grenier-Loustalot MF, Cren-Olive C. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Anal Chim Acta* 2008;607:191–203.
- Bixio D, Thoeue C, De Koning J, Joksimovic D, Savic D, Wintgens T, et al. Wastewater reuse in Europe. *Desalination* 2006;187:89–101.
- Bono-Blay F, Guat A, de la Fuente B, Pedemonte M, Cinta Pastor M, Borrell A, et al. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. *Environ Sci Pollut Res* 2012;19:3339–49.
- Cabeza Y, Candela L, Ronen D, Teijon G. Monitoring the occurrence of emerging contaminants in treated wastewater and groundwater between 2008 and 2010. The Baix Llobregat (Barcelona, Spain). *J Hazard Mater* 2012;239–240:32–9.

- Candela L, Elorza FJ, Jiménez-Martínez J, von Igel W. Global change and agricultural management options for groundwater sustainability. *Comput Electron Agric* 2012;86:120–30.
- Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Fernández-Laespada ME, Calvo-Semero L, Sánchez-San Román FJ. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res* 2003;37:928–38.
- Carvalho JJ, Jeronimo PCA, Goncalves C, Alpendurada MF. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC–MS–MS. *Anal Bioanal Chem* 2008;392:955–68.
- Commission of the European Communities. Commission Decision of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of simazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance (2004/247/EC). *Off J Eur Union* 2004a;L78:50–2.
- Commission of the European Communities. Commission Decision of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance (2004/248/EC). *Off J Eur Union* 2004b;L78:53–5.
- Commission of the European Communities. Commission Decision of 18 December 2006 concerning the non-inclusion of alachlor in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance (2006/966/EC). *Off J Eur Union* 2006;L397:28–30.
- Commission of the European Communities. Commission Decision of 25 May 2007 concerning the non-inclusion of fenitrothion in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance (2007/379/EC). *Off J Eur Union* 2007a;L141:76–7.
- Commission of the European Communities. Commission Decision of 6 June 2007 concerning the non-inclusion of diazinon in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance (2007/393/EC). *Off J Eur Union* 2007b;L148:9–10.
- Commission of the European Communities. Commission Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status. *Off J Eur Union* 2009;L201:36–8.
- Council of the European Communities. Council Directive of 17 December 1979 on the protection of groundwater against pollution caused by certain dangerous substances (80/68/EEC). *Off J Eur Communities* 1980;L020:43–8.
- Council of the European Communities. Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC). *Off J Eur Communities* 1991a;L230:0001–32.
- Council of the European Communities. Council Directive of 12 December 1991 concerning the protection of water against pollution caused by nitrates from agricultural sources (91/676/EEC). *Off J Eur Communities* 1991b;L375:0001–8.
- Council of the European Union. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Off J Eur Communities* 1998;L330:0032–54.
- Estévez E, MdC Cabrera, Molina-Díaz A, Robles-Molina J, MdP Palacios-Díaz. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). *Sci Total Environ* 2012;433:538–46.
- European Parliament and Council of the European Union. Directive 98/83/EC of the European Parliament and the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. *Off J Eur Communities* 1998;L123:0001–63.
- European Parliament and Council of the European Union. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. *Off J Eur Communities* 2000;L327:0001–73.
- European Parliament and Council of the European Union. Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC. *Off J Eur Communities* 2001;L331:0001–5.
- European Parliament and Council of the European Union. Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration. *Off J Eur Union* 2006;L372:19–31.
- European Parliament and Council of the European Union. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off J Eur Union* 2013;L226:1–17.
- Fait G, Balderacchi M, Ferrari F, Ungaro F, Capri E, Trevisan M. A field study of the impact of different irrigation practices on herbicide leaching. *Eur J Agron* 2010;32:280–7.
- Fenoll J, Hellin P, Martínez CM, Flores P, Navarro S. Determination of 48 pesticides and their main metabolites in water samples by employing sonication and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 2011;85:975–82.
- Garrido T, Fraile J, Ninerola JM, Figueras M, Ginebreda A, Olivella L. Survey of ground water pesticide pollution in rural areas of Catalonia (Spain). *Int J Environ Anal Chem* 2000;78:51–65.
- Generalitat de Catalunya — Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Mapes de distribució de la superfície agrícola. Available: <http://www2.gencat.cat/portal/site/DAR/menuitem.3645c709047c363053b88e10b031e1a0/vgnnextoid=3963361d78b24110VgnVCM1000000b0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=3963361d78b24110VgnVCM1000000b0c1e0aRCRD>, 2011. [Accessed: 10 March, 2013].
- Goolsby DA, Thurman EM, Pomes ML, Meyer MT, Battaglin WA. Herbicides and their metabolites in rainfall: origin, transport, and deposition patterns across the Midwestern and Northeastern United States, 1990–1991. *Environ Sci Technol* 1997;31:1325–33.
- Gustafson DL. Groundwater Ubiquity Score — a simple method for assessing pesticide leachability. *Environ Toxicol Chem* 1989;8:339–57.

- Guzzella L, Pozzoni F, Giuliano G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environ Pollut* 2006;142:344–53.
- Herrero-Hernández E, Andrades MS, Álvarez-Martín A, Pose-Juan E, Rodríguez-Cruz MS, Sánchez-Martín MJ. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *J Hydrol* 2013;486:234–45.
- Hildebrandt A, Lacorte S, Barcelo D. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1459–68.
- Hildebrandt A, Guillamon M, Lacorte S, Tauler R, Barcelo D. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res* 2008;42:3315–26.
- Ibáñez M, Pozo OJ, Sancho JV, López IJ, Hernández F. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005;1081:145–55.
- Jurado A, Vazquez-Sune E, Carrera J, Lopez de Alda M, Pujades E, Barcelo D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: a review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Sci Total Environ* 2012;440:82–94.
- Kampioti AA, da Cunha ACB, de Alda ML, Barcelo D. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005;382:1815–25.
- Köck-Schulmeyer M, Villagrana M, López de Alda M, Céspedes-Sánchez R, Ventura F, Barceló D. Occurrence and behaviour of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Sci Total Environ* 2013;458–460:466–76.
- Kolpin DK, Schnoebelen DJ, Thurman EM. Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. *Ground Water* 2004;42:601–8.
- Kuster M, de Alda ML, Barcelo D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *J Chromatogr A* 2009;1216:520–9.
- Kuster M, Diaz-Cruz S, Rosell M, Lopez de Alda M, Barcelo D. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. *Chemosphere* 2010;79:880–6.
- Loos R, Locoro G, Comerio S, Contini S, Schwesig D, Werres F, et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res* 2010;44:4115–26.
- MARM (Ministry of the Environment and Rural and Marine Affairs) Environmental Profile of Spain 2010. Indicator-based report. Madrid: MARM – Technical Secretariat – General Publications Center; 2011 [Available: http://www.magrama.gob.es/fr/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/perfil_ambiental_2010_en.aspx. Accessed: March 25, 2013].
- MARM (Ministry of the Environment and Rural and Marine Affairs) Environmental Profile of Spain 2011. Indicator-based report. Madrid: MARM – Technical Secretariat – General Publications Center; 2012 [Available: http://www.magrama.gob.es/fr/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/perfil_ambiental_2011_en.aspx. Accessed: March 25, 2013].
- Martins M, Donato F, Prestes O, Adaime M, Zanella R. Determination of pesticide residues and related compounds in water and industrial effluent by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:7697–709.
- Mills MS, Thurman EM. Preferential dealkylation reactions of s-triazine herbicides in the unsaturated zone. *Environ Sci Technol* 1994;28:600–5.
- Postigo C, de Alda MJL, Barcelo D, Ginebreda A, Garrido T, Fraile J. Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): an approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection. *J Hydrol* 2010;383:83–92.
- Quevauviller P, Fouillac AM, Grath J, Ward R. Groundwater monitoring. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 2009.
- Quintana J, Marti I, Ventura F. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *J Chromatogr A* 2001;938:3–13.
- Rodríguez-Mozaz S, de Alda MJL, Barcelo D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1045:85–92.
- Sánchez-González S, Pose-Juan E, Herrero-Hernández E, Álvarez-Martín A, Sánchez-Martín MJ, Rodríguez-Cruz S. Pesticide residues in groundwaters and soils of agricultural areas in the Águeda river basin from Spain and Portugal. *Int J Environ Anal Chem* 2013. <http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2013.814122>.
- Scheidleder A, Grath J, Winkler G, Stärk U. Groundwater quality and quantity in Europe. Copenhagen: EEA; 1999.
- Tejón G, Candela L, Tamoh K, Molina-Díaz A, Fernández-Alba AR. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Sci Total Environ* 2010;408:3584–95.
- Zhao S, Zhang PF, Crusius J, Kroeger KD, Bratton JF. Use of pharmaceuticals and pesticides to constrain nutrient sources in coastal groundwater of Northwestern Long Island, New York, USA. *J Environ Monit* 2011;13:1337–43.

Supplementary Information

Table SI.1. Characteristics of the aquifers and sampling stations monitored.

Groundwater body		Aquifer					Sampling Station				
code	Name	Code	Extension (km ²)	Description	Hydrology	Lithology	Porosity	Code	Type	Depth (m)	Diameter (mm)
M06	L'Empordà	AQ-02	40.28	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17016-0010	well	8.8	1000
M06	L'Empordà	AQ-09	30.71	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17020-0026	well	4	1100
M06	L'Empordà	AQ-04	18.44	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	unconfined	travertine and alluvial	intergranular and fractured	17056-0052	well	4	1000
M06	L'Empordà	AQ-02	41.28	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17058-0013	piezometer	25	180
M06	L'Empordà	AQ-21	185.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17176-0005	well	22	320
M06	L'Empordà	AQ-02	40.28	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17218-0022	wellspring	135	250
M06	L'Empordà	AQ-05	773.87	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17221-0016	well	30	400
M06	L'Empordà	AQ-02	42.28	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17222-0008	well	11	2000
M14	La Selva	AQ-09	30.71	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17020-0026	well	4	1100
M14	La Selva	AQ-10	241.83	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17038-0005	well	28	1200
M14	La Selva	AQ-10	241.83	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17044-0060	well	10	400
M14	La Selva	AQ-10	241.83	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17071-0031	piezometer	153	180
M14	La Selva	AQ-10	241.83	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17148-0060	well	4.4	1500
M14	La Selva	AQ-10	242.83	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17233-0014	well	7	-
M14	La Selva	AQ-10	241.83	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	detritic non alluvial	Intergranular	17233-0022	well	15	3500
M16	Alluvial of El Vallès	AQ-13	26.00	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08046-0016	well	20	1200
M16	Alluvial of El Vallès	AQ-12	20.32	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08086-0049	well	12	1200
M16	Alluvial of El Vallès	AQ-12	20.32	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08088-0025	well	22	1200
M16	Alluvial of El Vallès	AQ-13	26.00	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08106-0041	well	8	2000
M16	Alluvial of El Vallès	AQ-11	14.54	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08108-0009	well	9	2000

Groundwater body		Aquifer					Sampling Station				
code	Name	Code	Extens.on (km ²)	Description	Hydrology	Lithology	Porosity	Code	Type	Depth (m)	Diameter (mm)
M16	Alluvial of El Vallés	AQ-12	20.32	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8135-0021	well	16	2950
M16	Alluvial of El Vallés	AQ-13	26.00	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8181-0018	well	17	1000
M18	El Maresme	AQ-17	325.70	aquifer located in areas of low permeability	predominantly unconfined	igneous	intergranular and fractured	08007-0060	pit	--	--
M18	El Maresme	AQ-15	5.44	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8007-0064	well	37	400
M18	El Maresme	AQ-17	325.70	aquifer located in areas of low permeability	predominantly unconfined	igneous	intergranular and fractured	08007-0068	well	40	500
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8009-0060	well	25	2500
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08029-0029	well	--	1500
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08029-0031	well	44	1500
M18	El Maresme	AQ-17	325.70	aquifer located in areas of low permeability	predominantly unconfined	igneous	intergranular and fractured	08035-0015	well	25	1500
M18	El Maresme	AQ-15	5.44	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8040-0017	well	30	1200
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8121-0117	well	43	1500
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8197-0033	well	44	1500
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8197-0036	well	22	2500
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8197-0048	well	22	1700
M18	El Maresme	AQ-15	5.44	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8203-0036	well	23	400
M18	El Maresme	AQ-14	35.93	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8219-0025	well	15	--
M18	El Maresme	AQ-16	10.33	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08261-0025	well	--	3000
M21	Detrital Neogene of El Baix Penedès	AQ-18	50.13	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	semiconfined	detritic non alluvial	Intergranular	C8065-0003	well	13	1000
M21	Detrital Neogene of El Baix Penedès	AQ-18	50.13	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	semiconfined	detritic non alluvial	Intergranular	43020-0056	well	90	--
M21	Detrital Neogene of El Baix Penedès	AQ-18	50.13	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	semiconfined	detritic non alluvial	Intergranular	43020-0074	well	80	300
M21	Detrital Neogene of El Baix Penedès	AQ-18	50.13	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	semiconfined	detritic non alluvial	Intergranular	43074-0056	well	130	--

Groundwater body		Aquifer					Sampling Station				
code	Name	Code	Extens.on (km ²)	Description	Hydrology	Lithology	Porosity	Code	Type	Depth (m)	Diameter (mm)
M21	Detrital Neogene of El Baix Penedès	AQ-18	50.13	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	semiconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43140-0056	well	80	300
M24	Lower Francoli	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43047-0018	well	110	400
M24	Lower Francoli	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43047-0032	well	35	1000
M24	Lower Francoli	AQ-19	6.04	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	43047-0033	well	9	2000
M24	Lower Francoli	AQ-19	6.04	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	43095-0011	well	25	1200
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43005-0083	well	43	1000
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43034-0002	well	38	1500
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43043-0002	well	172	300
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43119-0016	well	21	1000
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43161-0138	well	23	900
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43161-0148	well	13	1200
M25	L'Alt Camp	AQ-20	265.01	Porous aquifer in detritic non alluvial environments(neogene and quaternary fillers)	predominantly unconfined	deitric non alluvial	Intergranular	43161-0159	well	14	1000
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-21	185.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17047-0015	piezometer	16	100
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-22	59.23	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	confined	alluvial	Intergranular	17047-0035	well	30	500
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-21	185.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17066-0013	well	--	--
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-21	185.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17178-0050	piezometer	27	100
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-21	186.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17178-0054	piezometer	35	92
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-21	187.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17178-0055	piezometer	--	100
M32	Fluviodeltic of the Fluvia - Muga	AQ-21	188.49	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17210-0025	well	26	250
M33	Fluviodeltic of the Ter	AQ-23	126.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17018-0013	piezometer	26	90

Groundwater body		Aquifer					Sampling Station				
code	Name	Code	Extens on (km²)	Description	Hydrology	Lithology	Porosity	Code	Type	Depth (m)	Diameter (mm)
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	124.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17022-0027	well	17	600
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-01	39.03	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17067-0001	well	18	300
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-01	39.03	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17067-0013	well	14	300
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	125.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17070-0014	well	6	--
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-24	27.78	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	confined	alluvial	Intergranular	17070-0049	well	41	400
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-24	27.78	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	confined	alluvial	Intergranular	17081-0006	well	50	600
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-24	28.78	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	confined	alluvial	Intergranular	17081-0008	well	30	400
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-03	296.80	aquifer located in areas of low permeability	semiconfined	detritic non alluvial	intergranular and fractured	17085-0008	well	34	350
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	126.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17191-0021	well	8	400
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	126.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17199-0031	well	7	--
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	126.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17199-0036	well	6	1000
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	126.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17199-0044	well	5	--
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-23	126.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17205-0012	well	13	120
M33	Fluviodeltàic of the Ter	AQ-24	27.78	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	confined	alluvial	Intergranular	17211-0025	well	33	400
M34	Alluvial of l'alta i mitjana Tordera	AQ-25	23.68	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8082-0019	well	14	400
M34	Alluvial of l'alta i mitjana Tordera	AQ-25	23.68	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8259-0012	well	12	2.000
M34	Alluvial of l'alta i mitjana Tordera	AQ-25	23.68	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	17083-0005	well	14.65	600
M35	Alluvial of the lower Tordera and delta	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8110-0025	well	8	1500
M35	Alluvial of the lower Tordera and delta	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08110-0027	well	--	--
M35	Alluvial of the lower Tordera and the lower Tordera delta	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	C8110-0029	well	7	1500
M35	Alluvial of and delta	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08110-0140	well	6	--

Groundwater body		Aquifer					Sampling Station				
code	Name	Code	Extens.on (km ²)	Description	Hydrology	Lithology	Porosity	Code	Type	Depth (m)	Diameter (mm)
M35	Alluvial of the lower Tordera and della	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08110-0185	well	6	--
M35	Alluvial of the lower Tordera and della	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08165-0084	well	22	300
M38	Cubeta Sant Andreu i Vall Baixa Llobregat	AQ-26	27.58	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08263-0031	well	20	2500
M39	Llobregat Delta	AQ-28	113.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08089-0040	piezometer	55	100
M39	Llobregat Delta	AQ-28	113.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08169-0080	well	14	1300
M39	Llobregat Delta	AQ-28	114.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08169-0322	piezometer	5.5	45
M39	Llobregat Delta	AQ-28	113.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08200-0022	well	4.5	800
M39	Llobregat Delta	AQ-27	30.59	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08263-0031	well	20	2500
M39	Llobregat Delta	AQ-28	113.61	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	08301-0028	well	6	2000
M46	Alluvial of the middle Segre	AQ-06	31.55	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25172-0005	well	7	3700
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	141.22	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25102-0001	well	6.5	2000
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	141.22	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25120-0020	wellspring	--	--
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	141.22	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25174-0001	wellspring	--	--
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	141.22	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25211-0001	well	4	2500
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	142.22	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25231-0003	wellspring	--	--
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	141.22	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25254-0004	well	6	2350
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25048-0003	well	3	600
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25050-0006	well	--	--
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25096-0008	well	3	1000
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25158-0004	well	4	800
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25168-0001	well	3	800

Groundwater body		Aquifer					Sampling Station				
code	Name	Code	Extens on (km ²)	Description	Hydrology	Lithology	Porosity	Code	Type	Depth (m)	Diameter (mm)
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25168-0003	well	6	1100
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25168-0004	well	--	--
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25225-0001	well	6	--
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25225-0003	well	8	1200
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25248-0002	well	9	1000
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	316.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	25252-0003	well	8	1300
M52	Alluvial of Toróbsa	AQ-08	317.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	43155-0056	well	24	300
M52	Alluvial of Toróbsa	AQ-08	318.39	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	43155-0923	well	40	300
M53	Delta of the Ebro	AQ-29	330.11	Porous aquifer in alluvial-colluvial environments	unconfined	alluvial	Intergranular	43014-0440	well	40	300

Table SI.2. Concentrations of total pesticides and physical-chemical properties of sampling stations analyzed only one year.

code	groundwater body		station code(+)	sample year	total pesticides (ng/L)	organic		anions		cations		general		metals	
	name	aquifer code				TOC*	NO ₃ *	NO ₂ *	SO ₄ ²⁻ *	NH ₄ ⁺ *	conduct**	Fe**	Mn**		
M06	L'Empordà	AQ-02	17016-0010	2010	16.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M06	L'Empordà	AQ-09	17020-0026	2007	19.7	2.8	13.95	<0.04	71.5	<0.1	803	<25	<1	<1	<1
M06	L'Empordà	AQ-02	17058-0013	2009	7.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M06	L'Empordà	AQ-21	17176-0005	2010	3.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M06	L'Empordà	AQ-02	17222-0008	2010	5.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M14	La Selva	AQ-10	17071-0031	2009	4.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M14	La Selva	AQ-10	17233-0014	2007	136.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M16	Alluvial of El Vallès	AQ-13	08046-0016	2009	389.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M18	El Maresme	AQ-17	08007-0060	2007	22.5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M18	El Maresme	AQ-14	08197-0036	2007	24.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M25	L'Alt Camp	AQ-20	43043-0002	2007	4.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M32	Fluviodeltaic of the Fluvià - Muga	AQ-21	17178-0054	2010	18.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M32	Fluviodeltaic of the Fluvià - Muga	AQ-21	17178-0055	2007	13.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M32	Fluviodeltaic of the Fluvià - Muga	AQ-21	17210-0025	2010	232.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M33	Fluviodeltaic of the Ter	AQ-23	17022-0027	2010	2.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M33	Fluviodeltaic of the Ter	AQ-23	17070-0014	2007	1761.1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M33	Fluviodeltaic of the Ter	AQ-24	17081-0006	2008	0.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M33	Fluviodeltaic of the Ter	AQ-24	17081-0008	2009	3.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M33	Fluviodeltaic of the Ter	AQ-23	17199-0036	2007	80.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M34	Alluvial of l'alta i mitjana Tordera	AQ-25	08082-0019	2008	3.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M34	Alluvial of l'alta i mitjana Tordera	AQ-25	08259-0012	2008	4.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M34	Alluvial of l'alta i mitjana Tordera	AQ-25	17083-0005	2008	0.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M38	Cubela Sant Andreu i Vall Baixa Llobregat	AQ-26	08263-0031	2007	72.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M39	Llobregat Delta	AQ-28	08169-0080	2007	4.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M39	Llobregat Delta	AQ-28	08169-0322	2007	17.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M39	Llobregat Delta	AQ-27	08263-0031	2008	121.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	25211-0001	2010	304.7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M47	Alluvial of the lower Segre	AQ-07	25231-0003	2010	62.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M48	Alluvial of Urgell	AQ-08	25252-0003	2009	273.9	n.a.	83.3	<0.04	n.a.	<0.2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M52	Alluvial of Tordosa	AQ-08	43155-0056	2010	885.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M52	Alluvial of Tordosa	AQ-08	43155-0923	2010	18.9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
M53	Delta of the Ebro	AQ-29	43014-0440	2009	0.4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: not analyzed *mg/L **µS/cm at 20°C ***µg/L (total)

Table SI.3. Multilinear correlations between transformation products and groundwater chemistry variables

Y	log Y = $\alpha_1 \cdot \log[\text{NO}_3] + \alpha_2 \cdot \log[\text{SO}_4] + \alpha_3 \cdot \log[\text{conduct.}] + \alpha_4 \cdot \log[\text{Fe}] + \alpha_5 \cdot \log[\text{Mn}] + \alpha_6 \cdot \log[\text{TOC}] + \delta$						R	F (p<0.05, n=33)	
	α_1	α_2	α_3	α_4	α_5	α_6			δ
DEA	0,463	4,226	-6,495	-0,483	0,008	0,779	11,045	0,727	4,848
DIA	0,062	3,118	-4,992	-1,412	0,372	0,358	9,799	0,496	1,417
DEA/Atrazine	0,063	1,834	-1,946	0,318	-0,473	-0,036	1,855	0,620	2,713
DIA/Simazine	-0,773	1,051	-1,311	-0,010	0,273	0,124	1,935	0,459	1,158

Fig. SI.1.1. Protocol for groundwater sampling. Extracted from: Agència Catalana de l'Aigua - ACA (2005). Available in http://aca-web.gencat.cat/aca/documents/ca/agues_subterrànies/protocol_agues_subterrànies.pdf.

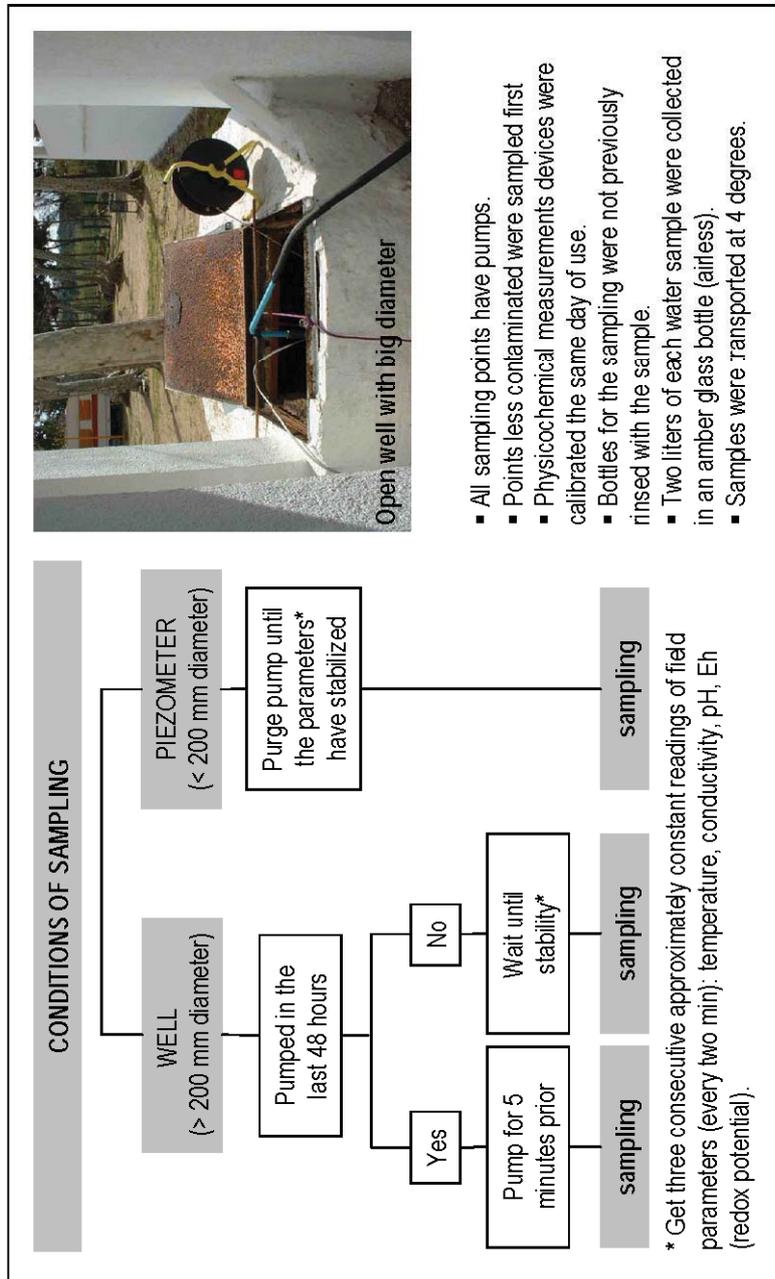


Fig. SI.2. Depth of groundwater sample collection sites.

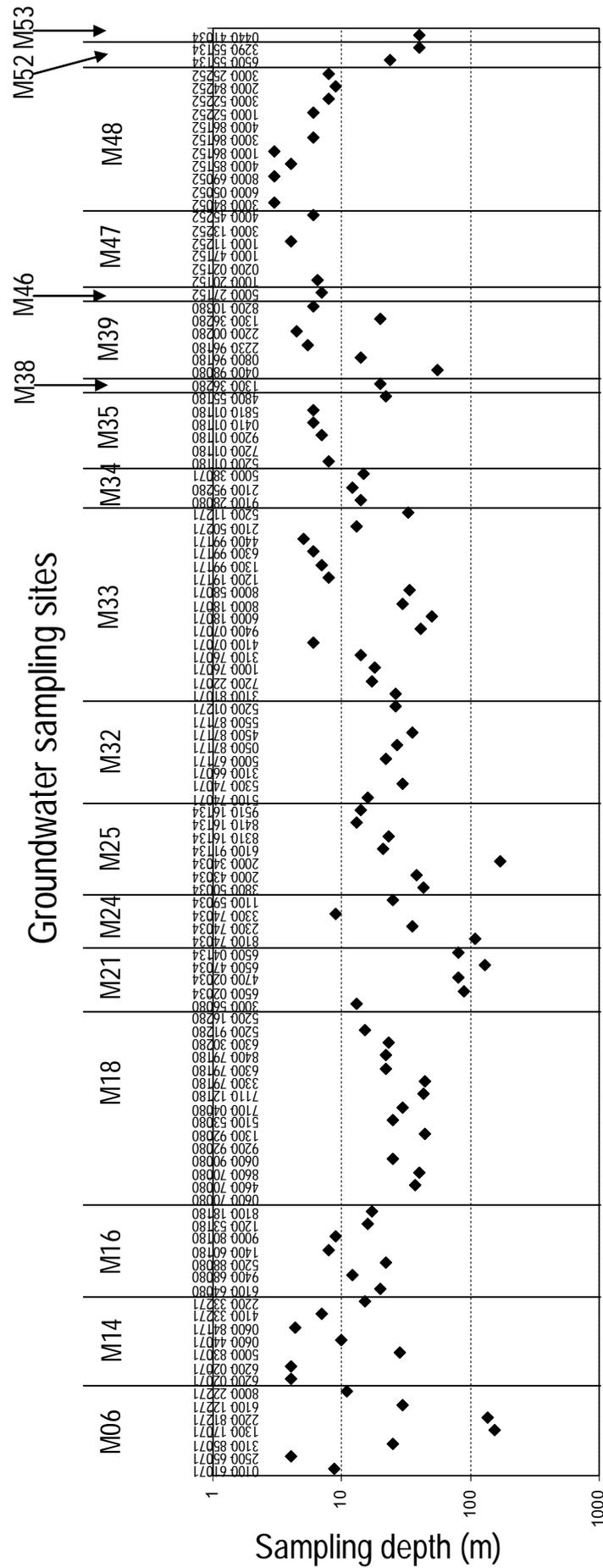


Fig. SI.3. Chromatograms of the first SRM (for quantification) corresponding to the analysis by online SPE LC-MS/MS of a groundwater sample spiked with the analytes at 100 ng/mL: (A) positive electrospray ionization; (B) negative electrospray ionization.

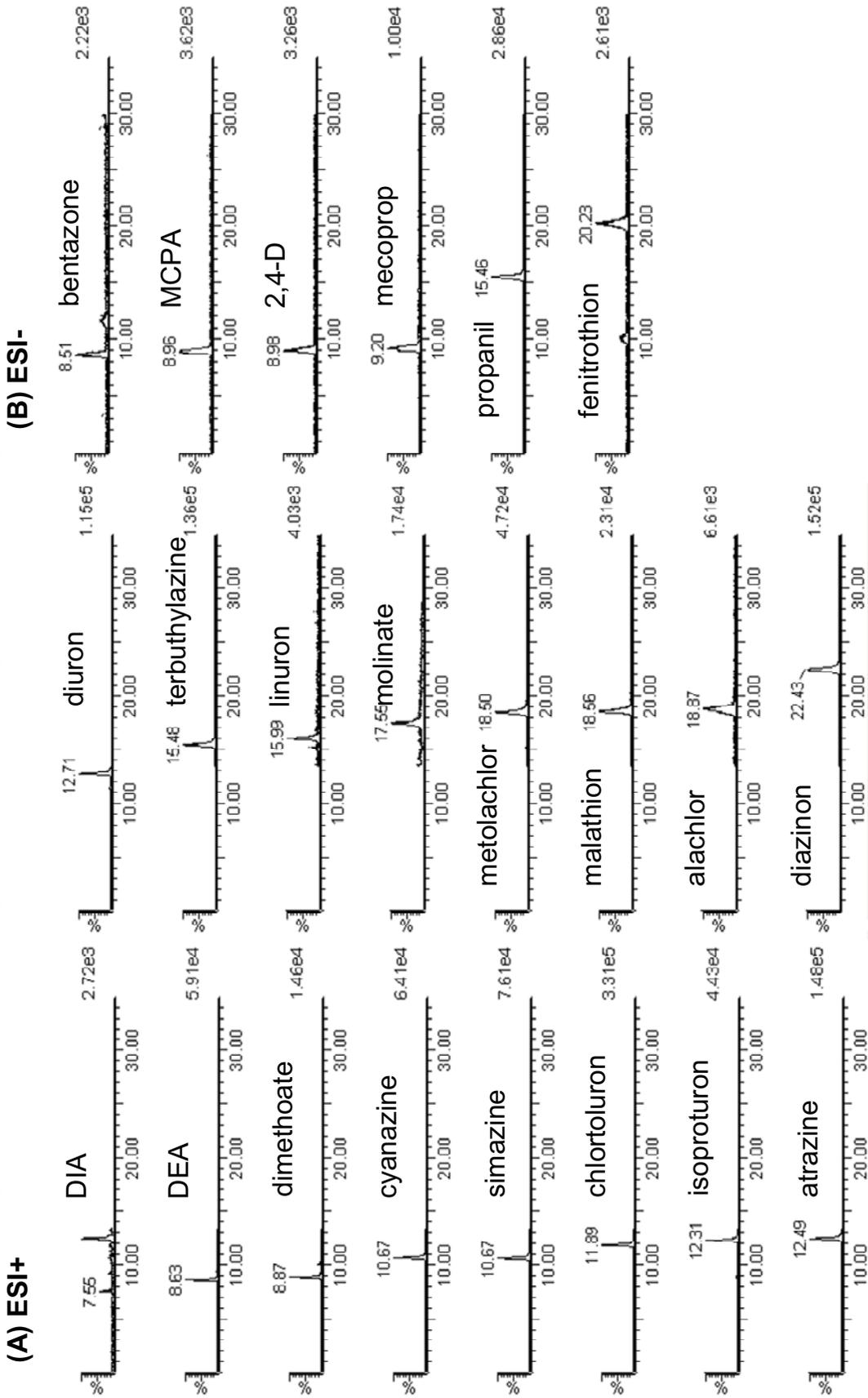


Fig. SI.4. Relative uses (in percentage) of the groundwater bodies' lands. Catalan Water Agency (ACA) – Generalitat de Catalunya; <http://www.gencat.cat/aca/>.

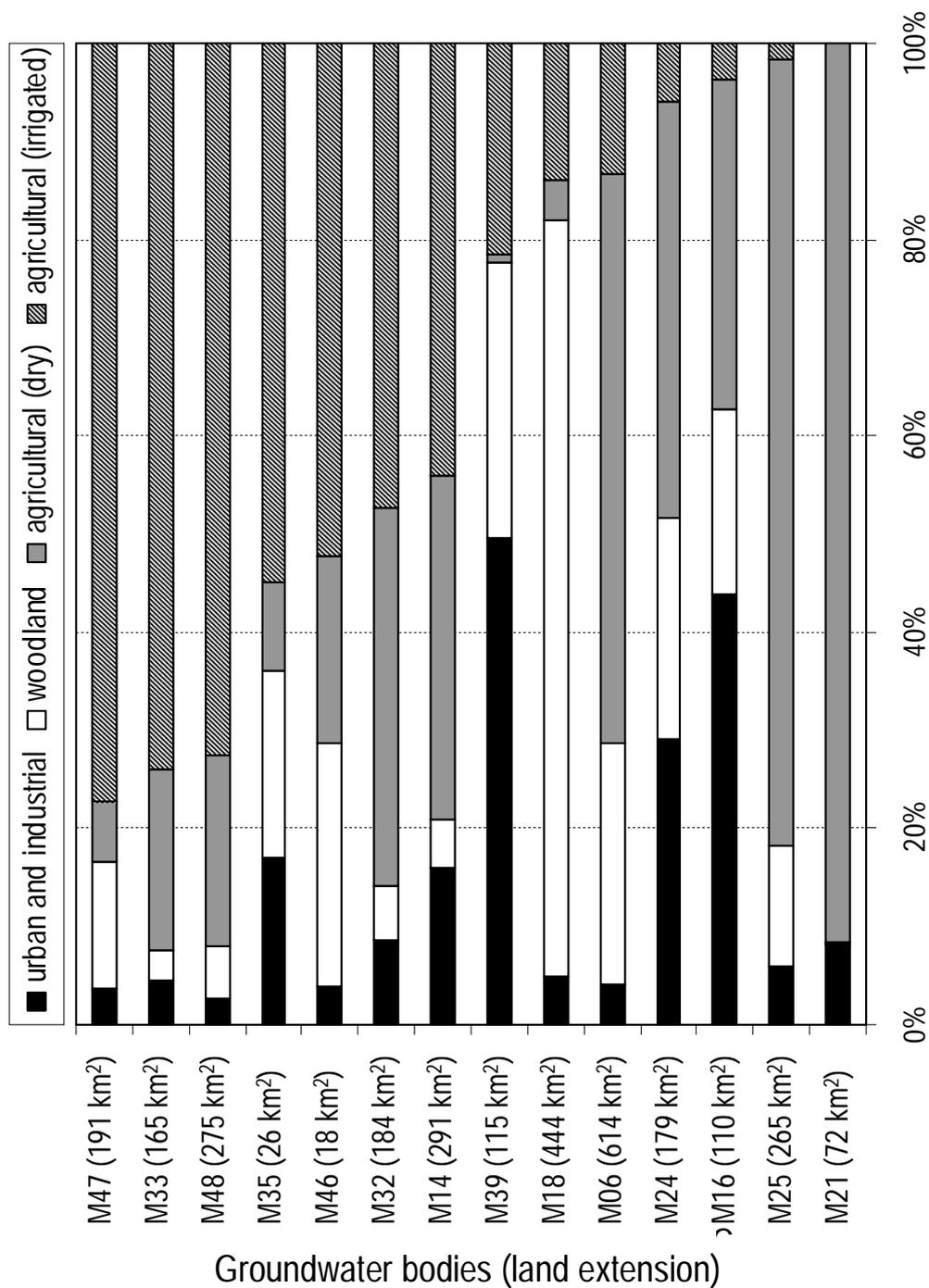


Fig. SI.5. Geographical distribution of different agricultural crops throughout Catalonia in 2008 (Generalitat de Catalunya, 2011).

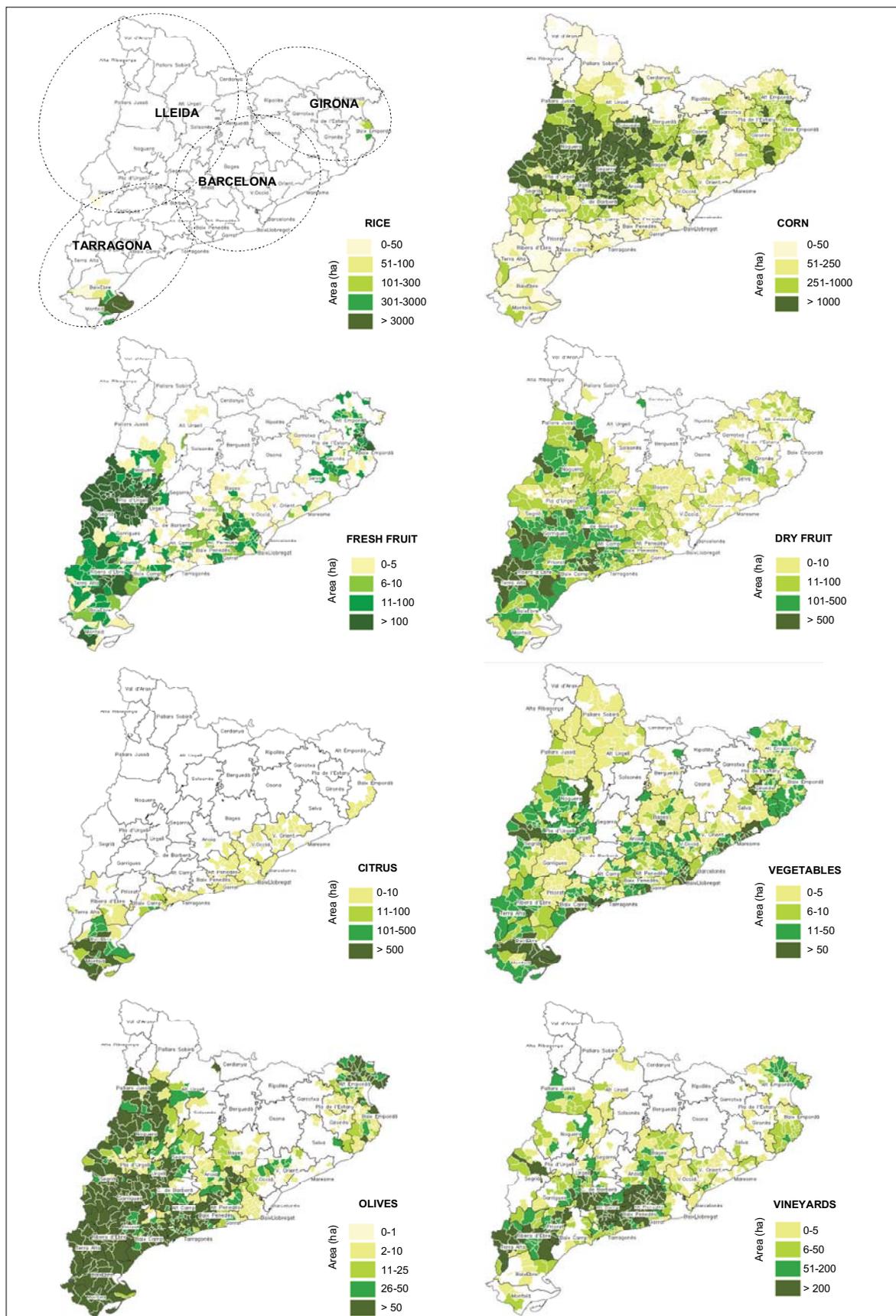


Fig. SI. 6. Principal component analysis results: Loadings for the two three principal components and scores plots for the PC1&PC2, by irrigated zone.

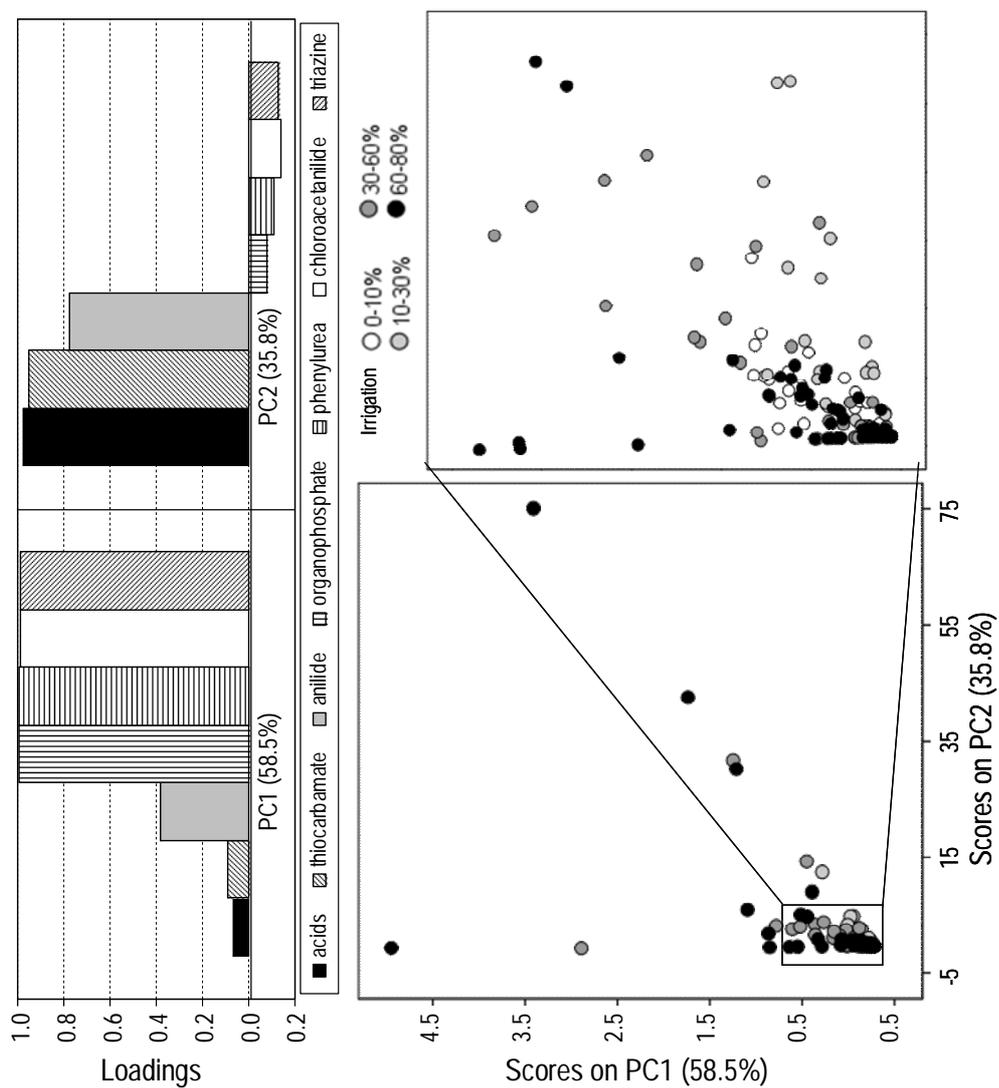


Fig. SI.7. Plot showing the relation between total pesticides and conductivity, by sampling station.

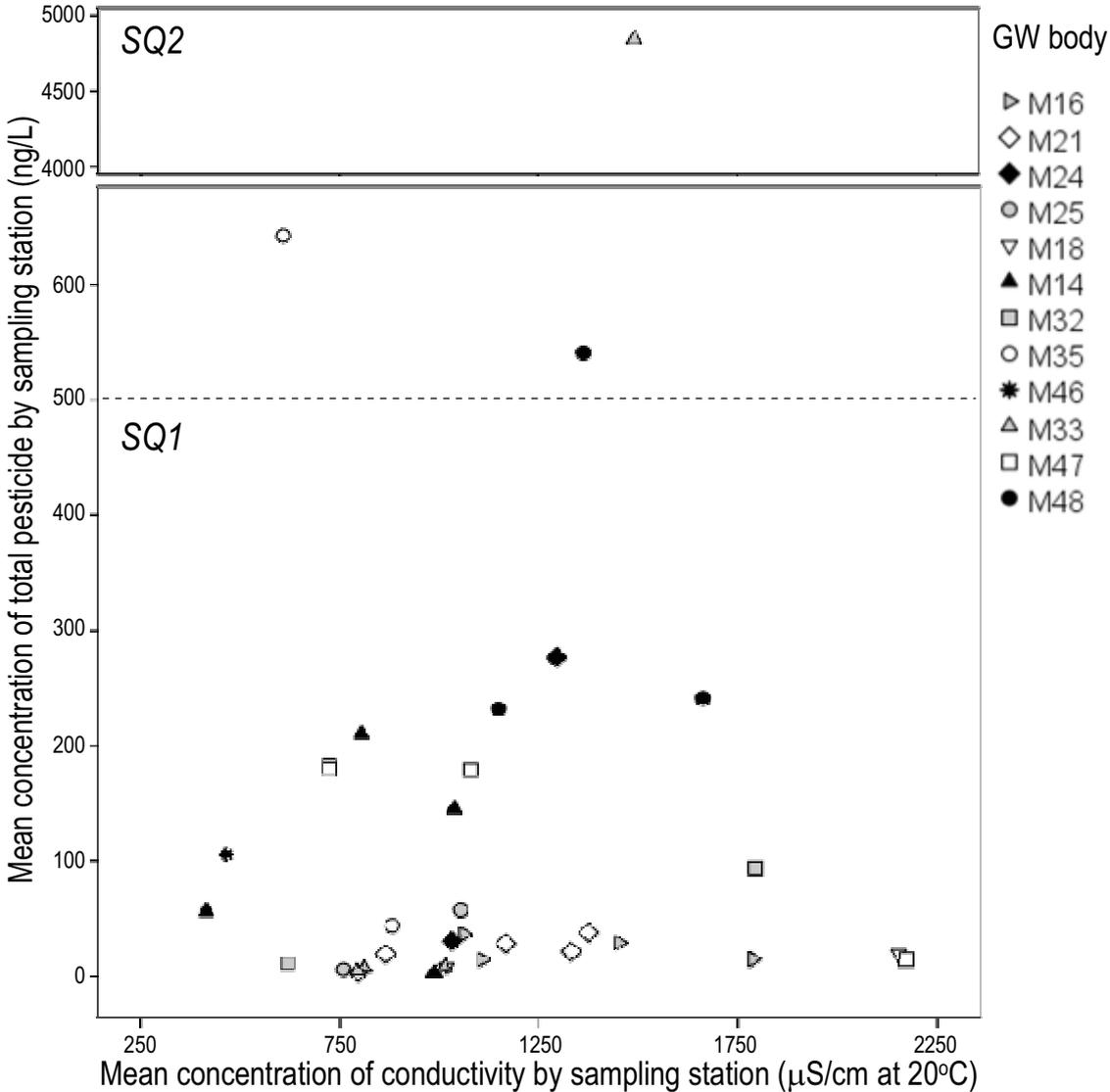


Fig. SI.8. Plot showing the relation between total pesticides and TOC, by sampling station.

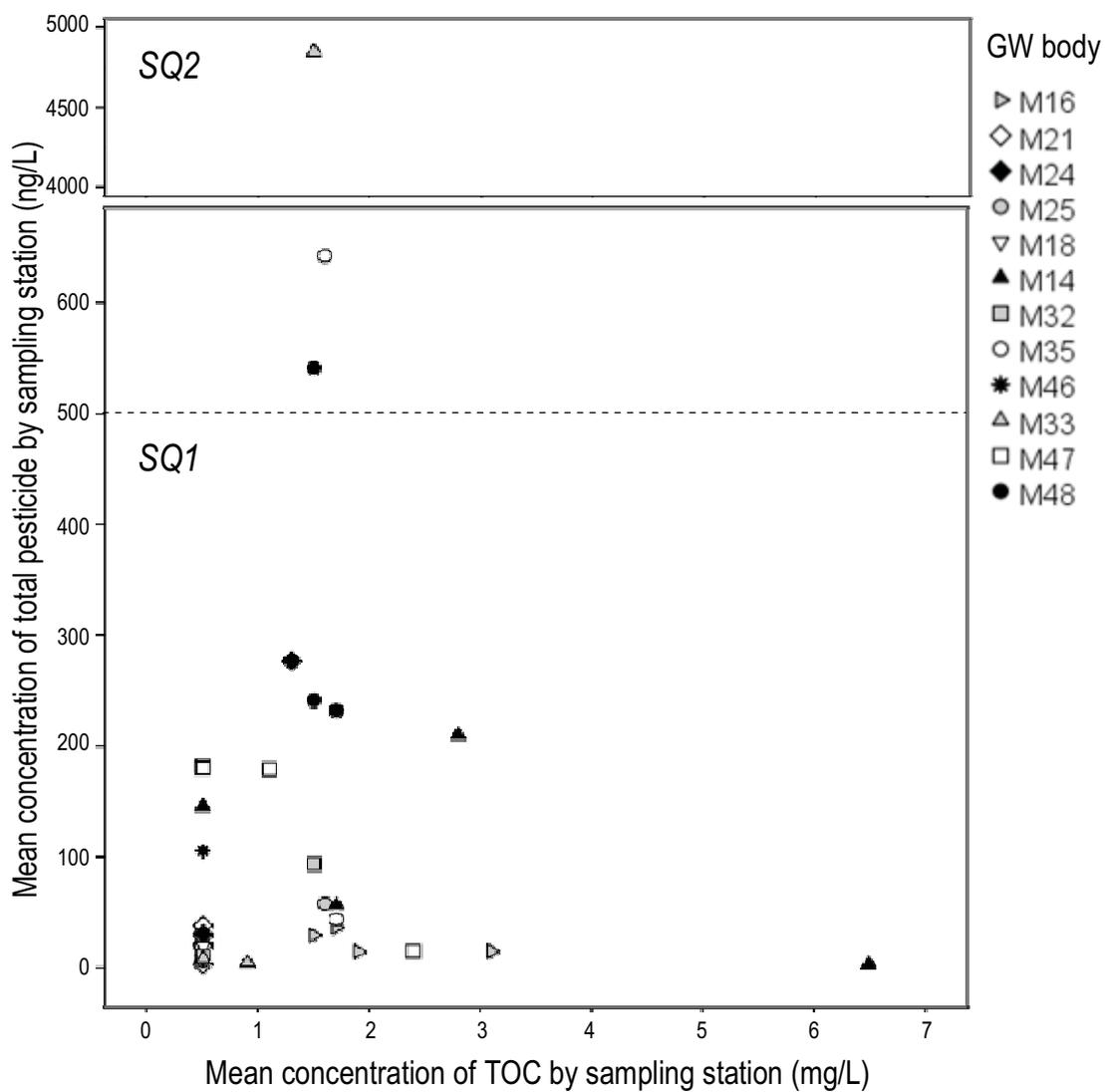


Fig. SI.9. Joint distribution probabilities of DEA (panels a1 to a6) and DIA (panels b1 to b6) with ground water variables NO3, SO4, conductivity, Fe, Mn, TOC. Log transformed variables are used. Axis are scaled on standard deviation units around the mean.

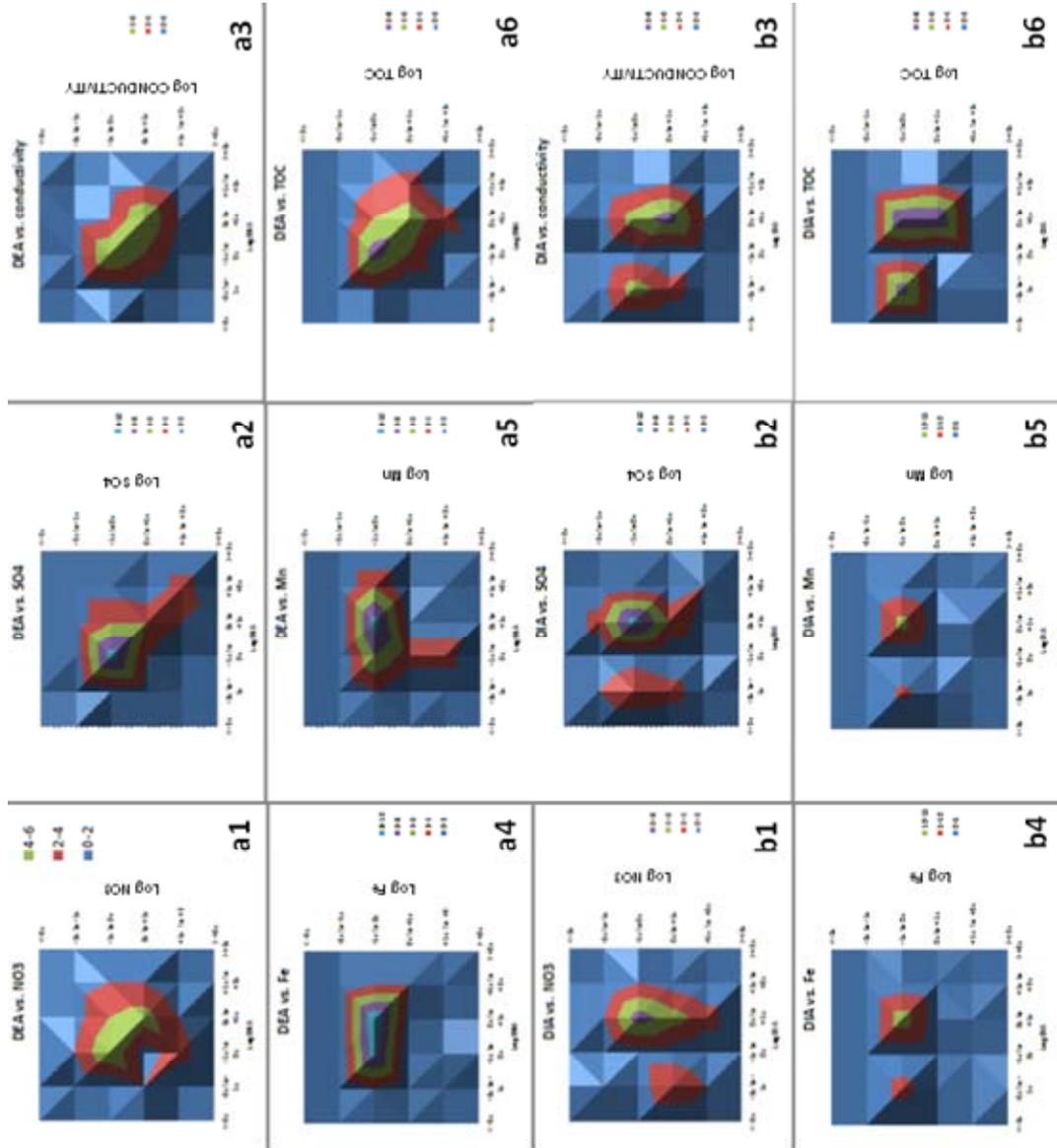
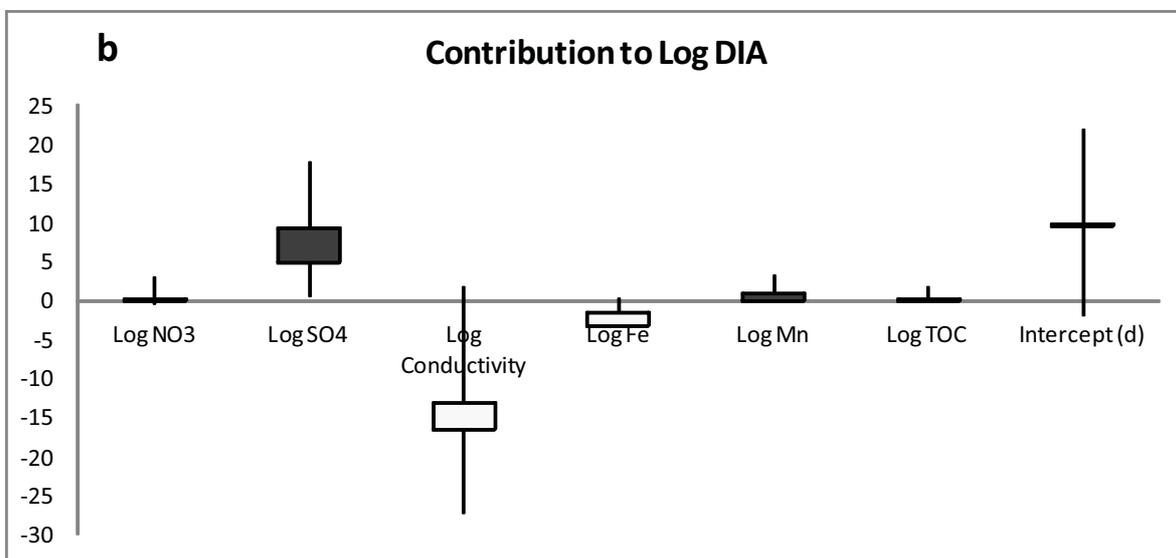
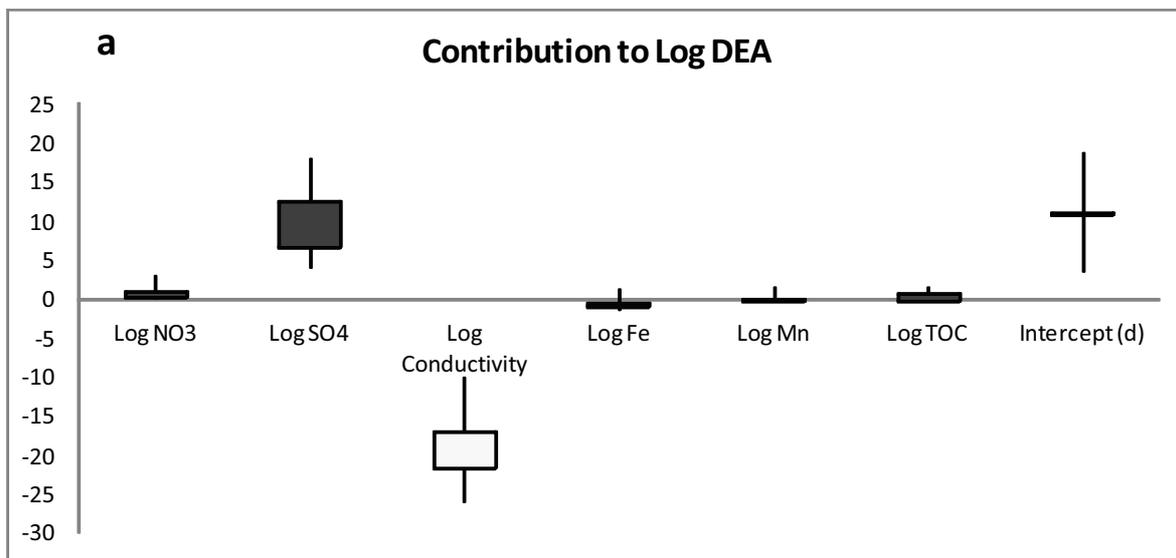


Fig. SI.10. Contribution to Log DEA (panel a) and Log DIA (panel b) of the different explanatory (log transformed) variables NO₃, SO₄, conductivity, Fe, Mn, TOC, according to equations shown in table 5. For each explanatory variable, boxes are comprised between $[\alpha_i \cdot \text{Log } X_{iMAX}]$ and $[\alpha_i \cdot \text{Log } X_{iMIN}]$; the external upper and lower bounds correspond to the $\pm 95\%$ estimates of α_i , $[\alpha_i + \text{Log } X_{iMAX}]$ and $[\alpha_i - \text{Log } X_{iMIN}]$, respectively. The intercept term d is also shown.



4.3.2. Estudio del comportamiento de plaguicidas en procesos de recarga artificial de acuíferos: estudio de campo en San Vicenç dels Horts (tramo bajo/delta del Llobregat)

Trabajo realizado en el marco del proyecto ENSAT (009/RNO8/-01.1)

En colaboración con:

- *Marta Hernández, CEtaqua, Centro Tecnológico del Agua*
- *Cristina Valhondo, Carlos Ayora y Jesús Carrera, del Grup d'Hidrologia Subterrània, Universitat Politècnica de Catalunya*

Introducción

La recarga de acuíferos tiene varios beneficios, entre los que cabe destacar el almacenamiento de agua de buena calidad para la captación de agua potable, el mantenimiento de los acuíferos como barrera para evitar la intrusión marina y para asegurar el caudal ecológico de los ríos y sus ecosistemas. El presente trabajo se engloba dentro del proyecto europeo *Life + ENSAT* (Enhancement of Soil Aquifer Treatment) (009/RNO8/-01.1), cuyo objetivo ya se ha comentado anteriormente en esta memoria (apartado 2.2.3), en el que se estudia el proceso de recarga artificial en la zona de estudio de Sant Vicenç dels Horts.

Más específicamente, el trabajo consistió en evaluar la presencia de 11 microcontaminantes orgánicos (ver apartado 2.2.3), entre ellos, varios plaguicidas (diuron, simazina, hidroxí simazina y deisopropilatrazina) en agua superficial, agua subterránea e intersticial y sedimento durante el proceso de recarga artificial, con el objetivo de evaluar la eficacia en términos de mejora de la eliminación de microcontaminantes emergentes de un sustrato orgánico (o capa reactiva) preparado a base de compost vegetal colocado en la superficie de la balsa de infiltración (Figura 4.3b).

El trabajo llevado a cabo y los principales resultados obtenidos en lo que a la determinación de residuos de plaguicidas se refiere, se describen y comentan en los apartados siguientes.

Estudio de campo: descripción de la zona de estudio y toma de muestras

El sistema de recarga se encuentra en el municipio de Sant Vicenç dels Horts (provincia de Barcelona), a aproximadamente 15 km de la costa mediterránea, en la llanura de inundación en la margen derecha del río Llobregat. Con una profundidad de hasta 27 metros, el acuífero está compuesto por sedimentos aluviales cuaternarios, principalmente grava, arena gruesa y pequeñas fracciones de arcilla. La zona de recarga, formada por una balsa de decantación seguida de una balsa de infiltración, puede alimentarse con agua del río o bien con agua residual regenerada procedente de la EDAR de El Prat. Durante el estudio, el sistema trabajó con agua del río captada 2 km aguas arriba de la primera balsa, transportada por gravedad a través de un tubo de hormigón hasta la balsa de decantación (4000 m²) donde el agua permanece por un tiempo de residencia de 3 días, para que las partículas finas se depositen. Posteriormente, las aguas fluyen por gravedad hacia la balsa de infiltración (5600 m²) atravesando una malla de plástico de 1 cm de poro. Es en esta balsa, construida con una capa superficial (capa reactiva) de compost vegetal mezclado con óxido de hierro y arcilla, que se efectúa el estudio de recarga (Figura 4-3). Pueden

encontrarse más detalles sobre la estructura geoquímica del estudio en Valhondo et al. 2014.



Figura 4 - 3. Fotografías de las balsas de decantación e infiltración durante el proceso de recarga artificial.

El estudio se dividió en 25 campañas (C1-C25). La C1, realizada en octubre de 2010, consistió en un estudio de blanco, para obtener datos de referencia sin recarga. En febrero de 2011 (C2) se inició la recarga del acuífero, pero sin el uso de la capa reactiva. Esta recarga se detuvo para dejar que las aguas subterráneas volvieran nuevamente a sus

condiciones iniciales y en abril de 2011 se tomaron nuevamente muestras de referencia (C3). En mayo se preparó la balsa de infiltración con la capa reactiva y se inició la recarga en junio de 2011 (C4-C25). Las campañas C20 a C25 se iniciaron en julio de 2012 con la finalidad de evaluar el rendimiento de la capa reactiva pasado un año de infiltración.

El análisis de los contaminantes seleccionados se llevó a cabo en aguas del río Llobregat (RIO), en aguas decantadas y listas para su infiltración (INF), en aguas provenientes de cápsulas de succión (CA, CB, CC) localizadas en la parte no saturada de la zona de recarga (entre el agua superficial y el agua subterránea a 1, 2 y 5 m de profundidad, respectivamente), en aguas subterráneas (BSV) provenientes de un pozo de 350 mm de diámetro (BSV-7) y de 9 piezómetros localizados a distinta profundidad y distancia de la zona de recarga. La Figura 4-4 muestra el perfil vertical y el horizontal de la zona de recarga y toma de muestras. Además, también se analizaron 6 muestras de la capa reactiva extraídas directamente de la balsa de infiltración y otras provenientes de ensayos en laboratorio.

En total se analizaron 289 muestras, tomadas entre los días 5 de octubre de 2010 y 5 de agosto de 2012, las cuales se dividen en:

- 176 muestras de agua subterránea (BSV)
- 37 muestras de agua superficial (RIO + INF)
- 30 muestras de agua de cápsulas de succión (CA, CB, CC)
- 47 muestras de ensayos (34 muestras de agua + 12 muestras de capa reactiva).

La lista completa de ellas se muestra en la Tabla 4-1.

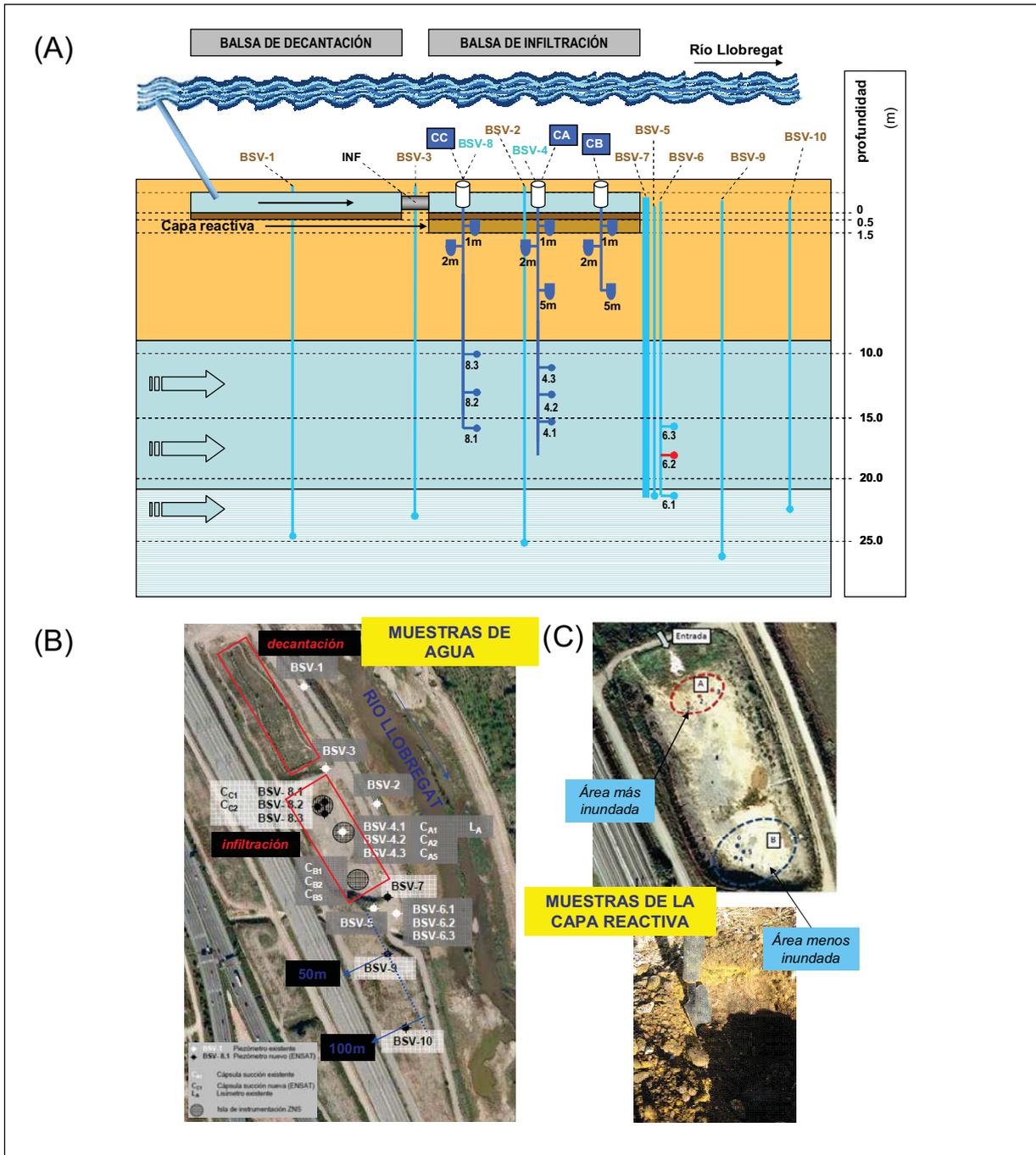


Figura 4 - 4. Detalles de los puntos de toma de muestra: (A) perfil vertical; (B) perfil horizontal; (C) muestras de capa reactiva.

Tabla 4 - 1. Descripción de las 289 muestras analizadas.

TOMA DE MUESTRA		INFILTRACIÓN Con CR															TOTAL															
PUNTOS	TIPO DE AGUA	BLANCO	BLANCO	INFILTR sin CR	BLANCO	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11		C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	TOTAL
BSV-1	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	21		
BSV-2	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	22	
BSV-3	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	4	
BSV-4.1	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2	
BSV-4.2	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2	
BSV-4.3	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2	
BSV-5	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	20	
BSV-6.1	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2	
BSV-6.3	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2	
BSV-7	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	3	
BSV-8.1	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	17	
BSV-8.2	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	17	
BSV-8.3	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	19	
BSV-9	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	19	
BSV-10	subterránea			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	24	
CA-2	infiltrada			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	7	
CB-5	infiltrada			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	5	
CC-1	infiltrada			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	8	
CC-2	infiltrada			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	10	
RÍO	superficial			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	2	
INF	superficial			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	35	
TEST-ADSOR	agua	13X																													13	
TEST-ADSOR	sedimento	9X																													9	
TEST-ADSOR 2	agua	21X																													21	
TEST-ADSOR 2	sedimento	3X																													3	
TOTAL																															289	

ADSOR: muestras de los estudios de adsorción; BSV: código de piezómetro; C(A,B,C): agua intersticial; C1-25: número de la campaña; CR: capa reactiva; INF: agua de la balsa de decantación en el momento de la entrada a la balsa de infiltración.

Ensayos de laboratorio

Aparte de las muestras de campo, también se analizaron aguas y sedimentos procedentes de estudios de adsorción llevados a cabo en el laboratorio.

Primer ensayo: adsorción a los materiales utilizados como materia prima para la preparación de la capa reactiva

El objetivo de este estudio fue comprobar la eficacia de la capa reactiva en su conjunto y la de cada uno de sus tres componentes (óxido de hierro, arcilla y compost) en cuanto a su capacidad para adsorber los analitos objeto de estudio. Para ello, se mezclaron cantidades variables (1, 2, 5 y 10 g) de cada uno de estos materiales con agua del río (250 mL) dopada con los analitos a una concentración de 1000 ng/L, según se muestra en la Tabla 4-2. Se dejaron durante 24 horas bajo constante agitación a temperatura ambiente y, al cabo de este tiempo, las muestras se filtraron a través de filtros de nylon de 0,45 µm y se enviaron inmediatamente al laboratorio para su análisis. La Figura 4-5 muestra el aspecto de las muestras y de los discos utilizados para su filtración.

Tabla 4 - 2. Composición de las muestras del 1^{er} ensayo de adsorción.

No	Muestra	Arcilla (g/L)	Óxido hierro (g/L)	Compost (g/L)	Analitos (ng/L)
1	BLANCO (250 mL agua)	--	--	--	1000
2	Arcilla 1 g / 250 mL agua	4	--	--	1000
3	Arcilla 2 g / 250 mL agua	8	--	--	1000
4	Arcilla 5 g / 250 mL agua	20	--	--	1000
5	Arcilla 10 g / 250 mL agua	40	--	--	1000
6	Hierro 1 g / 250 mL agua	--	4	--	1000
7	Hierro 2 g / 250 mL agua	--	8	--	1000
8	Hierro 5 g / 250 mL agua	--	20	--	1000
9	Hierro 10 g / 250 mL agua	--	40	--	1000
10	Compost 1 g / 250 mL agua	--	--	4	1000
11	Compost 2 g / 250 mL agua	--	--	8	1000
12	Compost 5 g / 250 mL agua	--	--	20	1000
13	Compost 10 g / 250 mL agua	--	--	40	1000

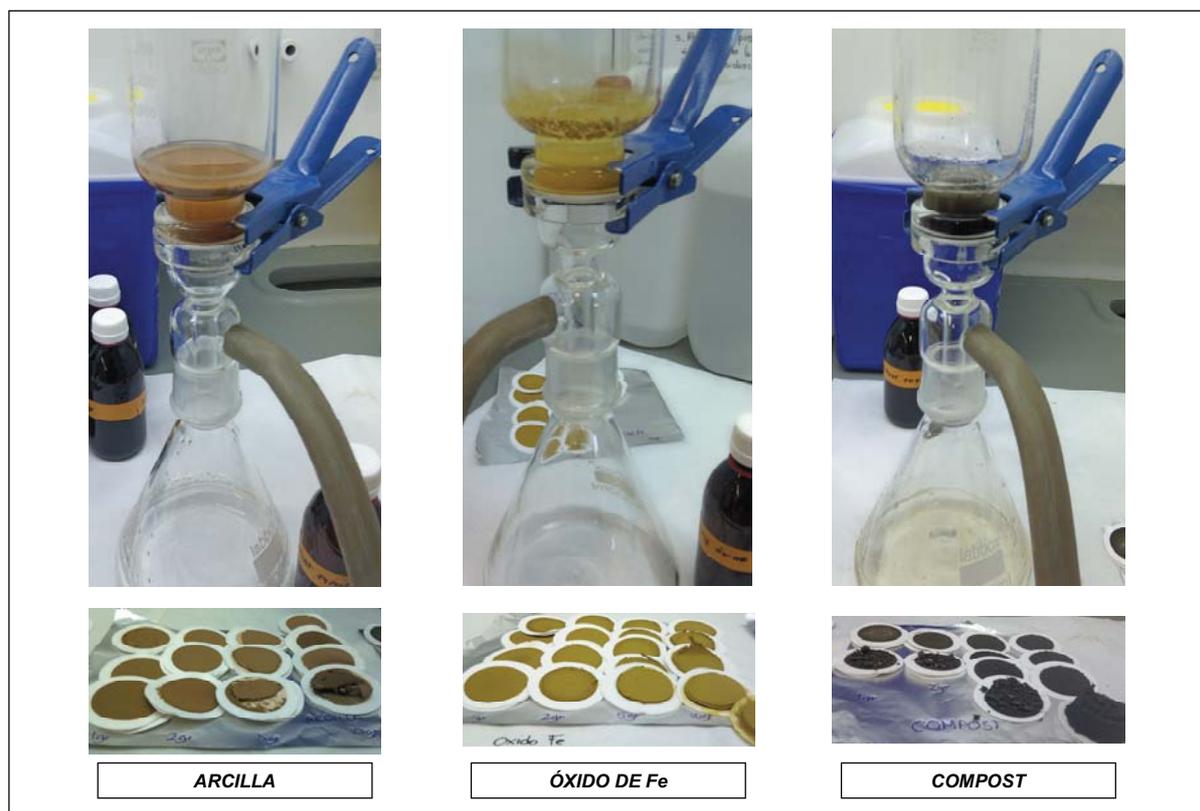


Figura 4 - 5. Filtración de las muestras del ensayo de adsorción.

Segundo ensayo: adsorción - desorción a compost y capa reactiva

Como continuación de los ensayos anteriores se realizó un segundo ensayo con compost fresco y con capa reactiva en las condiciones que figuran en la Tabla 4-3, a fin de estudiar en más detalle el efecto de la composición de la capa. En este caso, el agua del río (250 mL) se dopó con los analitos a una concentración de 100 ng/L. Las muestras No. 11 y 12 presentan la misma composición de la muestra No. 1, sin embargo se mantuvieron en botellas PET (politereftalato de etileno) en constante agitación, a temperatura ambiente por 24h, al igual que el resto de las muestras, para estudiar la adsorción y/o degradación de los analitos sin la presencia del compost o de la capa reactiva. La filtración de todas las muestras se llevó a cabo al igual que en el primer ensayo.

Para ambos ensayos, las muestras de agua de río se recogieron en botellas de PET (aproximadamente 260 mL) y una vez en el laboratorio se filtraron a través de filtros de 0,45 μm . Las muestras sólidas se congelaron inmediatamente después de su toma y seguidamente se liofilizaron y tamizaron ($<125 \mu\text{m}$), conservándolas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

Tabla 4 - 3. Composición de las muestras del 2º ensayo de adsorción.

No	Muestra	Capa reactiva (g/L)	Compost (g/L)	Analitos (ng/L)
1	REFERENCIA (250 mL agua)	---	---	100
2	Compost 0,25 g / 250 mL agua	---	1	100
3	Compost 1,25 g / 250 mL agua	---	5	100
4	Compost 2,5 g / 250 mL agua	---	10	100
5	Compost 3,5 g / 250 mL agua	---	14	100
6	Compost 6,0 g / 250 mL agua	---	24	100
7	Compost 8,0 g / 250 mL agua	---	32	100
8	Compost 10,0 g / 250 mL agua	---	40	100
9	Compost 12,0 g / 250 mL agua	---	48	100
10	Compost 15,0 g / 250 mL agua	---	60	100
11	Adsorción a botella 1 (250 mL agua)	---	---	100
12	Adsorción a botella 2 (250 mL agua)	---	---	100
13	Capa reactiva 0,25 g / 250 mL agua	1	---	100
14	Capa reactiva 1,25 g / 250 mL agua	5	---	100
15	Capa reactiva 2,5 g / 250 mL agua	10	---	100
16	Capa reactiva 3,5 g / 250 mL agua	14	---	100
17	Capa reactiva 6,0 g / 250 mL agua	24	---	100
18	Capa reactiva 8,0 g / 250 mL agua	32	---	100
19	Capa reactiva 10,0 g / 250 mL agua	40	---	100
20	Capa reactiva 12,0 g / 250 mL agua	48	---	100
21	Capa reactiva 15,0 g / 250 mL agua	60	---	100

Análisis

Estas muestras se analizaron siguiendo los procedimientos descritos en el Capítulo 2 (apartado 2.2.3) de la presente memoria, los cuales, brevemente, consisten en la extracción de las muestras de agua mediante la técnica de SPE online, y de las muestras sólidas mediante la técnica de PLE seguida de purificación mediante SPE, realizándose el análisis final en ambos casos mediante LC-MS/MS.

Resultados y discusión

Estudios de campo

La Tabla 4-4 muestra el análisis descriptivo de los resultados obtenidos para los diferentes analitos en el estudio de campo, distinguiendo entre agua superficial, agua intersticial y agua subterránea.

Los resultados muestran una pre-existencia de DIA en las muestras de agua subterránea, y la presencia del resto de compuestos tanto en aguas de recarga como en aguas subterráneas. Los niveles de diurón y simazina-OH no varían mucho a lo largo del sistema (agua de recarga → agua intersticial → agua subterránea), a diferencia de la simazina, que presenta niveles más altos en la parte no saturada del sistema.

La Figura 4-6 muestra el perfil de concentraciones (ng/L) de cada uno de los 4 plaguicidas al entrar en la balsa de infiltración (INF) y en el agua subterránea / intersticial (parte inferior) a lo largo de las distintas campañas, mientras que la Figura 4-7 presenta boxplots de las concentraciones de los distintos analitos encontradas en las campañas de referencia (C1 y C3), en la campaña con recarga sin capa reactiva (C2) y durante la recarga con capa reactiva (C4-C25).

Tabla 4 - 4. Análisis descriptivo de los resultados por analito y zona de muestreo.

Analito	Frecuencia de detección (%)	Promedio (ng/L)	± SD	Máximo (ng/L)
Resultados en muestras de agua superficial (INF: 36 muestras)				
diurón	86	15,0	7,0	40,2
simazina	31	5,9	1,6	8,7
simazina -OH	58	16,3	3,6	23,5
DIA	0	---	---	---
Resultados en muestras de agua intersticial (CA, CB, CC: 30 muestras)				
diurón	53	9,1	5,4	27,9
simazina	13	33,4	54,0	114,3
simazina -OH	77	16,6	4,0	24,5
DIA	0	---	---	---
Resultados en muestras de agua subterránea (BSV: 176 muestras)				
diurón	73	11,2	4,0	28,1
simazina	52	9,0	11,9	93,9
simazina -OH	82	13,0	13,9	162,6
DIA	9	21,4	7,5	42,4

SD: Desviación estándar (del inglés *Standard Deviation*)

Debido a los pocos datos obtenidos en el análisis de la DIA, no se incluyó esta triazina en el análisis de datos. Los niveles de simazina-OH fueron muy irregulares, principalmente al inicio del estudio, donde el análisis de las muestras de agua

subterránea/intersticial de la campaña de referencia C1 dio niveles más altos que durante el resto del estudio, lo cual hizo difícil su análisis. Sin embargo, diurón y simazina presentaron resultados evaluables. A pesar de no presentar grandes cambios de concentración durante todo el estudio (ver Figura 4-6), el diurón no pareció verse muy afectado por la recarga, al presentar mínimas variaciones de concentración en aguas subterráneas con respecto al control (BSV-1) en tan sólo dos puntos: el BSV-2, uno de los puntos más cercanos a la balsa de infiltración y el punto BSV-8.3, localizado en la propia balsa de infiltración y a poca distancia de la zona no saturada, a diferencia del punto BSV-8.1, situado en el mismo lugar, pero en aguas más profundas (ver Figura 4-7). En los demás puntos (no se muestran los resultados) sólo se evidenció un pequeño proceso de dilución. Este plaguicida es conocido por ser altamente persistente, lo que lo lleva a ser bastante estable en aguas neutras y tender a adsorberse a sólidos suspendidos y a sedimentos, a diferencia de lo que ocurre con la simazina.

En el caso de la simazina, los cambios fueron más evidentes. En el punto BSV-2 se observa claramente la contribución del agua de recarga sin capa reactiva a los niveles de simazina en las aguas subterráneas, así como los niveles nuevamente bajos de esta triazina tras el uso de la capa reactiva. Este mismo efecto se observa en el punto BSV-8.3, pero en menor proporción. Los demás puntos también se evaluaron, pero no se vieron cambios significativos. Se trata de una triazina mucho más reactiva que el diurón.

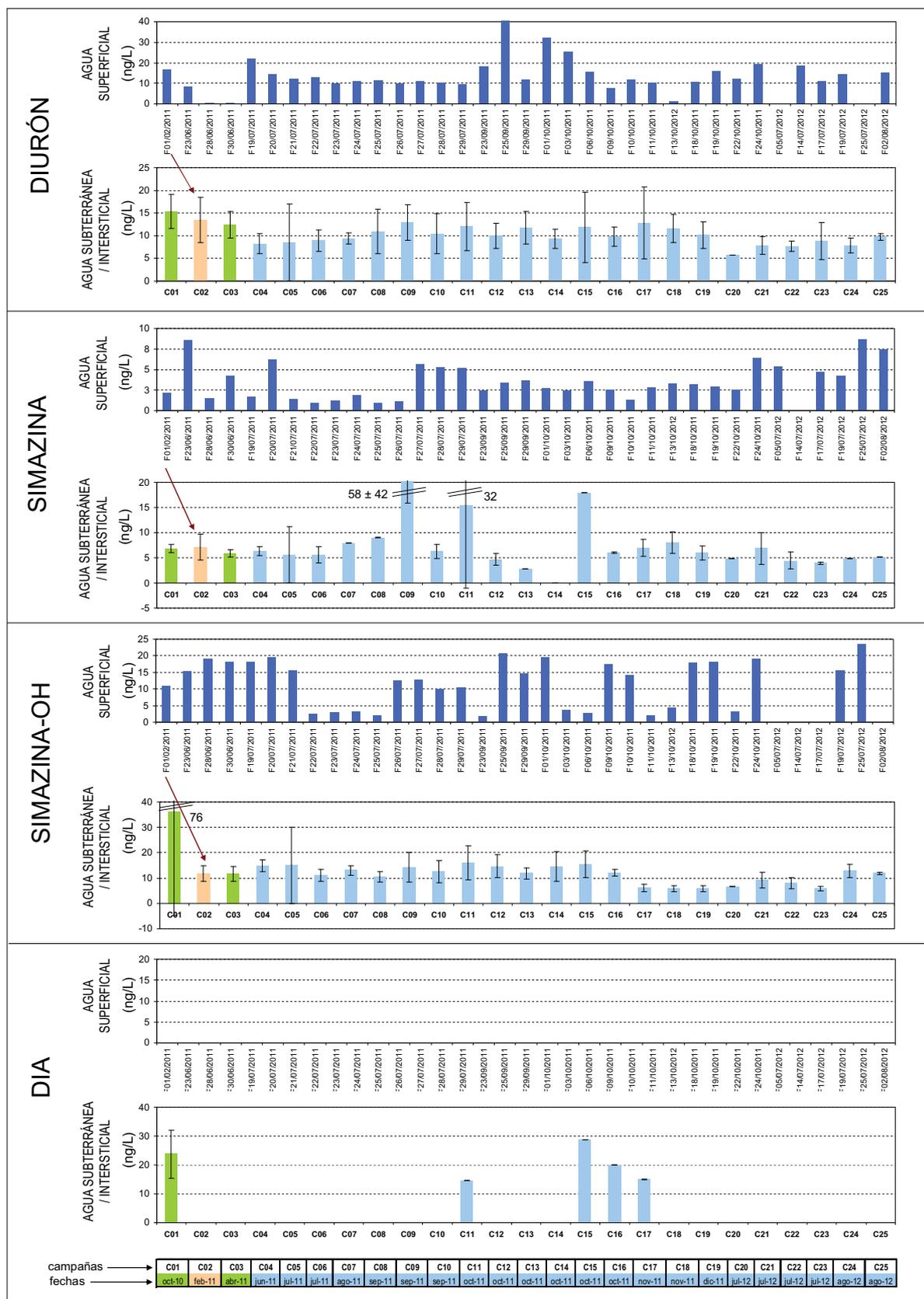


Figura 4 - 6. Perfil de concentraciones (ng/L) de los 4 plaguicidas al entrar en la balsa de infiltración (INF) y en el agua subterránea / intersticial (parte inferior) a lo largo de las distintas campañas.

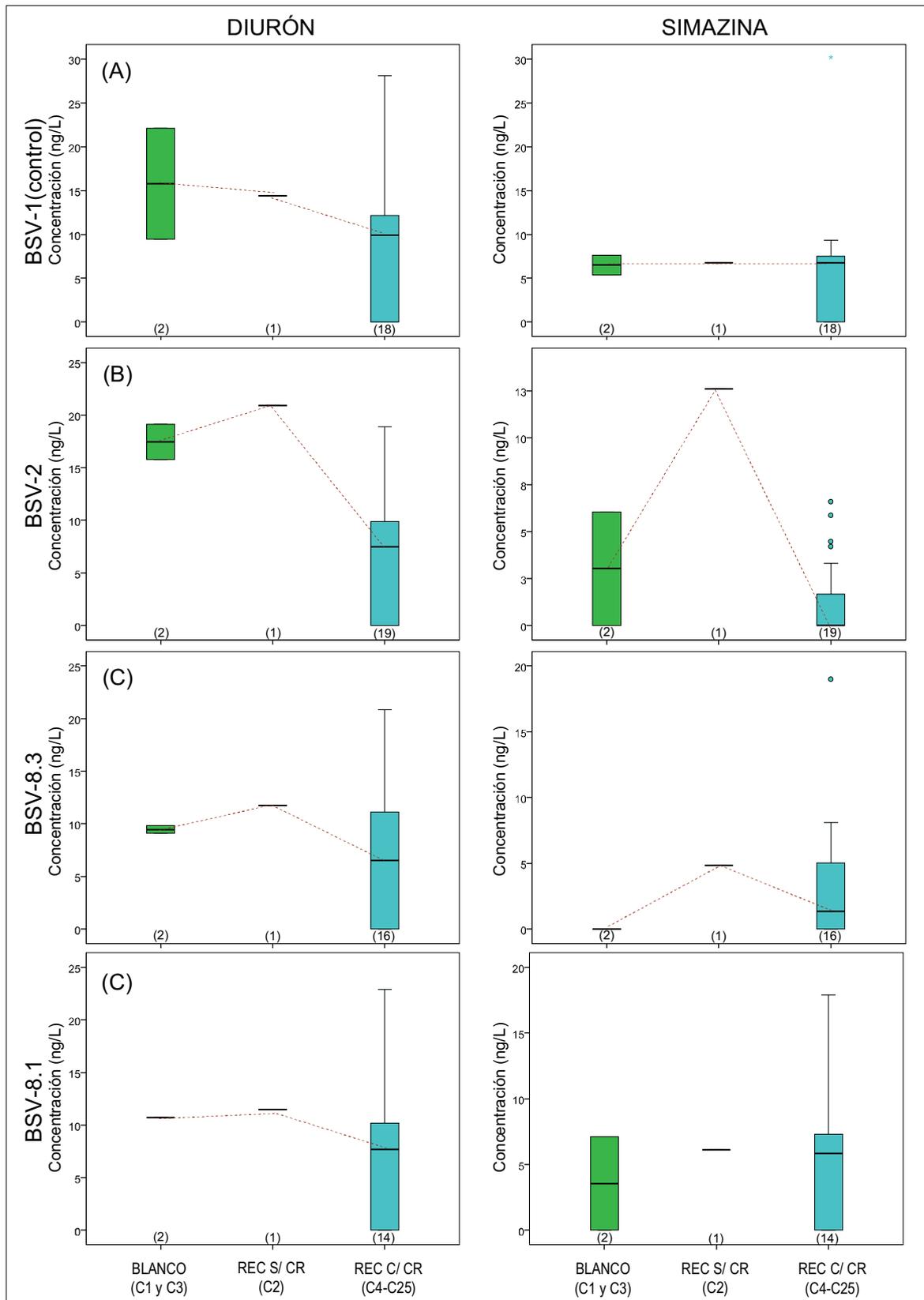


Figura 4 - 7. Concentraciones de diurón y de simazina (media \pm desviación estándar) encontradas en las campañas de referencia (BLANCO, C1 y C3), en la campaña de recarga sin capa reactiva (C2) y durante todas las campañas de recarga con capa reactiva (C4-C25). Entre paréntesis: número de muestras analizadas en cada caso.

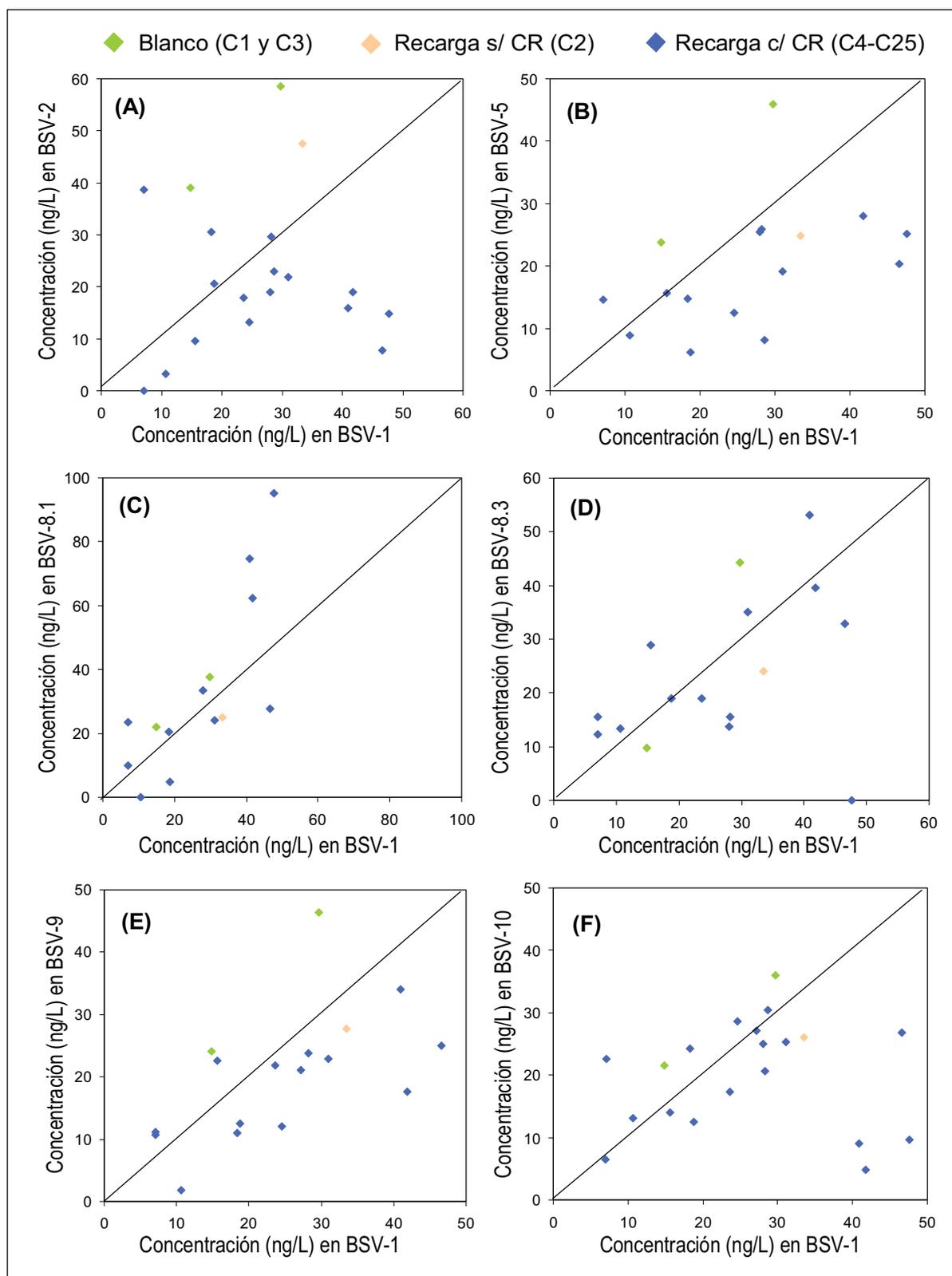


Figura 4 - 8. Estudio de correlación por tipo de campaña (con o si capa reactiva) entre el punto de agua subterránea de referencia (BSV-1) y los demás puntos de agua subterránea que se han muestreado de forma regular: (A) BSV-2; (B) BSV-5; (C) BSV-8.1; (D) BSV-8.3; (E) BSV-9; (F) BSV-10.

Finalmente, la Figura 4-8 muestra un estudio de correlación entre el punto de agua subterránea de referencia (BSV-1), situado aguas arriba de la balsa de infiltración, y los demás puntos de agua subterránea que se muestrearon de forma regular (BSV-2, 5, 8.1, 8.3, 9, 10), con la finalidad de verificar si se pueden asociar o no los cambios de concentración detectados en los diferentes puntos de agua subterránea a la recarga artificial. Los gráficos indican que, en la mayoría de los casos, las concentraciones iniciales (C1 y C3) de plaguicidas totales en los respectivos puntos de agua subterránea eran superiores a los detectados en el punto de referencia (BSV-1). Sin embargo, al iniciar la recarga, estas concentraciones se volvieron inferiores a las encontradas en el punto de referencia, probablemente a causa del proceso de dilución. De todas formas, el caso en el cual se observa un efecto mayor de la recarga es el del punto BSV-2, donde al iniciar la recarga, las concentraciones de plaguicidas continuaron por encima de las encontradas en el punto de referencia y sólo después del uso de la capa reactiva es que tales concentraciones fueron disminuyendo, hasta alcanzar niveles por debajo de los detectados en BSV-1. Por la localización geográfica del punto BSV-2, estos últimos resultados indicarían que el agua que ha pasado por el sistema de recarga presenta una calidad química mejor que el agua subterránea que se encuentra justo debajo del lecho del río, la cual, durante el proceso de recarga se vería desplazada por el agua infiltrada hacia el cauce del río (ver Figura 4-4), en donde, por otro lado, también puede darse infiltración natural o inducida por escarificación del fondo del río.

Ensayos de laboratorio

La Figura 4-9 muestra los resultados obtenidos para los distintos plaguicidas en la primera de las condiciones estudiadas en el primer ensayo de laboratorio (muestra 1, ensayo No. 1 Tabla 4-2), con el fin de evaluar si existe o no degradación y/o adsorción de los analitos a la botella PET y/o a la materia en suspensión presente en el agua del río. Sabiendo que la concentración inicial de los analitos era de 1000 ng/L, queda en evidencia una pérdida significativa del diurón y de la deisopropilatrizona, y en bastante menor medida de la simazina y de su producto de transformación, de la fase acuosa, tras haber permanecido 24 horas en contacto con el agua del río y con el recipiente de PET en constante agitación a temperatura ambiente.

Tomando los resultados anteriores como concentraciones iniciales (100%), en el primer estudio de adsorción (Tabla 4-2) la Figura 4-10a muestra que ni el hierro ni la arcilla tienen efecto sobre la concentración de los analitos en la fase acuosa, mientras que el compost sí reduce claramente la concentración de todos ellos y, además, de forma proporcional a la cantidad de materia adicionada, siendo la hidroxisimazina y el diurón los

analitos más afectados.

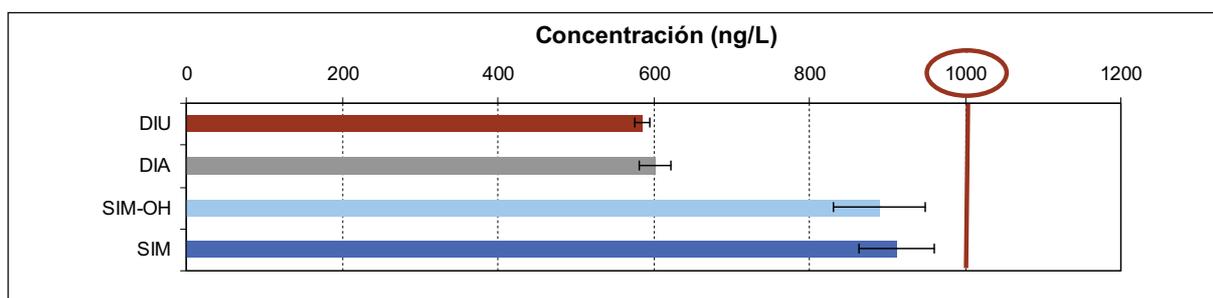


Figura 4 - 9. Primer ensayo de adsorción: concentración de los analitos en la muestra No. 1 (BLANCO) correspondiente a agua de río dopada con los compuestos a 1000 ng/L.

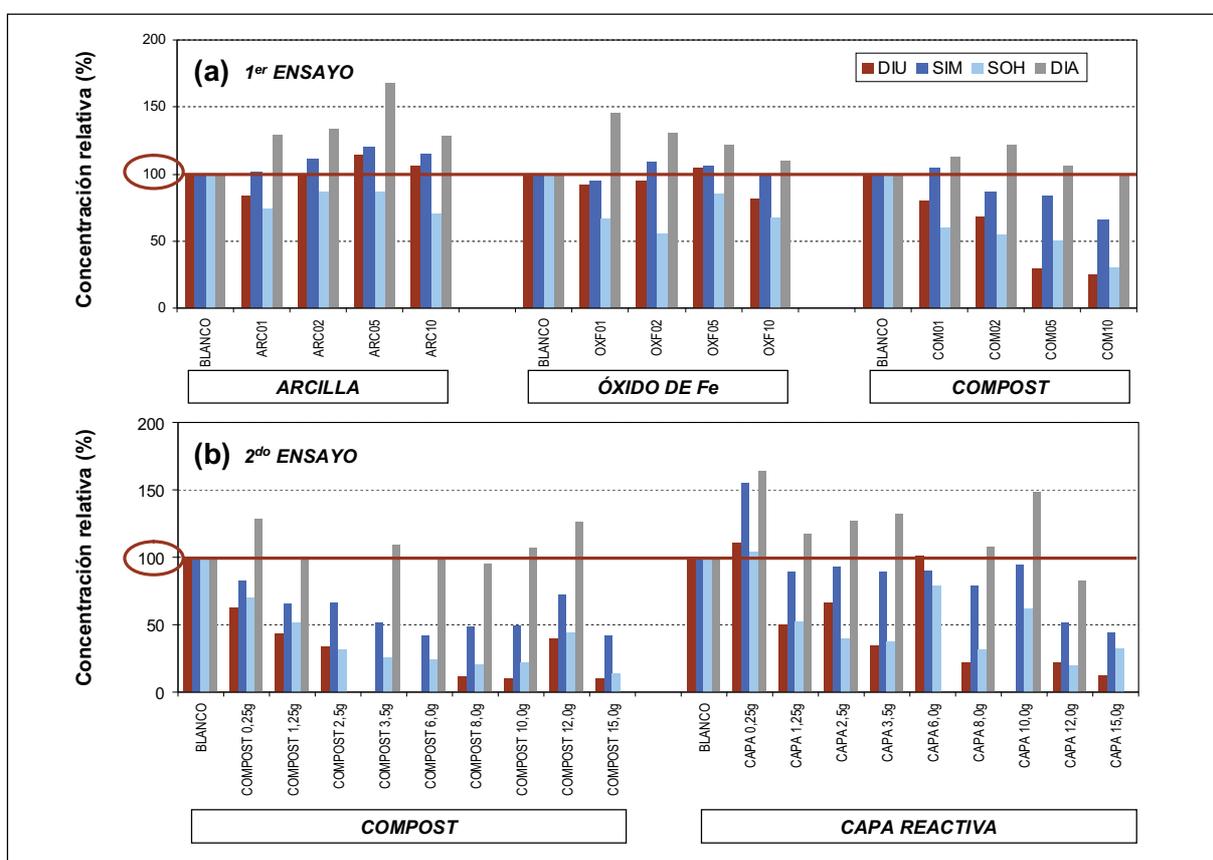


Figura 4 - 10. Resultados de los ensayos de adsorción. Concentración de los analitos en los ensayos con (a) arcilla, hierro y compost (1^{er} ensayo), y con (b) compost fresco y capa reactiva (2^o ensayo).

Por lo que respecta al segundo ensayo de laboratorio comentar que, antes del mismo, se analizaron 3 muestras de compost fresco y 6 muestras de capa reactiva retirada de la balsa de infiltración para su uso en los ensayos, y que ninguna de ellas mostró cantidades detectables de ninguno de los analitos. La Figura 4-10b muestra los resultados

obtenidos en este segundo ensayo en relación con los blancos preparados y analizados en cada caso (los cuales indicaron, a su vez, una adsorción insignificante de los compuestos a las botellas de PET). En la figura se observa claramente que el aumento de la cantidad de compost fresco provoca un aumento en la adsorción / degradación de los analitos. Este comportamiento sucede también, pero en menor medida, en los ensayos con capa reactiva. Se verifica también que la capa reactiva tiene menor poder de adsorción / degradación que el compost fresco.

4.4. Estudio de la presencia de plaguicidas en sedimentos

Tal y como se comenta en la publicación #1, los sedimentos integran una serie de procesos biológicos y físicos-químicos que ayudan a entender mejor el comportamiento y la persistencia de los contaminantes en este medio.

La afinidad de los contaminantes menos polares (por ejemplo, el clorpirifos) por el material particulado fino, hace que estos contaminantes se adsorban en el sedimento y puedan permanecer en él como consecuencia de su baja solubilidad en agua y elevado K_{oc} , existiendo por tanto una estrecha relación entre estos plaguicidas y los niveles de materia orgánica presentes en los sedimentos.

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en el análisis de cinco muestras de sedimento, en las que se determinaron 26 plaguicidas, utilizando el método descrito en la publicación #1, con el doble objetivo de, por un lado, validar el método, y por otro, tener una primera idea de qué compuestos pueden detectarse en esta matriz y a qué concentraciones.

Las muestras analizadas se tomaron en 5 sitios diferentes de 4 ríos españoles: Ebro, Guadalquivir, Júcar y Llobregat. La localización de los puntos de toma de muestra y el porcentaje de carbono orgánico total (TOC, del inglés *Total Organic Carbon*) de cada una de ellas se ilustra en la Figura 4-11.

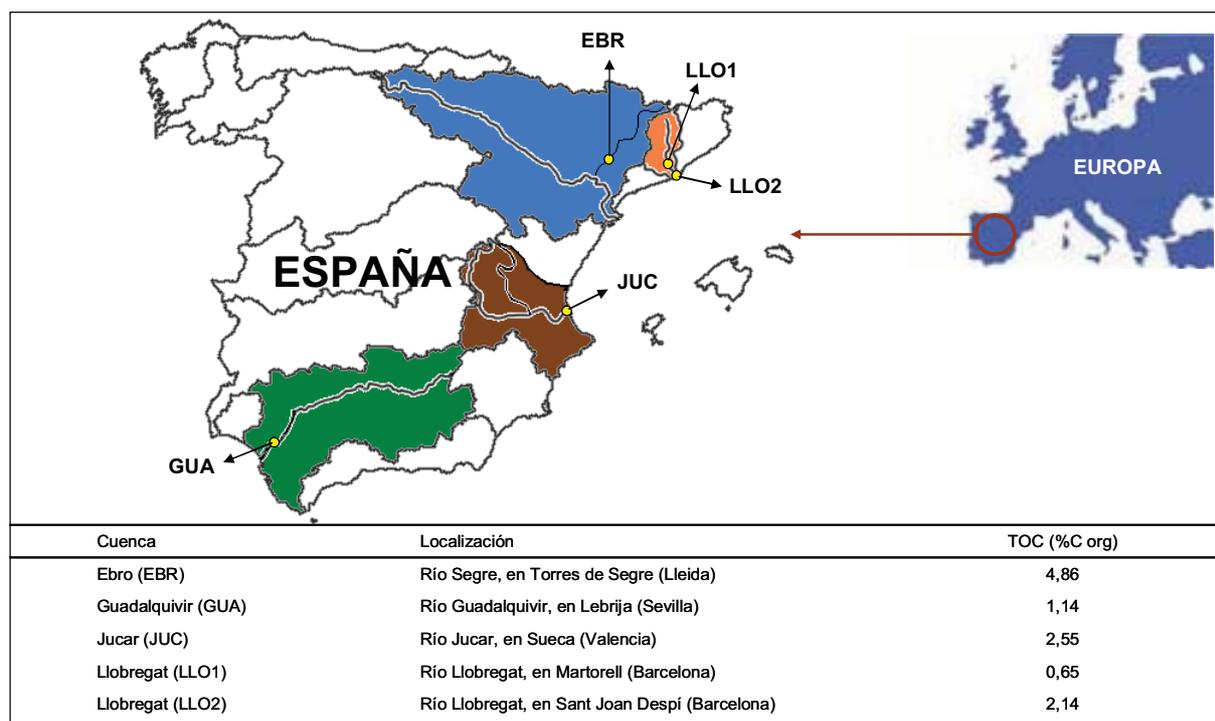


Figura 4 - 11. Detalles de los puntos de toma de muestra.

Los resultados obtenidos se detallan en la publicación #1 y aparecen ilustrados en la Figura 4-12. Como se puede observar, sólo 5 plaguicidas de los 26 analizados se detectaron: clorpirifos, desiopropilatrizona, diazinón, diurón y terbutilazina. Los 3 primeros compuestos se detectaron en 2 muestras y los 2 últimos plaguicidas en 4 muestras.

La presencia de cuatro de los cinco plaguicidas (con excepción de la desiopropilatrizona) se justifica al constatar las propiedades físico-químicas de esos analitos. La baja solubilidad en agua, la baja movilidad (K_{oc}), el alto potencial de bioacumulación (K_{ow}) y la baja volatilidad (Cte. de Henry) contribuyen a una mayor probabilidad de detectar los plaguicidas en sedimentos (ver Figura 4-13).

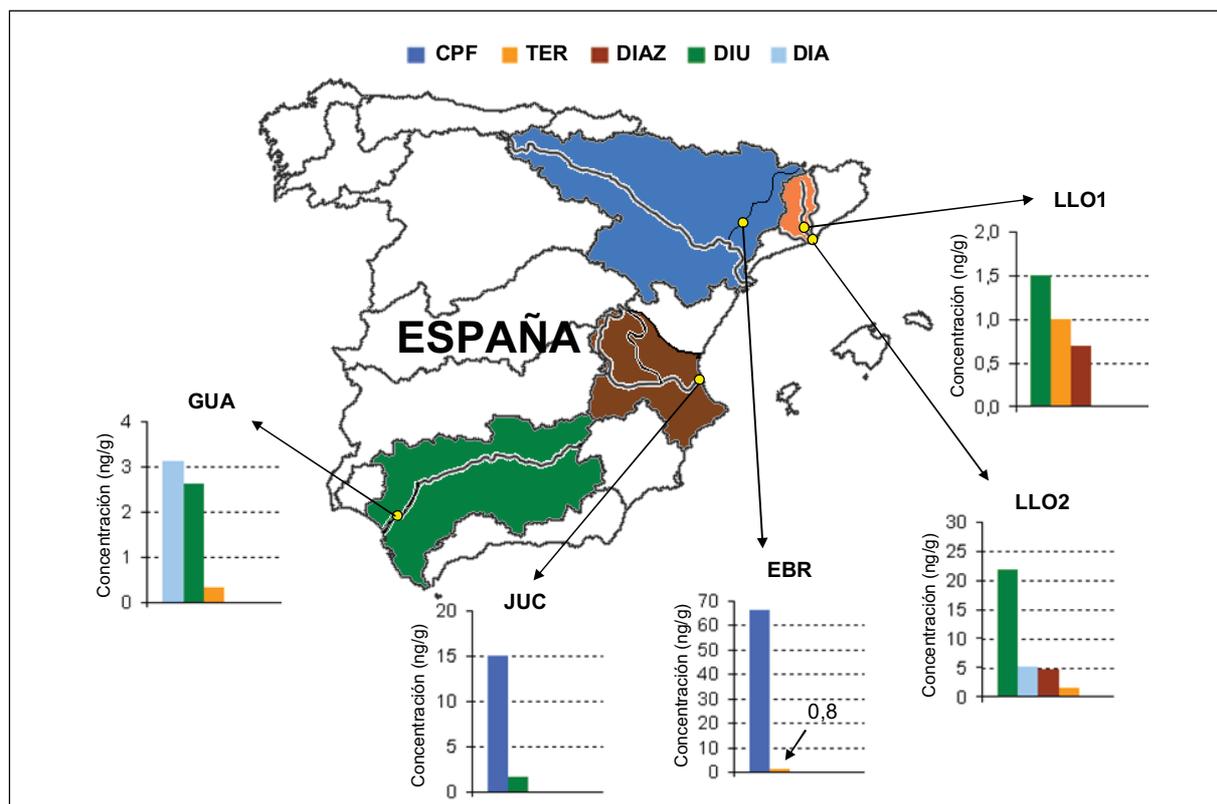


Figura 4 - 12. Niveles de plaguicidas (ng/g) en las muestras de sedimento.

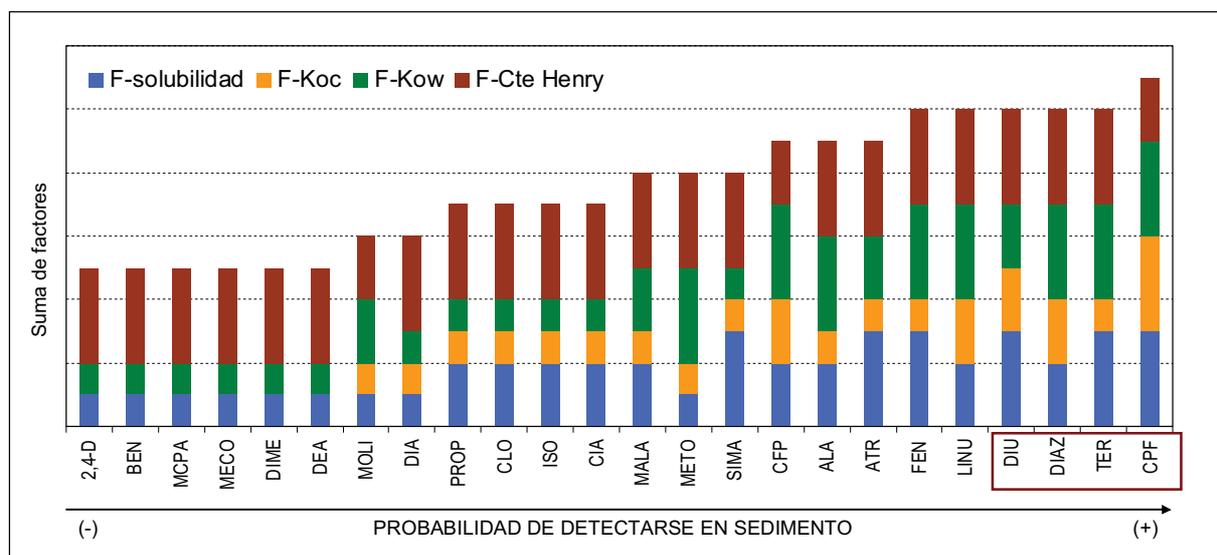


Figura 4 - 13. Los plaguicidas estudiados en función de la probabilidad de hallazgo en sedimentos, basándose estrictamente en 4 de sus propiedades: solubilidad, movilidad (K_{oc}), potencial de bioacumulación (K_{ow}) y volatilidad (Cte. de henry). En el recuadro se señalan, cuatro de los cinco plaguicidas detectados en el estudio.

Los resultados obtenidos al analizar las muestras de sedimento están de acuerdo con tal figura. Efectivamente, se detectaron los 4 plaguicidas del recuadro (clorpirifos,

terbutilazina, diazinón y diurón) en una o más de las 5 muestras analizadas, y sus concentraciones guardan cierta relación con el contenido de materia orgánica en el sedimento. Las muestras con menor contenido de materia orgánica fueron las que presentaron las concentraciones de plaguicidas más bajas, y viceversa (ver Figura 4-14).

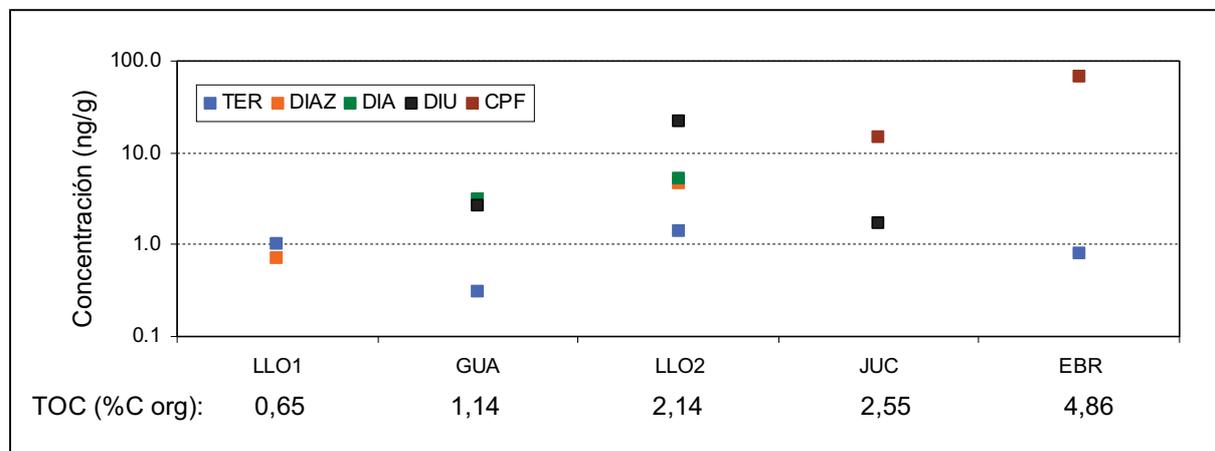


Figura 4 - 14. Concentración de los plaguicidas detectados en sedimentos en función del contenido de materia orgánica (TOC).

4.5. Discusión de los resultados

España es un país con recursos hídricos muy limitados y lo mismo sucede en Cataluña. El 52% del territorio catalán está ocupado por cuencas hidrográficas internas, alcanzando 16.423 km², y en él se encuentra el 92% de la población catalana. El 48% de territorio restante (15.567 km²) está cubierto por la cuenca hidrográfica del Ebro, en donde se encuentra el 8% restante de la población. La explotación de estos recursos es intensa, llegando a una demanda total de agua para todos los usos de 3.123 hm³/año, lo que equivale a un caudal continuo de unos 100 m³/s, lo que sería suficiente para llenar una piscina olímpica cada segundo (Generalitat de Cataluña 2008). La cuenca del Ebro es el principal proveedor de agua para uso agrícola mientras que las cuencas internas se utilizan fundamentalmente para proveer agua de uso urbano (Figura 4-15).

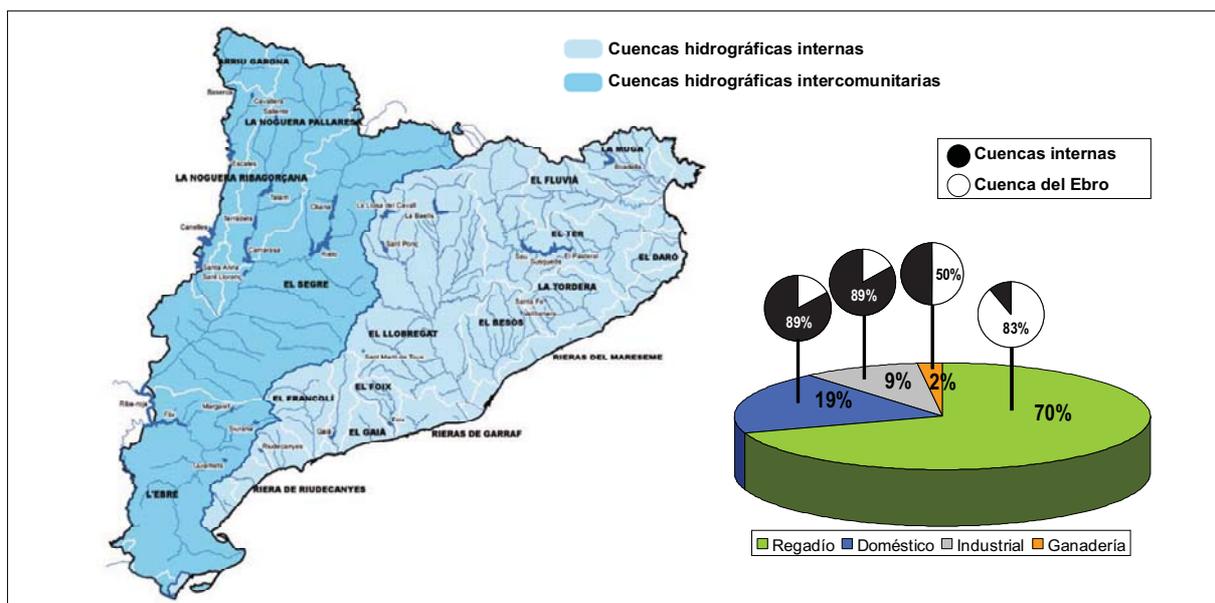


Figura 4 - 15. Las aguas en Cataluña: Distrito de Cuenca Fluvial (mapa) y usos del agua (diagrama circular) (Generalitat de Catalunya, 2008).

En lo que respecta a las aguas subterráneas, 1/3 del país presenta acuíferos subterráneos distribuidos en 699 masas de agua, de las cuales 53 se encuentran en Cataluña. Este compartimento desempeña un papel muy importante en el abastecimiento de agua potable y en el suministro a la industria y sobretudo a la agricultura, constituyendo aproximadamente el 35% del total de los recursos hídricos utilizados a nivel estatal. Lamentablemente, en España hay entre 500000 y 1000000 de pozos ilegales que se utilizan principalmente para riego agrícola (Barceló et al. 2008).

4.5.1. Los plaguicidas y las actividades realizadas en la zona

El uso y destino de estas aguas están determinados por las actividades que se desarrollan en cada zona. El Ebro es una zona eminentemente agrícola por lo que sus aguas se destinan sobre todo a este fin. Por su parte, el Delta del Ebro es conocido por el cultivo intensivo de arroz, aparte de algunos otros cultivos como aceitunas y hortalizas. La Figura SI.5 de la publicación #6 (apartado 4.3.1) muestra la distribución de la superficie agrícola de Cataluña en función del tipo de cultivo mayoritario que tiene lugar en cada caso.

Como se observa en la figura, Lleida y Tarragona son las zonas con mayor actividad agrícola, con grandes áreas de cultivos de cereales (sobretudo de maíz), frutas, hortalizas y olivas. La región de Barcelona destaca más por el cultivo de hortalizas, aceitunas y vid, así como Girona y Tarragona por el cultivo de aceitunas y viñedos. Todos estos cultivos implican el uso de plaguicidas lo que conlleva la contaminación de las aguas no sólo superficiales, sino también subterráneas.

Los resultados del estudio de plaguicidas en el Delta del Ebro (publicación #4) muestran claramente la correlación entre actividad y plaguicidas. Los plaguicidas más ubicuos en este estudio (detectados en todas las muestras) fueron la bentazona y el MCPA lo que es coherente con el uso extensivo que se hace de los mismos en el cultivo del arroz y con que se formulan en conjunto (ver Tabla 1-8 y 1-9). El diazinón y el diurón fueron detectados en más del 90% de las muestras, a concentraciones por debajo de los 500 ng/L. El insecticida diazinón (prohibido en 2007 con límite de uso hasta junio de 2008) se usaba mucho en el cultivo de hortalizas, y el diurón tiene una amplia aplicación en cítricos, hortalizas y olivos, entre otros, además de su uso extenso no agrícola. Por otro lado, los plaguicidas detectados a mayores concentraciones fueron el malatión, el MCPA, el molinato y la bentazona (concentraciones máximas entre 3286 y 5825 ng/L). El molinato es un herbicida de uso específico en el cultivo del arroz y el malatión es un insecticida muy usado tanto en el cultivo del arroz como en el cultivo de frutas de todo tipo. El caso del malatión, plaguicida prohibido en 2007, es decir, con anterioridad a la época del estudio (prohibido entre 2008 y 2010 – Dec 2007/389/CE), es delicado ya que se trata de un insecticida altamente tóxico para los organismos acuáticos, como por ejemplo peces y moluscos, y se detectó a altas concentraciones no sólo en las aguas superficiales analizadas sino también en ostras cultivadas en la misma zona (> 50 mg/kg en ostras – publicación #4), lo que provocó la reacción de los cultivadores de mejillones y ostras.

Otros plaguicidas detectados a concentraciones por encima de los 1000 ng/L fueron el alacloro, el fenitrotión y la terbutilazina. El alacloro, usado en diversos cultivos como la soja, el girasol y principalmente el maíz, se prohibió en 2006, aunque su uso se permitió hasta enero de 2008. El estudio en el Delta del Ebro se llevó a cabo en 2008, cerca de 6 meses después de que ya no se pudiera utilizar; sin embargo, la presencia de residuos de alacloro todavía era evidente, con concentraciones por encima de los 1000 ng/L. Esto se debe a que tanto el alacloro como la atrazina quedan retenidos en el suelo por lo menos dos años más desde su uso, liberándose gradualmente y permitiendo su detección pasados algunos años (Barceló y Hennion, 2003). El fenitrotión (insecticida prohibido en 2007 con límite de uso hasta mayo de 2008) se detectó en el 31% de las muestras, a altas concentraciones (hasta 1197 ng/L). Este plaguicida se caracteriza por su intenso uso en el cultivo del arroz y los cítricos.

En el tramo bajo del río Llobregat, el segundo río más largo de Cataluña, el perfil de los plaguicidas detectados guarda más relación con el uso urbano de los mismos (publicación #5). Los plaguicidas más ubicuos y abundantes en este estudio fueron el diazinón y el diurón. Ambos se emplean tanto en la agricultura como en zonas urbanas, en este último caso para la protección del césped y jardines (diazinón) y en caminos y pistas ferroviarias (diurón). En otras regiones del mundo el caso del diazinón es aun más

alarmante, llegando a niveles en la escala de los $\mu\text{g/L}$. En aguas superficiales de Shanghái, China, se han detectado niveles de diazinón de hasta $13,8 \mu\text{g/L}$ y en Venezuela (en una región agrícola del estado de Mérida), de $243,3 \mu\text{g/L}$ (Molina-Morales et al. 2012; Xie et al. 2013). El insecticida dimetoato fue el tercero en relevancia en este estudio. Conocido por su uso en parques y jardines, alcanzó niveles en el río por encima de los 160 ng/L .

Cuando se trata de aguas subterráneas, no sólo el uso del suelo es importante, sino también el tipo de cultivo al que se dedica. Como ya se ha comentado en la publicación #6, la zona de Lleida es, dentro de Cataluña, la que presenta los niveles de plaguicidas más altos, lo que se justifica por ser un área de intensa actividad agrícola y de intenso regadío.

El turismo también es una actividad que afecta mucho a las aguas subterráneas. La actividad turística que más agua consume es la de los campos de golf, campos que en 2011 llegaban a 417 en todo el país, con unas 60 Ha de extensión cada uno y con un consumo medio diario de 1.500.000 litros de agua (Nuevatribuna, 2011). Estos campos no sólo suponen un consumo muy importante de agua (en su mayoría subterránea), sino que además contribuyen a contaminarla por infiltración de los plaguicidas y fertilizantes usados para mantener el césped en condiciones óptimas. De los plaguicidas analizados en esta Tesis Doctoral, varios insecticidas (cloropirifos, diazinón, dimetoato, malatión) y herbicidas (2,4-D, MCPA, mecoprop, simazina, terbutilazina) se usan (o se usaban) regularmente para la protección del césped, parques y jardines. Algunos de ellos ya se han prohibido (diazinón, simazina) y han sido remplazados por otros, como es el caso de la terbutilazina que llegó al mercado como una alternativa a la atrazina y la simazina, herbicidas prohibidos desde 2004.

Si se analizan los resultados del análisis de plaguicidas en aguas subterráneas de Cataluña (publicación #6), se observa la presencia de triazinas (atrazina, simazina, desetilatrazina) en más del 50% de las muestras y a altas concentraciones. El dimetoato, usado en parques y jardines, también se detectó a altas concentraciones, llegando a superar los $2 \mu\text{g/L}$ en aguas subterráneas. Por último, el diurón también presentó una alta frecuencia de detección, como resultado de su amplio uso tanto en la agricultura como en zonas urbanas.

Si ahora se observan los resultados del análisis de plaguicidas en las aguas subterráneas de la región de Barcelona (apartado 4.3.2), los resultados se repiten. En el punto BSV-1, punto de referencia del estudio de recarga artificial, la simazina y su producto de transformación la hidroxí simazina se detectaron en el 71 y el 86% de las muestras, respectivamente, llegando a alcanzar niveles de hasta 93 ng/L (simazina). En el mismo estudio, el diurón se detectó también en más del 70% de las muestras en el punto de referencia, pero a bajas concentraciones ($\leq 30 \text{ ng/L}$).

Por otra parte, los plaguicidas no detectados guardan relación con las normativas, con sus propiedades físico-químicas y con sus características de uso. Prohibidos desde

2002, la cianazina (herbicida de uso urbano y rural) y el metolacloro no se detectaron en aguas residuales, pero sí en los otros compartimentos estudiados a bajas concentraciones, con excepción de las aguas subterráneas, donde este último se detectó a altas concentraciones, lo que podría tener en parte relación con su alto índice GUS. Otros plaguicidas de uso muy específico sólo son detectados en las áreas donde se practica su cultivo. Por ejemplo, este es el caso del molinato (cultivo de arroz) y el linurón (maíz y hortalizas), presentes en zonas agrícolas y no detectados en zonas urbanas (aguas residuales y parte baja del río Llobregat).

En resumen, todos los resultados obtenidos de la presencia de plaguicidas en aguas continentales se mostraron coherentes en cuanto a su relación con las actividades realizadas en la zona. A esa misma conclusión llegaron Herrero-Hernández y colaboradores cuando constataron la fuerte presencia de terbutilazina y diurón (concentraciones en aguas superficiales y subterráneas > 8000 ng/L) en la región de la Rioja (gran productora de vino), ya que ambos herbicidas se usan intensamente en los viñedos (Herrero-Hernández et al. 2013).

4.5.2. El transporte de los plaguicidas a las aguas subterráneas

Los principales procesos que controlan el transporte de los contaminantes orgánicos a través del suelo, la zona no saturada y el acuífero son la adsorción (a la materia orgánica o a los minerales de arcilla), el intercambio iónico, y la degradación o transformación microbiana (Estévez et al., 2012). En ellos, a su vez, influyen diversos factores, como las propiedades físico-químicas de los compuestos (fundamentalmente, el índice GUS (Gustafson, 1989), que es una medida del potencial de lixiviación de los plaguicidas basada en su tiempo de vida media ($t_{1/2}$) en agua y en su coeficiente de adsorción K_{oc}), el tipo de suelo, la actividad en la zona, etc., factores fundamentales en la interacción agua superficial – sedimento - agua subterránea. Para evaluar esta interacción, se analizaron los resultados obtenidos para plaguicidas en aguas superficiales (publicaciones #4 y #5), sedimentos (apartado 4.4), y aguas subterráneas (publicación #6) en dos zonas en donde se disponía de todos estos datos, una localizada en el Delta del Ebro y otra en el del Llobregat. La Figura 4-16 muestra los mapas de ambas zonas y sus principales características, y la Tabla 4-5 los resultados correspondientes (sólo se muestran los plaguicidas que se analizaron en todos los casos). Estos estudios se llevaron a cabo en fechas distintas, por lo que esta evaluación tan sólo busca trazar un perfil general de comportamiento.

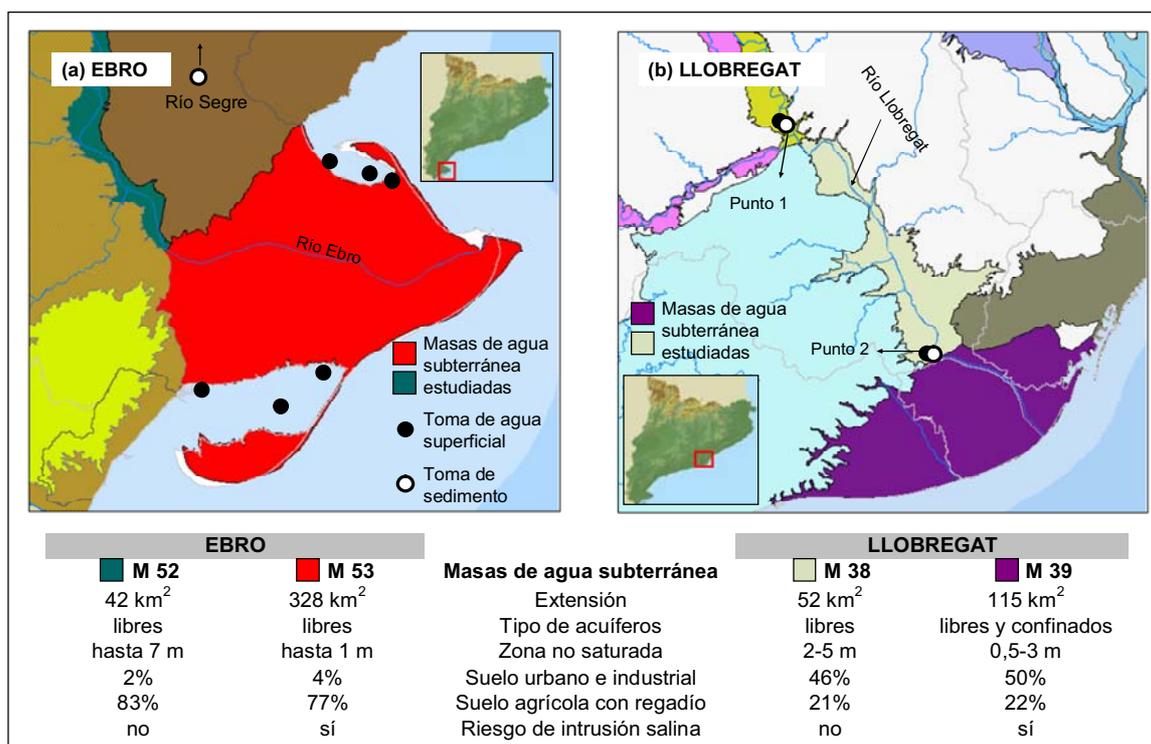


Figura 4 - 16. Localización de los puntos (círculos negros) en donde se ha estudiado la interacción agua superficial - sedimento - agua subterránea en (a) la zona del Delta del Ebro y (b) el río Llobregat. Mapas facilitados por la Agencia Catalana del Agua (ACA), (<http://acamap.gencat.cat/impress/#>).

En la zona del Ebro, los plaguicidas detectados en las aguas subterráneas también se detectaron en aguas superficiales. Las dos triazinas más detectadas en las aguas superficiales y a altas concentraciones (simazina y terbutilazina) fueron las únicas de esa familia química en detectarse en las aguas subterráneas (y una de ellas en sedimento), lo que está de acuerdo con el alto índice GUS de estos compuestos. El herbicida bentazona, uno de los compuestos con concentraciones más altas en la zona del Delta del Ebro (> 3000 ng/L), debido a su amplia aplicación en la agricultura, y con un potencial de lixiviación medio-alto (GUS: 2,55), se detectó en la masa de agua subterránea M52 a niveles de hasta 880 ng/L, lo que apunta a la intensa actividad agrícola con regadío desarrollada en esta zona (> 80% del territorio) como uno de los principales responsables del transporte de estos contaminantes hacia aguas profundas. En contraste, el insecticida malatión, uno de los plaguicidas más tóxicos detectado en más del 60% de las muestras de agua superficial y a altísimas concentraciones (hasta 5825 ng/L), no se detectó ni en el sedimento ni en las aguas subterráneas, lo que es coherente con su índice GUS, el más bajo de todos los plaguicidas en estudio, indicando un riesgo puntual para las aguas superficiales, pero no para las aguas subterráneas. El malatión es un insecticida que se degrada fácilmente. En los ecosistemas acuáticos su vía más frecuente de degradación es la hidrólisis, sin embargo

la luz suele competir con la hidrólisis. La actividad microbiana y la interacción con sedimentos pueden aumentar su degradación.

La masa de agua M53 presenta niveles casi nulos de detección. Esta masa de agua se encuentra a una pequeña distancia de la superficie del suelo (zona no saturada de tan sólo 1 m), lo que podría asociarse a un transporte fácil y rápido de los contaminantes hacia aguas subterráneas, resultando en altos niveles de los plaguicidas en el acuífero. Sin embargo, este factor también contribuye a una mayor dilución de los compuestos que se acentúa con la intrusión de agua de mar, justificando los bajos o nulos niveles de plaguicidas detectados. En las muestras de sedimento, además de la terbutilazina, se detectó clorpirifos a niveles relativamente altos (> 60 ng/g), lo que se justifica por su alto K_{oc} (> 8000 mL/g) y el alto contenido de materia orgánica en el sedimento (TOC: 4,86%).

Evaluando la interacción agua superficial - sedimento - agua subterránea en la zona del río Llobregat, los resultados muestran que los niveles de simazina y desetilatraxina detectados en las muestras de agua subterránea en 2007-2008 (30 y 28 ng/L, respectivamente) no guardan una relación muy clara con los resultados encontrados en las aguas superficiales dos años más tarde, en donde ambos compuestos se detectan pero a concentraciones no muy elevadas (4 y 3 ng/L de promedio, respectivamente). Esto puede deberse a que la simazina y la atrazina (precursor de la desetilatraxina - DEA) se prohibieron en 2004, lo que justifica que con el paso del tiempo estas concentraciones vayan decreciendo, principalmente en las aguas superficiales, tal y como ya se ha discutido en la publicación #6.

El diurón y el diazinón, presentes en más del 70% de las muestras de agua superficial aunque a concentraciones no muy altas, y detectados en las muestras de sedimento, no se detectaron en el agua subterránea de la M38, pero sí en la región del delta (M39), en donde la EDAR El Prat vierte parte de sus aguas (las regeneradas) con altos contenidos de estos dos plaguicidas de uso urbano generalizado (ver tablas 1-8 y 1-9 en el Capítulo 1 de esta memoria). Cabe decir que estos dos plaguicidas presentan poca movilidad (K_{oc} entre 500-4000 mL/g), sin embargo también bajo potencial de lixiviación ($GUS < 1,9$) por lo que su hallazgo en sedimentos se justifica y en aguas subterráneas se debe probablemente a la alta carga de estos contaminantes en las aguas superficiales, principalmente en la parte baja del río, posibilitando que un porcentaje de estos analitos alcance las aguas subterráneas. El bajo contenido de materia orgánica en estas muestras de sedimento (TOC: 0,6 – 2,1%) también influye a una mayor lixiviación de los compuestos.

Tabla 4 - 5. Datos utilizados para el estudio de las interacciones agua superficial – sedimento - agua subterránea.

(a) CASO EBRO							
Plaguicida	Agua superficial (2008)			Sedimento (2011)		Agua subterránea (2009-2010)	
	Frecuencia (%)	Promedio (ng/L)	Máximo (ng/L)	Cuenca del Ebro (n=1) C (ng/g)		Río Ebro M52 (n=2) C (ng/L)	Delta del Ebro M53 (n=1) C (ng/L)
GUS alto	atrazina	67	11,3	38,9	nd		nd
	DEA	75	14,9	50,0	nd		nd
	DIA	21	9,4	19,1	nd		nd
	simazina	88	46,7	666,9	nd		13,9 (1)*
	metolacloro	35	5,9	15,3	nd		nd
	terbutilazina	87	250,2	1550,3	0,78	1,3	
GUS medio	clortolurón	16	3,0	5,7	nd		nd
	bentazona	100	566,5	3286,0	nd		3,9-880,2 (2)
	MCPA	100	356,0	4197,0	nd		nd
	molinato	93	525,8	3590,0	nd		nd
	mecoprop	87	10,7	25,9	nd		nd
	2,4D	84	14,9	167,9	nd		< Ldet (1)
	alacoloro	29	246,3	1559,6	nd		nd
	cianazina	0	---	---	nd		nd
	isoproturón	22	4,5	9,1	nd		nd
	linurón	5	8,9	15,1	nd		nd
GUS bajo	diurón	95	72,4	408,3	nd		nd
	diazinón	99	10,0	215,5	nd		2,7 (1)
	dimetoato	46	19,8	75,4	nd		0,4
	fenitrotión	31	288,9	1197,0	nd		nd
	propanil	39	89,9	585,7	nd		1,0-1,2 (2)
malatión	68	1072,3	5825,0	nd		nd	
(b) CASO LLOBREGAT							
Plaguicida	Agua superficial (2009-2010)			Sedimento (2011)		Agua subterránea (2007-2008)	
	Río Llobregat (n=62)**			Río Llobregat C (ng/g)		Río Llobregat M38 (n=1)	Delta del Llobreg. M39 (n=6)
	Frecuencia (%)	Promedio (ng/L)	Máximo (ng/L)	Punto 1	Punto 2	C (ng/L)	C (ng/L)
GUS alto	atrazina	49	1,7	10,2	nd	nd	nd
	DEA	3	3,1	8,2	nd	nd	nd-0,12 (1)
	DIA	1	12,8	12,8	nd	5,20	28,4
	simazina	43	3,7	38,4	nd	nd	1,1
	metolacloro	6	4,3	13,1	nd	nd	30,3
	terbutilazina	79	15,1	81,5	0,96	1,45	nd
GUS medio	clortolurón	19	5,2	10,3	nd	nd	nd
	molinato	0	---	---	nd	nd	nd
	alacoloro	1	7,7	11,1	nd	nd	nd
	cianazina	2	5,9	8,6	nd	nd	1,5
	isoproturón	47	12,0	81,6	nd	nd	nd
	linurón	0	0,0	0,0	nd	nd	nd
	diurón	73	9,3	41,4	1,46	21,87	4,6-16,7 (2)
GUS bajo	diazinón	94	11,2	132,3	0,39	4,58	0,1-0,6 (3)
	dimetoato	5	16,9	42,7	nd	nd	nd
	malatión	3	4,7	11,8	nd	nd	0,7-0,8 (2)

* Número de muestras positivas; ** Las muestras provenientes del río Anoia y de la riera de Rubí se han omitido.

En este punto, los resultados del estudio de recarga artificial vienen a complementar y a ayudar a interpretar estos datos. Los resultados de ese estudio indican que el diurón no se ve significativamente afectado por la recarga artificial, principalmente porque el agua subterránea ya viene con un aporte de diurón (11 ± 4 ng/L) a niveles comparables a los detectados en las aguas de recarga (15 ± 7 ng/L). En los puntos más vulnerables de la balsa de infiltración (es decir, BSV-2) se notó un pequeño aumento de los niveles de diurón en las aguas subterráneas al iniciar la recarga sin capa reactiva, pero al reiniciarla con capa reactiva la degradación y/o la adsorción del analito a ésta quedan en evidencia tras la constatación de niveles de diurón en aguas subterráneas gradual y levemente más bajos. En el caso de la simazina, los cambios son más notorios. Los niveles varían de $5,9 \pm 1,6$ ng/L en el agua de recarga, a $9,0 \pm 11,9$ en las aguas subterráneas, pasando por niveles de $33,4 \pm 54$ ng/L en las aguas de la parte no saturada del sistema (cápsulas de succión). Estos resultados sugieren que la simazina sobrevive a la recarga y que se concentra en la parte no saturada del sistema para luego entrar en las aguas más profundas diluyéndose. Su índice GUS (3,35) respaldaría esta hipótesis.

4.5.3. Los plaguicidas y su interacción con el sedimento

Los estudios de plaguicidas en sedimentos revelaron que el clorpirifos, el diurón y el diazinón son los plaguicidas estudiados más importantes en las zonas investigadas. Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*), el clorpirifos es uno de los insecticidas organofosforados más usados en la agricultura, y el diurón es un herbicida utilizado para el control total de las malas hierbas y musgos, por lo que el hallazgo de este último en el río Llobregat no es sorprendente, ya que el sitio de toma de muestra se encuentra algunos metros aguas abajo de la descarga del denominado "Canal de la derecha", el cual abastece de agua de riego a varios campos dedicados a la agricultura en esta zona y, además, captura escorrentías altamente contaminadas. En el caso del diazinón, su presencia en sedimentos del río Llobregat guarda relación principalmente con su presencia en las EDARs. Las concentraciones detectadas de todos estos plaguicidas no fueron muy altas (< 70 ng/g), pero no deben considerarse irrelevantes, ya que muchos de estos compuestos muestran una alta toxicidad para el medio acuático, como es el caso del clorpirifos y el diazinón, que son altamente tóxicos para los invertebrados acuáticos (como todos los organofosforados debido a que inhiben la acetilcolinesterasa), y el diurón, que es tóxico para las algas.

Estudiando las propiedades de los plaguicidas y de las muestras de sedimento, se observa claramente una dependencia K_{oc} - materia orgánica. Cuanto más alto el TOC de las muestras, mayor el número o la concentración de analitos con alto K_{oc} detectados. Es el

caso de las muestras provenientes de la cuenca del Ebro y del río Júcar (TOC > 2,5%) donde se detectó clorpirifos, el plaguicida analizado con más alto coeficiente de adsorción (K_{oc} : 8151).

Con todo, una mayor cantidad de materia orgánica puede implicar una mayor adsorción a la materia o una mayor degradación de los analitos. En el caso del Ebro, el diurón, se detectó a niveles altos (máxima de 408 ng/L) en las aguas superficiales pero no se detectó ni en el sedimento (con TOC alto), ni en las aguas subterráneas, lo que apuntaría a una probable degradación del plaguicida. Sin embargo, en el caso del Llobregat, el diurón se detectó tanto en el sedimento (a pesar de tener un TOC algo más bajo que el del Ebro) como en las aguas subterráneas, lo que indicaría una menor degradación del plaguicida y una mayor lixiviación hacia aguas más profundas (esto estaría de acuerdo con su conocida estabilidad fotoquímica). En este sentido, los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción llevados a cabo a escala laboratorio en el marco del proyecto ENSAT (apartado 4.3.2) no consiguen ayudar a vislumbrar de un modo definitivo cuáles son los procesos (adsorción o degradación) que tienen lugar, ya que para ello habría sido necesario realizar en paralelo ensayos abióticos. No obstante, los resultados obtenidos en el ensayo realizado sólo con agua del río, sin material sólido (Figura 4-9), muestran pérdidas de los analitos que pueden deberse a degradación por efecto de la temperatura (en el caso de compuestos termolábiles), de la luz o de la presencia de oxígeno, a biodegradación, a adsorción al recipiente de PET, o a adsorción al material particulado y posterior pérdida en el proceso de filtración (0,45 μ m). Por lo que respecta a la adsorción en la capa reactiva, ésta está compuesta principalmente por compost vegetal, y en menor proporción arcilla y óxido de hierro. La idea detrás de esta composición es que la superficie del óxido de hierro, al estar cargada positivamente en medio acuoso neutro, puede promover la adsorción de los contaminantes aniónicos, mientras que la superficie de la arcilla, cargada negativamente, contribuiría a retener mejor los contaminantes catiónicos en medio neutro, y, por último, el compost sería el encargado de adsorber los contaminantes más apolares. Estas adsorciones estarían sujetas a factores como cantidad de superficie de contacto, temperatura y tiempo, razón por la cual se controlaron estos factores en los ensayos realizados. Comparando los resultados de los dos ensayos, se observa que los perfiles se repiten. La deisopropilatrizona se confirma una vez más que no se adsorbe al compost, y el diurón y la hidroxisimazina se presentan como los compuestos que más se adsorben (o degradan), resultados coherentes cuando se comparan con los resultados en sedimentos de diferentes ríos que varían con el porcentaje de materia orgánica.

En condiciones reales, como es el estudio de campo de recarga artificial del acuífero del Llobregat, los resultados mostraron que tanto el diurón como la hidroxisimazina no parecen verse muy afectados por la recarga, a diferencia de la simazina que presentó

cambios más evidentes. En uno de los puntos más afectados por la recarga (BSV-2) se observó claramente la contribución del agua de recarga sin capa reactiva a los niveles de simazina en las aguas subterráneas, así como los niveles nuevamente bajos de esta triazina tras el uso de la capa reactiva. Estas observaciones sugieren que la capa reactiva es eficiente y cumple su principal objetivo, el de suministrar carbono orgánico (en forma de DOC) al agua de recarga para ayudar a desarrollar zonas redox que degraden los microcontaminantes, o bien el de promover la adsorción de los microcontaminantes en la superficie de la capa preservando la calidad de las aguas subterráneas. Tras un año de recarga (C20-C25), la calidad de las aguas subterráneas no cambió lo que indica que la capacidad redox de la capa se mantiene al menos durante este tiempo.

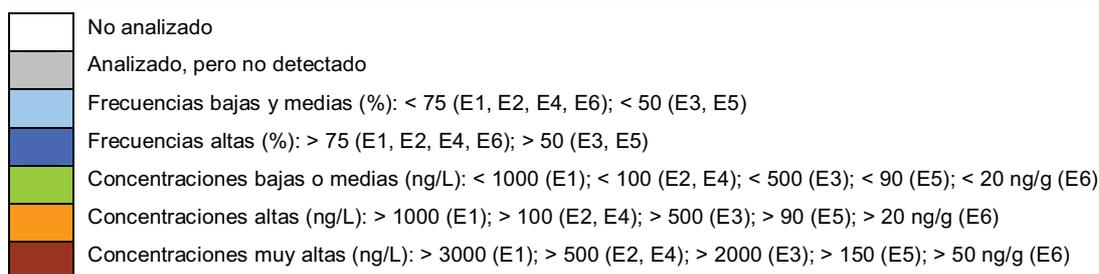
4.5.4. Análisis global de los resultados.

En los apartados anteriores se ha evaluado la presencia de los plaguicidas en las diferentes matrices ambientales en base a las actividades realizadas en cada zona y desde el punto de vista de su transporte desde aguas superficiales hacia aguas subterráneas. Los estudios de dos zonas tan distintas desde el punto de vista del uso del suelo (el Delta del Ebro y el río Llobregat) y el estudio de la recarga artificial, en conjunto con el estudio de plaguicidas en sedimentos, han permitido trazar un perfil general de la presencia de estos contaminantes en el sistema acuático continental. La Tabla 4-6 muestra un resumen cualitativo de la frecuencia y concentración de los plaguicidas en los diferentes estudios.

Como se observa, los insecticidas más relevantes son el diazinón, el dimetoato y el malatión. El clorpirifos sólo se analizó en sedimento, y en aguas la probabilidad de encontrarlo es pequeña en base a su alto K_{ow} , pero sin duda es un plaguicida que hay que controlar debido a su amplia y elevada aplicación tanto en zonas urbanas como agrícolas. El dimetoato se caracteriza por su amplia aplicación en zonas rurales y también en zonas urbanas como en jardines y parques. El malatión, por ser más de uso rural y no tener un potencial de lixiviación alto, es ambientalmente peligroso en medios de agua superficial, aunque sólo por un periodo de tiempo relativamente corto debido a su medio-alto grado de degradación, principalmente por hidrólisis termal (Wan et al. 1994). Pero entre todos ellos, el diazinón es el que más destaca, no sólo por ser el insecticida más ubicuo en todos los estudios, sino también por presentar altas concentraciones, principalmente en zonas urbanas como la parte baja del río Llobregat.

Tabla 4 - 6. Resumen cualitativo de la presencia (frecuencia de detección y concentración) de los plaguicidas en los diferentes estudios (E1 a E6).

Plaguicidas		E1: Delta del Ebro	E2: Río Lobregat	E3: Aguas subterráneas	E4: Río Lobregat – recarga	E5: Agua sub – recarga	E6: Sedimentos de 4 ríos	E1: Delta del Ebro	E2: Río Lobregat	E3: Aguas subterráneas	E4: Río Lobregat – recarga	E5: Agua sub – recarga	E6: Sedimentos de 4 ríos	
		Frecuencia de detección						Niveles de concentración						
INSECTICIDAS	CFP													
	CPF													
	DIAZ	Alta	Alta	Alta				Baja	Alta	Baja			Baja	
	DIME	Baja	Baja	Baja				Baja	Alta	Alta				
	FEN	Baja		Baja				Alta		Baja				
	FOX													
	MALA	Baja	Baja	Baja				Alta	Baja	Baja				
	MOX													
HERBICIDAS	2,4-D	Alta		Baja				Baja		Baja				
	ALA	Baja	Baja					Alta	Baja	Alta				
	ATR			Alta				Baja		Alta				
	BEN	Alta		Baja				Alta		Baja				
	CIA	Analizado, pero no detectado	Baja	Baja				Analizado, pero no detectado	Baja	Baja				
	CLO	Baja	Baja	Baja				Baja	Baja	Baja				
	DEA	Baja	Baja	Alta				Baja		Alta				
	DIA	Baja	Baja	Baja	Analizado, pero no detectado	Baja	Baja	Baja	Baja	Baja	Analizado, pero no detectado	Baja	Baja	
	DIU	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta		Alta	Baja	Baja	Baja	Alta	
	ISO	Baja	Baja	Baja										
	LINU		Analizado, pero no detectado	Baja					Analizado, pero no detectado	Alta				
	MCPA	Alta		Baja				Alta		Baja				
	MECO	Alta		Baja				Baja		Baja				
	METO	Baja	Baja	Baja				Baja	Baja	Alta				
	MOLI	Alta	Analizado, pero no detectado	Baja				Alta	Analizado, pero no detectado	Baja				
	PROP	Baja		Baja				Baja		Baja				
	SIMA	Alta	Baja	Alta	Baja	Baja		Baja	Baja	Baja	Baja	Alta		
	SOH			Baja	Baja	Alta				Baja		Alta		
TER	Alta	Alta	Baja			Alta	Alta	Baja	Alta			Baja		



Con respecto a los herbicidas, los más relevantes han sido el diurón, la terbutilazina y la simazina, lo que coincide con los plaguicidas más importantes en aguas residuales (Capítulo 3 de esta memoria). El diurón estuvo entre los más ubícuos en todos los estudios y en muchos casos es el que presentó también las concentraciones más altas, principalmente en el río Llobregat y sus sedimentos. Su baja degradación en la materia orgánica lo transforma en un herbicida persistente, alcanzando aguas subterráneas con cierta facilidad. La terbutilazina, que se emplea en sustitución de otras triazinas prohibidas (simazina, atrazina), presenta una frecuencia de detección alta. Su constante presencia en zonas rurales y urbanas, su nula eliminación durante los procesos de depuración y regeneración de aguas residuales (Capítulo 3), y su alto poder de lixiviación, hacen de este herbicida un peligro importante para el medio ambiente, cuyo permiso de uso debería reconsiderarse. La simazina presenta un perfil similar al de la terbutilazina, aunque a concentraciones mucho más bajas, debido a su prohibición hace ya casi diez años (2004). Otros herbicidas como el MCPA y el mecoprop también destacaron, pero en casos locales, como es el estudio en el Delta del Ebro. En aguas subterráneas se deben citar las triazinas prohibidas atrazina y simazina, que muestran su persistencia a lo largo de los años tras su intenso uso y debido a su alto potencial de lixiviación, aunque éste pueda llevar algunos años.

EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL



5.1. Introducción y objetivos

La calidad ecológica de los ecosistemas acuáticos superficiales es resultado de la calidad química y biológica del agua que circula por ellos. Por una parte, el caudal transportado por el río y las variaciones temporales de éste, determinan la configuración geomorfológica y la estructura del hábitat fluvial. Por otra, el tipo y cantidad de sustancias que llegan al sistema determinan sus características químicas. Por último, la biota, que consiste principalmente en organismos microbianos, bacterias, hongos, algas, macrófitos, macroinvertebrados y peces, responde a las dos características anteriores y a elementos históricos de la cuenca (Barceló 2008). Cuando se relaciona la calidad de las aguas con el estado de la biota se dice que se hace una ERA, una evaluación del riesgo ambiental, que suele abordar de forma parcial o íntegra los problemas que afrontan los sistemas acuáticos continentales. Estos problemas se dividen principalmente en tres sub problemas, como se muestra a seguir.

- *Eutrofización*. El exceso de nutrientes (fosfatos, nitritos, nitratos, amonio, entre otros) causa que especies sensibles sean sustituidas por especies más tolerantes.
- *Alteraciones físicas*. El agua de los ríos es un recurso natural para el consumo y una fuente potencial de energía; asegurar ambos recursos requiere su regulación con la construcción de embalses, pequeñas presas y canales que afectan a la comunidad acuática.
- *Presencia de sustancias tóxicas*. Constantemente se vierten a los ríos una gran cantidad de sustancias de naturaleza muy variada, muchas de ellas tóxicas, causando una serie de efectos nocivos para la comunidad acuática.

El tipo de ERA basada en el último problema (presencia de sustancias tóxicas) determina la probabilidad de que se desarrolle un daño ambiental cuando se está expuesto a una dosis determinada de un compuesto dado (o de una mezcla) durante un periodo de tiempo especificado. La magnitud de este tipo de riesgo es una función de la peligrosidad de la sustancia y de la extensión de la exposición; si alguno de ellos es igual a cero, no hay riesgo.

Para evaluar el riesgo en los ecosistemas acuáticos se usan los indicadores de calidad. Los indicadores de calidad son herramientas que permiten asignar un valor de calidad al medio a partir del análisis de diferentes parámetros. Su combinación da una visión más precisa del estado ecológico y del estado del medio biológico (ACA). En el caso de los productos fitosanitarios, los gestores medioambientales tienden a usar cada vez más la ERA como una herramienta útil para evaluar el potencial impacto de estos contaminantes en el medio ambiente (Finizio et al. 2001). Con la entrada en vigor de la DMA, estos indicadores

se han diversificado y se ha generalizado su uso (ver ejemplos de estos estudios en la Figura 5-1). Los efectos estudiados sobre las comunidades acuáticas más relevantes son la mortalidad, el crecimiento y la reproducción de los organismos.

En el caso de Cataluña, la Agencia Catalana del Agua puso en marcha en el año 2007 el denominado Programa de Seguimiento y Control para evaluar la calidad de las aguas y los ecosistemas acuáticos, que incluye ríos, embalses, lagos y zonas húmedas. Para llevar a cabo este programa, se emplean una serie de indicadores biológicos, hidromorfológicos y físico-químicos. En el caso del estudio del impacto ambiental de los plaguicidas en medios acuáticos, los indicadores biológicos suelen ser los más empleados debido a la naturaleza de los contaminantes. Estos indicadores biológicos se basan en el estudio del estado de especies que requieren unas características ecológicas propias para sobrevivir. Cuando estas características no son las ideales, los organismos desaparecen o muestran los efectos de las posibles carencias, lo que permite asignarle a cada especie un valor de sensibilidad que se usará en el cálculo del índice. Los indicadores biológicos indican la calidad durante un periodo más o menos extenso de tiempo (en función de la vida media de los organismos), y también responden a episodios cortos pero recurrentes de contaminación (ACA).

Compartimientos ambientales	Proceso en estudio	Ejemplos de estudios
Aire	(1) Volatilización (2) Deposición aérea	Schneider et al. 2012 Jerome et al. 2013
Suelo	(3) Escorrentía / Transporte	Balderacchi et al. 2008 Comoretto et al. 2008 Kohne et al. 2009 Burgert et al. 2011 Stehle et al. 2012 Knäbel et al. 2012
Subsuelo	(4) Adsorción	Ghafoor et al. 2012
Agua superficial	(5) Infiltración	Malaguerra et al. 2013
Agua subterránea		
Estudios con comunidades acuáticas		
Agua superficial	(6) Toxicidad de aguas superficiales	Barata et al. 2007 Carriger et al. 2008 Blasco et al. 2009 Burgert et al. 2011 Kattwinkel et al. 2011 Silva et al. 2012 Raquet et al. 2013
Agua residual	(7) Toxicidad de aguas depuradas	Reemtsma et al. 2006 Bunzel et al. 2013
Comunidad acuática (algas, peces, invertebrados...)		

Figura 5 - 1. Ejemplos de estudios de transporte y toxicidad realizados en los diversos compartimentos ambientales y ecológicos.

Las especies más usadas como indicadores biológicos en el estudio del impacto de las EDARs son las algas diatomeas, los macroinvertebrados y los peces. Las algas diatomeas son muy sensibles a la carga de nutrientes, al pH y a la salinidad, y responden favoreciendo especies tolerantes a las nuevas condiciones. Los macroinvertebrados también son sensibles a cambios en la calidad del agua, ya sea por aportes orgánicos, alteración del hábitat o aportes de tóxicos. Los peces, que viven más tiempo que los demás grupos de organismos acuáticos, integran los cambios prolongados (Barceló 2008).

Para determinar cuáles son los factores más importantes para evaluar el potencial tóxico de los compuestos, lo ideal es hacer una recopilación exhaustiva de datos y evaluar la relevancia de cada uno de ellos para el caso en cuestión. Hace algunos años, Blasco y colaboradores publicaron un artículo de revisión donde dieron una visión general sobre cuál es la mejor forma de evaluar el estado biológico de los ecosistemas y de vigilar sustancias prioritarias y específicas involucradas en la contaminación del medio ambiente (Blasco et al. 2009). Los autores describieron las herramientas de bioanálisis necesarias y abordaron la necesidad de integrar y combinar factores químicos. Más recientemente, Schafer y colaboradores compararon nueve indicadores diseñados para estimar la toxicidad total de mezclas de compuestos (entre ellos, plaguicidas) para los macroinvertebrados y dieron recomendaciones sobre cómo seleccionar el mejor índice de acuerdo con la disponibilidad de datos y los compuestos involucrados (Schafer et al. 2013).

La Figura 5-2 presenta un esquema típico de las fases implicadas en el proceso de caracterización de los riesgos biológicos que los plaguicidas provocan en las aguas naturales. En muchos estudios los índices de riesgo se calculan en base a datos predictivos (obtenidos a partir de modelos) debido a la falta de valores reales y al gran trabajo y alto coste que su obtención implica.

Un modelo se puede definir como una descripción simplificada de algunos aspectos de la realidad (Balderacchi et al. 2007), o como la simplificación de un sistema de fenómenos que tengan por lo menos dos partes que interaccionen entre sí (Golluscio et al. 1994), o como una aproximación a la realidad, tanto mejor cuanto más se adapten las ecuaciones de partida y el esquema numérico para su resolución a la realidad que se está estudiando (Cea y Bladé, 2013).

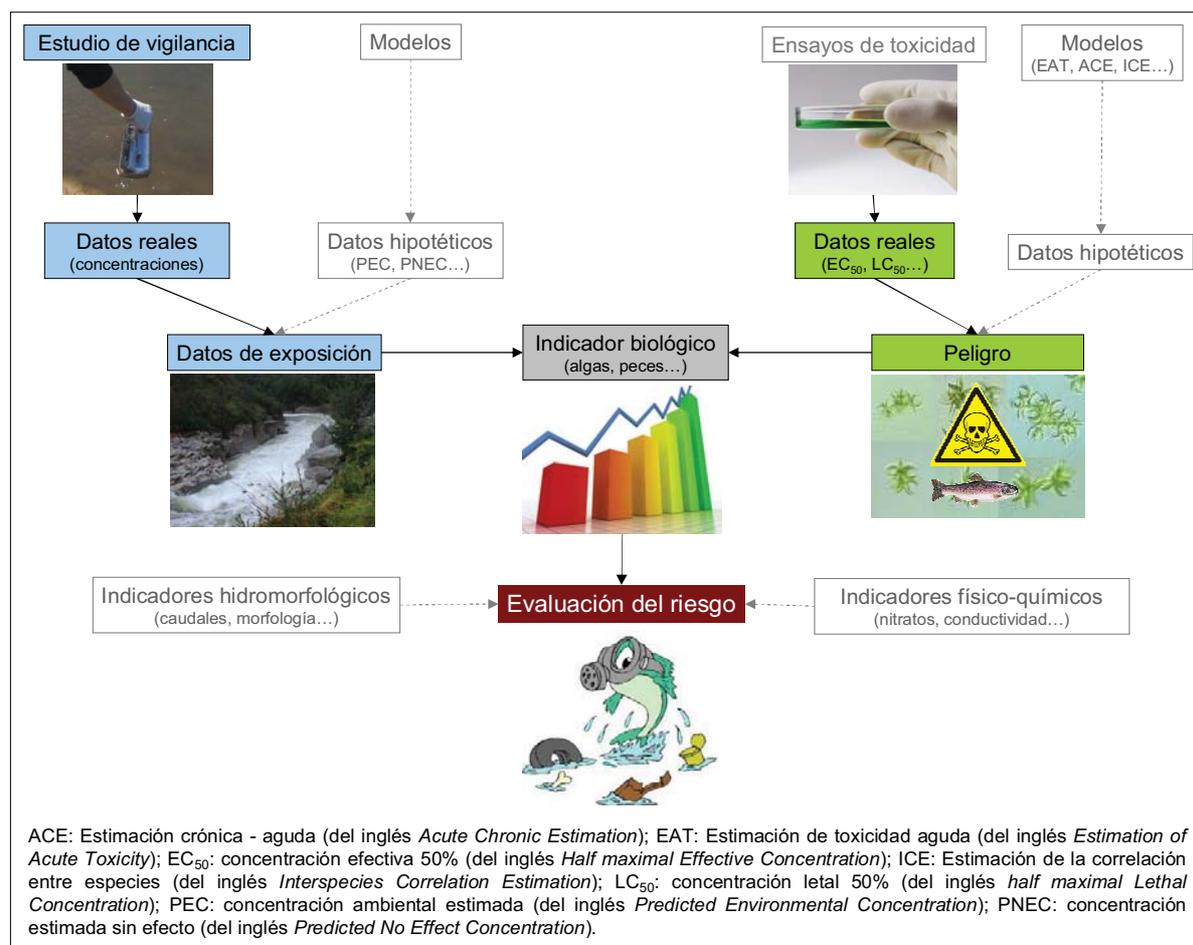


Figura 5 - 2. Fases implicadas en el proceso de ERA de plaguicidas en el medio ambiente acuático. Las etapas destacadas en colores indican los procesos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral.

Los modelos son herramientas valiosas para la generación de conocimiento y la solución de problemas, porque permiten comprender y optimizar sistemas más o menos complicados, descubrir propiedades emergentes de los mismos, y generar hipótesis acerca de su funcionamiento. Esto quiere decir que los modelos permiten, mediante ejercicios de simulación, predecir las consecuencias de acciones difíciles y hasta imposibles de implementar, ya sea debido a su coste en dinero, tiempo y/o trabajo, o a que su ejecución puede poner en peligro la subsistencia de los sistemas reales. Se pueden aplicar modelos no dinámicos para obtener datos de partida para el desarrollo de un estudio determinado (por ejemplo, modelos EAT para predecir EC₅₀) o para predecir concentraciones de contaminantes en un escenario dado (por ejemplo, cálculo de PEC), o se pueden aplicar modelos dinámicos al cabo de una serie de estudios, como una forma de integrar las variables adquiridas durante esos estudios y aplicarlos a ecosistemas dinámicos teóricos (por ejemplo, modelos OMIVE - del holandés *Organische MicroVerontreiniging* - para describir el comportamiento y el destino de microcontaminantes orgánicos en aguas

superficiales unidimensionales).

En este contexto, el objetivo principal de esta parte del trabajo consistió en dar una significación ecotoxicológica a los datos químicos obtenidos durante la Tesis Doctoral, mediante el uso/diseño de modelos e índices útiles para evaluar el riesgo ambiental asociado a los plaguicidas en los diferentes ecosistemas acuáticos estudiados. Según lo anterior, el presente capítulo se subdivide en los siguientes apartados:

- Delta del Ebro: toxicidad real y estimada asociada a los plaguicidas en tres organismos acuáticos;
- Río Llobregat: evaluación del riesgo asociado a los plaguicidas mediante el índice PRISW-1;
- EDARs: estudio del impacto de las aguas residuales en el medio acuático receptor mediante el índice ERPWI.
- Predicción de contaminación en el río Llobregat: aplicación de un modelo predictivo de concentración.
- Modelo dinámico medioambiental del río Llobregat.

Estos estudios, comentados en detalle en este capítulo, se encuentran descritos en las publicaciones científicas #4 (Delta del Ebro) y #5 (Llobregat) incluidas en el capítulo 4 y en las publicaciones científicas #2 (EDARs) y #3 (predicción en el Llobregat) incluidas en el capítulo 3. Los resultados preliminares obtenidos sobre la creación de un modelo dinámico medioambiental del río Llobregat (producto de una estancia de 3 meses en la Universidad de Wageningen, Holanda), también se presentan en este capítulo.

El capítulo termina con una discusión global de los resultados con respecto a los plaguicidas más problemáticos, las zonas que aparecen como más delicadas y sobre otros indicadores de riesgo ambiental.

5.2. Delta del Ebro: toxicidad real y toxicidad estimada asociada a los plaguicidas en tres organismos acuáticos

En los últimos años se han producido en la región del Delta del Ebro, donde 80% del territorio está dedicado al cultivo del arroz, episodios de mortalidad de marisco, coincidiendo con el inicio de la campaña del arroz, que han provocado conflictos entre ambos sectores - agricultores y mariscadores-, ya que, según estos últimos, la causa estaría en el uso indiscriminado de plaguicidas por parte de los primeros.

En este contexto, el principal objetivo de este estudio fue estudiar la posible toxicidad de las aguas de esta zona y tratar de determinar hasta qué punto los plaguicidas presentes

contribuyen a la misma. Para ello, se determinaron las concentraciones de plaguicidas en aguas de distintos puntos, estas concentraciones se transformaron en niveles estimados de toxicidad frente a tres organismos acuáticos diferentes, y estos niveles estimados de toxicidad se compararon con niveles reales de toxicidad medidos experimentalmente en los mismos puntos y frente a los mismos tres organismos: bacterias, algas y crustáceos.

La Figura 5-3 muestra los puntos de muestreo (6 en total). Estos puntos corresponden a las principales zonas de desagüe del área de cultivo del arroz en las dos bahías del delta (HEOD y HEIMD en la bahía del Fangar al norte, y HDCD y HDAD en la bahía del Alfacs al sur) y a la zona central de ambas bahías, en donde tiene lugar el cultivo del marisco. En estos puntos se tomaron muestras de agua puntual en 18 ocasiones diferentes a lo largo del periodo comprendido entre el 14 de abril y el 12 de junio de 2008, coincidiendo con la campaña de cultivo del arroz.

El análisis de los plaguicidas (un total de 22) en estas muestras de agua se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2 de la presente memoria, basado en SPE acoplada on-line a LC-MS/MS. El estudio de la toxicidad en las mismas aguas se realizó, según se describe en la publicación #4, con ensayos estandarizados de toxicidad aguda frente a tres organismos diferentes:

- la bacteria *Vibrio fischeri* (según la Norma ISO 11348-3),
- el crustáceo *Daphnia magna* (según Norma ISO 6341), y
- el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (según Norma ISO 8692).

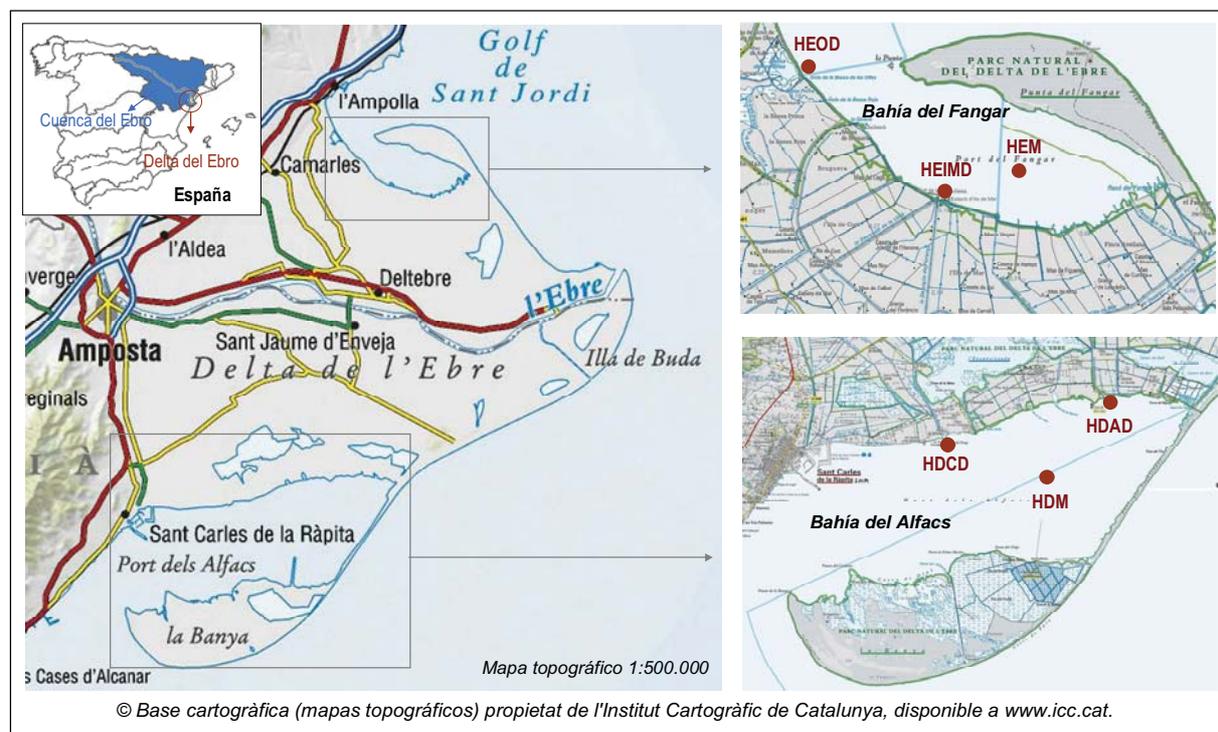


Figura 5 - 3. Mapa de los puntos de toma de muestra en el Delta del Ebro.

Por último, la toxicidad teórica asociada a los plaguicidas se calculó, según se describe en la publicación #4, a partir de la concentración de los plaguicidas presentes en cada muestra y su correspondiente toxicidad (EC_{50} , LC_{50} , etc.) frente a cada uno de los organismos anteriores, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$TU = 100 / EC_{50}$$

donde, TU son unidades de toxicidad y EC_{50} es la concentración efectiva 50%, y

$$T_{teórica} = \sum C_i \times TU_{ij}$$

donde C_i es la concentración de plaguicida (i) en la muestra y TU_{ij} son las unidades de toxicidad del plaguicida (i) frente al organismo (j).

5.2.1. Resultados

Los resultados de las toxicidades teóricas se muestran en la Figura 5-4. En esta figura, se observa claramente que el malatión es prácticamente el único responsable de la toxicidad estimada en crustáceos (Figura 5-4a), lo que es coherente con el hecho de que es el insecticida que muestra los niveles más altos en las aguas y uno de los insecticidas analizados más tóxicos (junto con el diazinón) para *daphnias*. En la figura también se observa que los desagües del hemidelta izquierdo (HEIMD, HEOD) presentan niveles de toxicidad para *daphnias* superiores a los detectados en los desagües del hemidelta derecho (HDAD, HDCD).

En lo que respecta a las algas (Figura 5-4b), una diversidad de herbicidas ocupan los primeros puestos en el ranking de toxicidad: diurón, simazina y terbutilazina, con predominancia del diurón en la bahía del Fangar (al norte) y de la simazina en la bahía dels Alfacs (al sur). Por último, cuando se trata de la toxicidad en bacterias (Figura 5-4c), el molinato y el fenitrotión son los principales responsables, presentando un perfil similar en las dos partes del Delta del Ebro.

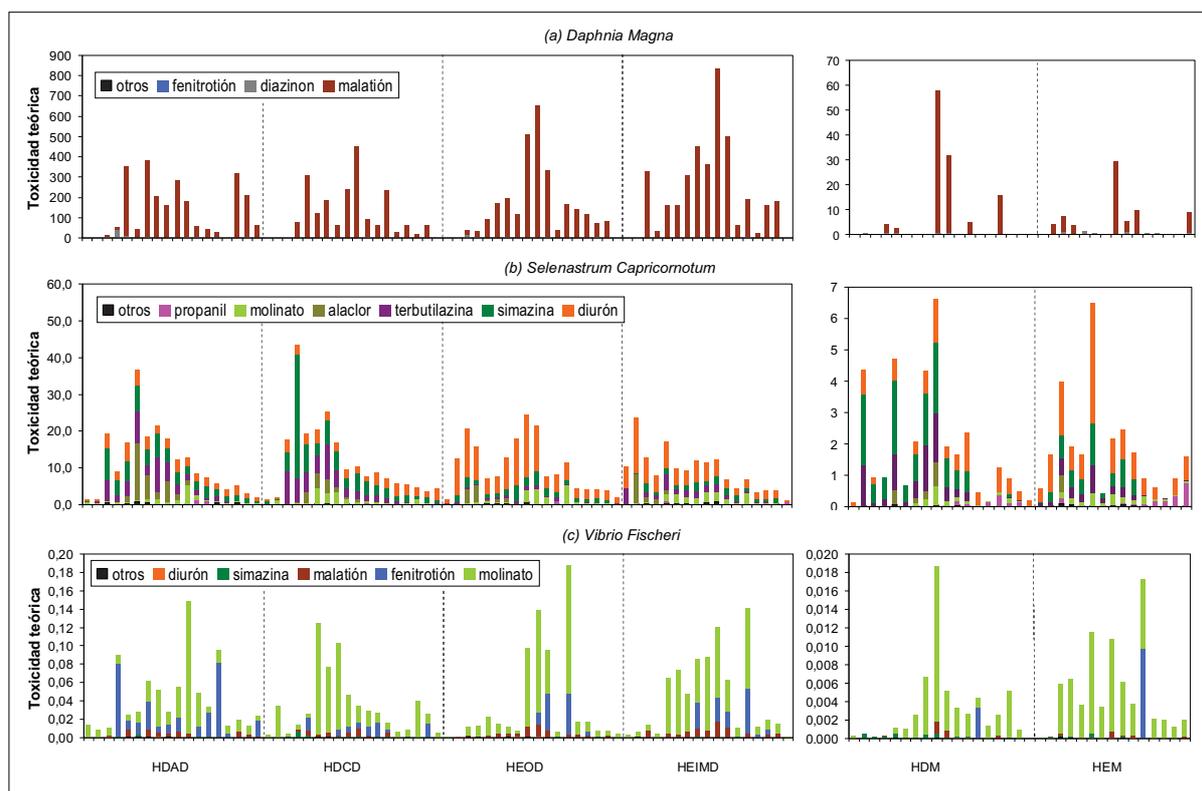


Figura 5 - 4. Toxicidad teórica de los plaguicidas en los 6 puntos estudiados para los tres microorganismos acuáticos: (a) crustáceos; (b) algas; (c) bacterias.

Además de esto, en todos los casos las toxicidades estimadas en las bahías (HEM, HDM) son aproximadamente un orden de magnitud más bajas que las estimadas en los desagües, lo que probablemente se corresponde con el grado de dilución experimentado por los plaguicidas una vez vertidos a las bahías y mezclados con el agua de mar.

Estas toxicidades teóricas y las toxicidades experimentales obtenidas a partir de los ensayos biológicos se compararon para cada muestra frente a los 3 organismos. Como se puede observar en los gráficos de la Figura 5-5 las toxicidades teóricas y experimentales, de acuerdo con sus respectivas escalas, siguen la misma tendencia en la mayoría de los casos, principalmente en los puntos de desagüe, indicando que en estos puntos los plaguicidas son uno de los principales responsables de la toxicidad observada. En las bahías, los niveles de toxicidad estimados para los plaguicidas bajan un orden de magnitud; sin embargo, no ocurre lo mismo en el caso de la toxicidad experimental, que es del mismo orden que la observada en los puntos de desagüe.

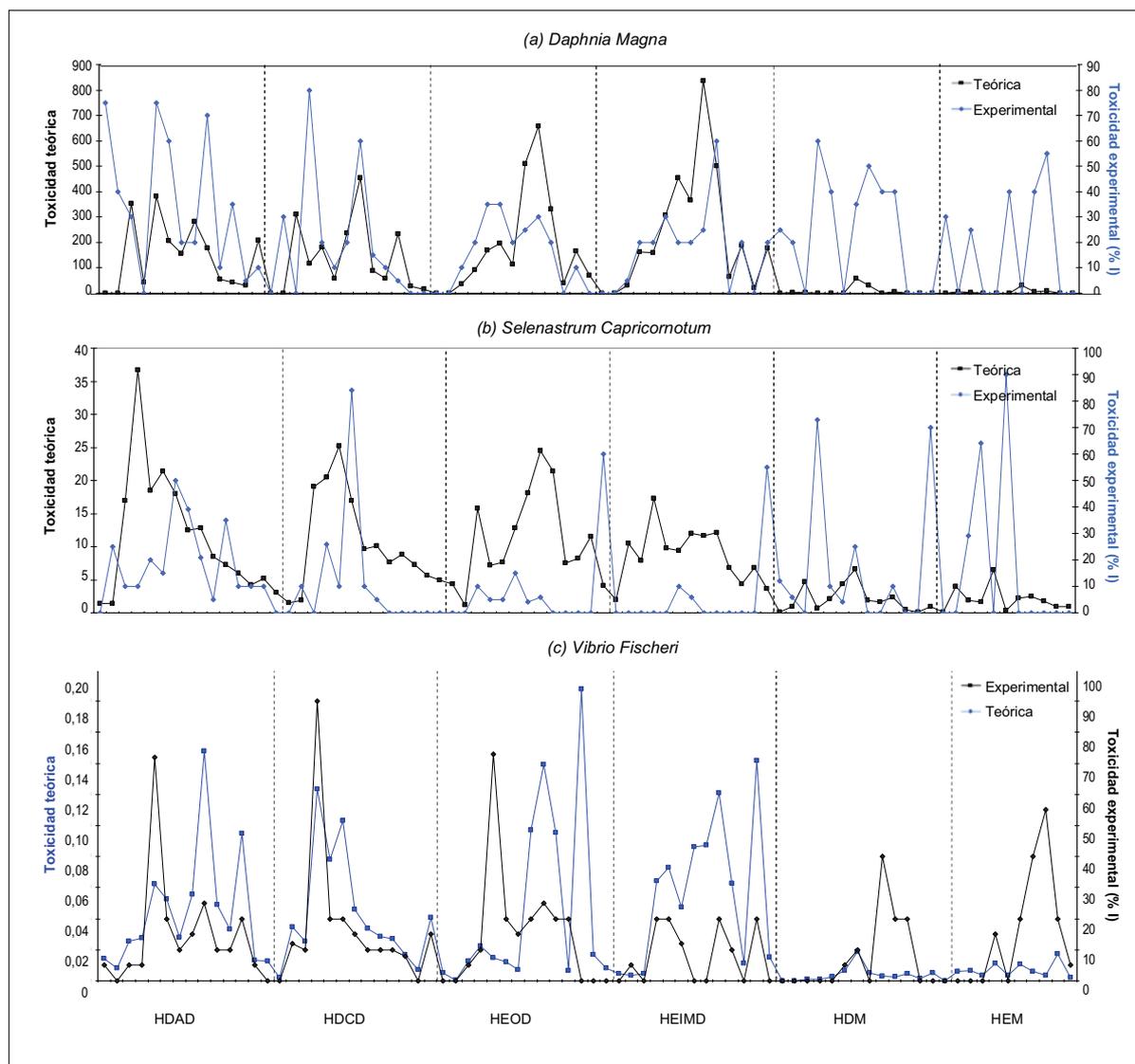


Figura 5 - 5. Toxicidades teóricas y experimentales en los distintos puntos de muestreo para los tres microorganismos acuáticos estudiados: (a) crustáceos; (b) algas; (c) bacterias. %I: promedio del porcentaje de inhibición (a mayor inhibición, mayor toxicidad).

De forma general, los resultados fueron bastante consistentes por lo que a la similitud entre el perfil de la toxicidad experimental y la estimada se refiere, si se considera que en el Delta del Ebro se aplican más de 20.000 toneladas de más de 25 agroquímicos distintos por año (los más usados son las triazinas, fenilureas, anilinas y órganofosforados - Kuster et al. 2008b).

Con todo, los niveles de toxicidad estimada en las bahías fueron aproximadamente 10 veces más bajos que a la salida de los canales de drenaje, cosa que no sucedió en el caso de los valores de toxicidad real, lo que apunta a que hay otros factores de estrés, aparte de los plaguicidas, que contribuyen a la toxicidad de las aguas en las bahías. Además, se considera que la bahía del Fangar (aproximadamente 10 veces más pequeña

que la bahía del Alfacs) sufre un intercambio de agua más alto con el mar que la de Alfacs (Llebot et al. 2011), lo que causaría una dilución mayor de los plaguicidas provenientes de los canales de drenaje, justificando así que las diferencias entre las toxicidades teóricas (canales & bahías) fueran mayores en la bahía del Fangar.

Por lo que respecta a los niveles de toxicidad real en las bahías, hay que tener en cuenta que otros contaminantes con mayor potencial de bioacumulación (como los metales), los factores estresantes de origen natural, y factores fisiológicos adicionales también pueden afectar a las respuestas de toxicidad en bivalvos (Vidal et al. 2002). La presencia de metales como fuente de estrés acuático se ve reforzada por el hecho de que el organismo en el que la coincidencia entre tendencias es menor es el alga *S. capricornotum*, lo que podría sugerir la presencia de sulfato de cobre, comúnmente empleado como alguicida.

Además, esos resultados son consistentes y se les relacionan los episodios de mortalidad de moluscos (Damásio et al. 2010). Estudios recientes han mostrado que varios niveles de residuos de plaguicidas presentes en los canales de drenaje del Delta del Ebro son tóxicos para las almejas de agua dulce y para crustáceos (Barata et al. 2007; Damásio et al. 2010). El plaguicida más relevante en el estudio llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, desde el punto de vista de riesgo ambiental, fue el malatión, debido a su alta toxicidad para macroinvertebrados, por medio de la inhibición de la acetilcolinesterasa (mecanismo de acción de los organofosforados), y a causa de su detección tanto en aguas como en moluscos de la zona. Muchos autores han concentrado sus esfuerzos en el estudio de este insecticida de alta toxicidad, abordando desde su toxicidad en salmón (Laetz et al. 2013) hasta técnicas para eliminarlo de las aguas superficiales (Behloul et al. 2013).

Sobre la presencia de metales en la zona, hay evidencias de residuos metálicos (como As, Cd y Hg) tanto en sus aguas como en biota (Mañosa et al. 2001; Sánchez-Chardi et al. 2007; Soto et al. 2011). Estos metales suelen estar en pequeñas concentraciones en el agua ($\mu\text{g/L}$), por lo que la mayoría de los organismos vivos se han adaptado a lo largo de su evolución a estas concentraciones, de modo que tanto su escasez como, más habitualmente, su exceso puede perjudicar seriamente la salud humana y la de los ecosistemas (Barceló (coord.), 2008).

Pero no sólo los plaguicidas y los metales pueden ser los responsables de la muerte de ostras y mejillones en la zona. La temperatura del agua, que aumenta en el Delta del Ebro entre mayo y junio debido al aumento de la temperatura del aire, también es un factor de estrés, ya que hace que los niveles de oxígeno en el agua disminuyan (Ochoa et al. 2012). Además, las altas temperaturas también favorecen que haya un exceso de un tipo de alga microscópica que exhala una toxina que causa la muerte de moluscos, lo que hizo que en 2009 se prohibiera la recogida de ostras y mejillones en el Delta del Ebro (El País, 2009). Es más, desde hace algún tiempo, la mortalidad de ostras en este delta se ha relacionado

con una combinación de factores de estrés ambiental, como las altas temperaturas, la elevada salinidad (causada por intrusión de agua de mar) y los altos niveles de residuos de plaguicidas causando variaciones en el estado fisiológico de las ostras (Ochoa et al. 2012). Por otro lado, muchos de esos factores potencian las acciones tóxicas de muchos contaminantes. Es el caso del clorpirifos, que es muy tóxico para los peces de agua dulce y salada y para los invertebrados, pero que aumenta aún más su toxicidad cuando sube la temperatura y el pH del agua (Carriger et al. 2008). Además de esto, las mezclas de contaminantes, ya sean conocidos o desconocidos, también pueden causar efectos tóxicos en el medio ambiente (Blasco et al. 2009). Como producto de todos esos factores de estrés, en 2008 los científicos recomendaron cultivar mejillones fuera de las bahías del Ebro (Soitu.es, 2008).

La dificultad en reconocer los factores ambientales que más estresan a la comunidad acuática también se ve en otros estudios. En Portugal, Silva y colaboradores evaluaron la presencia de 12 plaguicidas en aguas superficiales, aguas subterráneas y sedimentos de una zona agrícola, además de haber realizado ensayos de toxicidad en agua (con bacterias, macroinvertebrados y algas) y sedimentos (con larvas) para buscar una relación entre ellos, pero no lo consiguieron (Silva et al. 2012). Parece ser que en la zona de estudio hay otros factores que hay que tener en cuenta además de la presencia de plaguicidas en el medio acuático.

5.3. Río Llobregat: evaluación del riesgo asociado a los plaguicidas mediante el índice PRISW-1.

La cuenca del río Llobregat (NE de España), de 156,5 km de extensión, se caracteriza por un caudal variable que puede ir de pocos metros cúbicos por segundo en el nacimiento hasta varios cientos de metros cúbicos por segundo en la zona de la desembocadura. La zona media-baja del río está altamente industrializada, por lo que la descarga de aguas residuales en el río es bastante elevada, con la consecuente contaminación que este hecho genera. En los últimos años ha habido un aumento en la demanda de agua en esta zona debido a un aumento de la población y de las necesidades industriales y agrícolas. En el tramo más bajo de la cuenca, en los términos municipales de Abrera y de Sant Joan Despí, se sitúan dos plantas de tratamiento de agua potable (ETAP) que dan servicio a aproximadamente 3 millones de habitantes.

Este río, que presenta dos afluentes principales, el río Cardener y el río Anoia, recibe los efluentes de muchas EDARs (caudales promedio de vertido: de 0,014 a 0,325 m³/s) y, en el tramo más bajo, hay algunas EDARs más que vierten sus aguas directamente al mar. Las aguas tratadas vertidas al río Llobregat cumplen en términos generales la Directiva

91/271/CEE, aunque llevan una carga importante de microcontaminantes orgánicos y, entre ellos, plaguicidas, tal y como ya se ha comentado en el Capítulo 3 de esta memoria.

En el contexto del proyecto VIECO, descrito en el apartado 4.2.2 de esta memoria, se analizaron 16 plaguicidas en un total de 66 muestras de agua provenientes de 2 puntos del río Llobregat y de dos de sus afluentes, el río Anoia y la riera de Rubí (ver detalles en la Figura 5-6). Las muestras se analizaron mediante SPE-LC-MS/MS según se describe en la publicación #5. Debido a la gran fluctuación de los caudales en las diferentes épocas de muestreo, los índices de riesgo se calcularon en base a los caudales existentes en cada momento en cada punto. Estos caudales (Q), que fueron facilitados por la Agència Catalana de l'Aigua (ACA), se muestran en la Figura 5-7. Los datos originales se encuentran recogidos íntegramente en el material suplementario de la publicación #5.

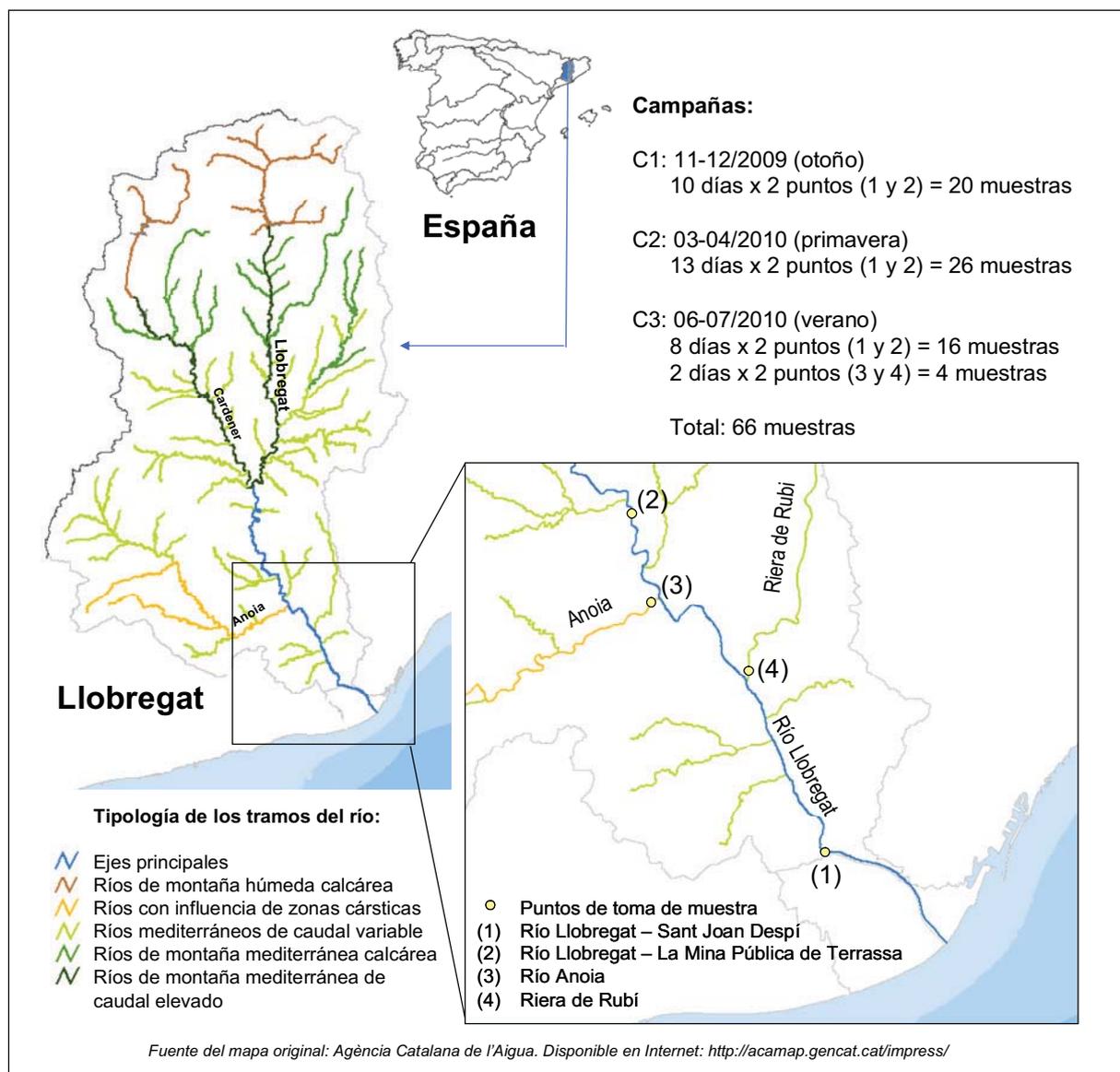


Figura 5 - 6. Características de la zona de estudio.

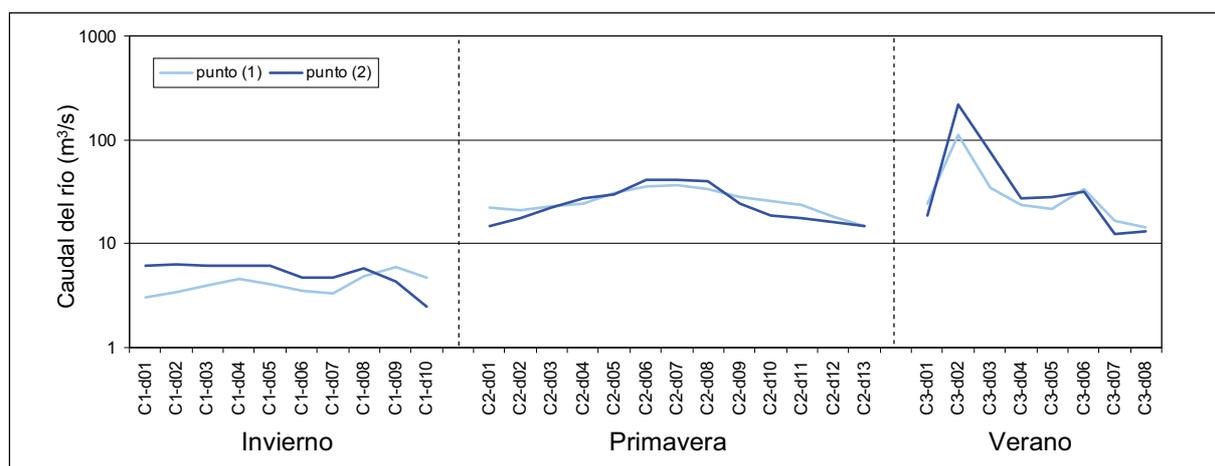


Figura 5 - 7. Caudales del río Llobregat (m³/s) en los puntos (1) y (2) durante las tres campañas de estudio.

Para realizar los estudios, se evaluó la interacción de dos factores decisivos en la ERA del ecosistema acuático: el grado de exposición (teniendo en cuenta concentración real de los plaguicidas y caudal del río) y la toxicidad (considerando conjuntamente la toxicidad en tres organismos acuáticos diferentes), por medio del índice PRISW-1 (del inglés *short-term Pesticide Risk Index for Surface Water system*).

$$\text{PRISW-1} = (\text{A} \times 3) + (\text{B} \times 4) + (\text{C} \times 5,5) \quad \text{donde:}$$

A, B, C: puntuación asignada a los TER (coeficiente de exposición toxicológica, del inglés *toxicological exposure ratio*) obtenidos para algas, *daphnias* y peces, respectivamente.

3, 4, 5,5: pesos correspondientes.

Este índice fue propuesto en 2001 por Finizio y colaboradores como una herramienta para evaluar el riesgo que representan los plaguicidas para los sistemas de agua superficial (Finizio et al. 2001), e integra en un solo índice la toxicidad de todos los plaguicidas en 3 organismos diferentes y representativos de distintos niveles de la escala trófica. El índice PRISW-1 se basa en el cálculo del coeficiente de exposición toxicológica TER (del inglés Toxicological Exposure Ratios), que viene a ser el inverso de las TU, para cada muestra y organismo, en la asignación de un valor a cada TER y un peso (importancia relativa) a cada organismo según la fórmula y la tabla indicadas más abajo, y en la clasificación e interpretación del riesgo en función del valor obtenido (Tabla 5-1).

Tabla 5 - 1. Puntuación del TER y clasificación del índice PRISW-1 (Finizio et al. 2001).

Puntuación		Clasificación del riesgo	
0	para TER > 10000	Insignificante	PRISW-1 ≤ 5
1	para 1000 < TER < 10000	Bajo	5 < PRISW-1 ≤ 15
2	para 100 < TER < 1000	Medio	15 < PRISW-1 ≤ 40
4	para 10 < TER < 100	Alto	40 < PRISW-1 ≤ 80
6	para 2 < TER < 10	Muy alto	PRISW-1 > 80
8	para TER < 2		

5.3.1. Resultados

La Figura 5-8 presenta los resultados de las concentraciones (a) y los flujos de masa de los plaguicidas totales (b) en cada muestra, y las respectivas TUs (c) e índices PRISW-1 (d). Se calcularon los flujos de plaguicidas (caudal x concentración) debido a la gran variación de caudal entre los puntos de estudio, como una herramienta para determinar la cantidad de plaguicidas que entra por unidad de tiempo. Por ejemplo, los afluentes Anioia y Rubí presentan niveles de plaguicidas altos, sin embargo, debido a sus bajos caudales, los flujos de masa han resultado ser moderados.

Por lo que respecta a las TUs (Figura 5-8c), en todas las muestras analizadas las TUs en peces han sido insignificantes en comparación con las correspondientes a las algas y *daphnias*. Además de eso, la figura revela patrones de toxicidad bastante distintos para los tres organismos entre los diferentes puntos de estudio, y también algunas diferencias en el tiempo. En el punto más alto del río (punto 2) las TUs correspondientes a las *daphnias* y a las algas son casi de la misma proporción, sin embargo, en el punto más bajo del río se observan variaciones. En la primera campaña las TUs dominantes corresponden a las algas y en las demás campañas a las *daphnias*. Esta correlación está de acuerdo con la alta carga de diurón y terbutilazina (muy tóxicos para algas) en la primera campaña y con una mayor presencia de los insecticidas diazinón y malatión (altamente tóxicos para macroinvertebrados y con un alto potencial de bioacumulación) en las demás campañas. En los afluentes, las algas serían los organismos más afectados en RUB (debido principalmente a la presencia predominante del herbicida diurón), mientras que en el Anioia los organismos más sensibles serían los macroinvertebrados (presencia predominante de los organofosforados diazinón y dimetoato).

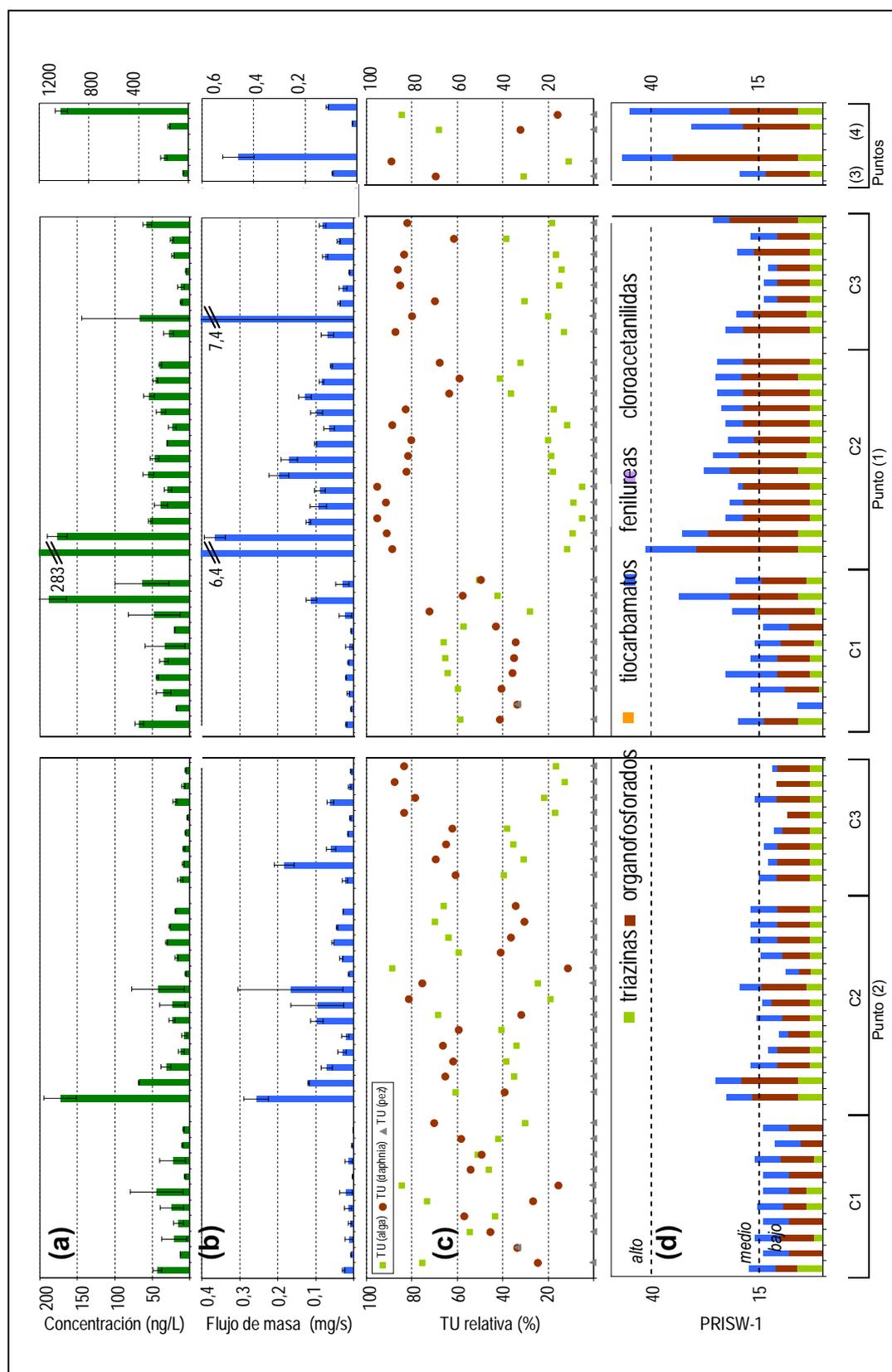


Figura 5 - 8. Resultados separados por campañas: (a) concentración total de plaguicidas; (b) flujo de masa de plaguicidas; (c) unidades tóxicas relativas para los tres organismos acuáticos; e (d) índice PRISW-1 para cada muestra.

Basados en los resultados de TUs (todos < 0,35), los organismos más vulnerables en el río serían los invertebrados acuáticos, mientras que en los afluentes los organismos más sensibles serían las algas. Sin embargo, todos estas TUs son relativamente bajas si se considera que sólo con $TU > 1$, la mezcla de plaguicidas causa efecto en más del 50% de la población, y que si la TU es menor que 1, no hay efecto o el mismo es muy bajo (Silva et al. 2012).

Por último, los índices PRISW-1 para cada muestra se presentan en la Figura 5-8d. Como se puede observar en la figura, ninguna muestra ha presentado riesgos insignificantes. Se han encontrado muestras con riesgo bajo, que significaría un potencial de alteración moderada de las comunidades bióticas acuáticas en el 16% y 58% de las muestras del punto 1 y 2, respectivamente. Riesgo medio, que se ha observado en el 81% y 42% de las muestras del punto 1 y 2, respectivamente, podría significar alteraciones en las comunidades bióticas acuáticas con la muerte local de las especies más sensibles de peces e invertebrados. Finalmente, el riesgo alto, como el que se ha encontrado en los afluentes (50% de las muestras) y en una muestra al inicio de la segunda campaña en el punto 1, significaría un potencial de alteración de las comunidades bióticas acuáticas con la reducción en las especies más sensibles de peces e invertebrados, así como una reducción en potencial de la productividad de la comunidad (Travisi et al., 2004).

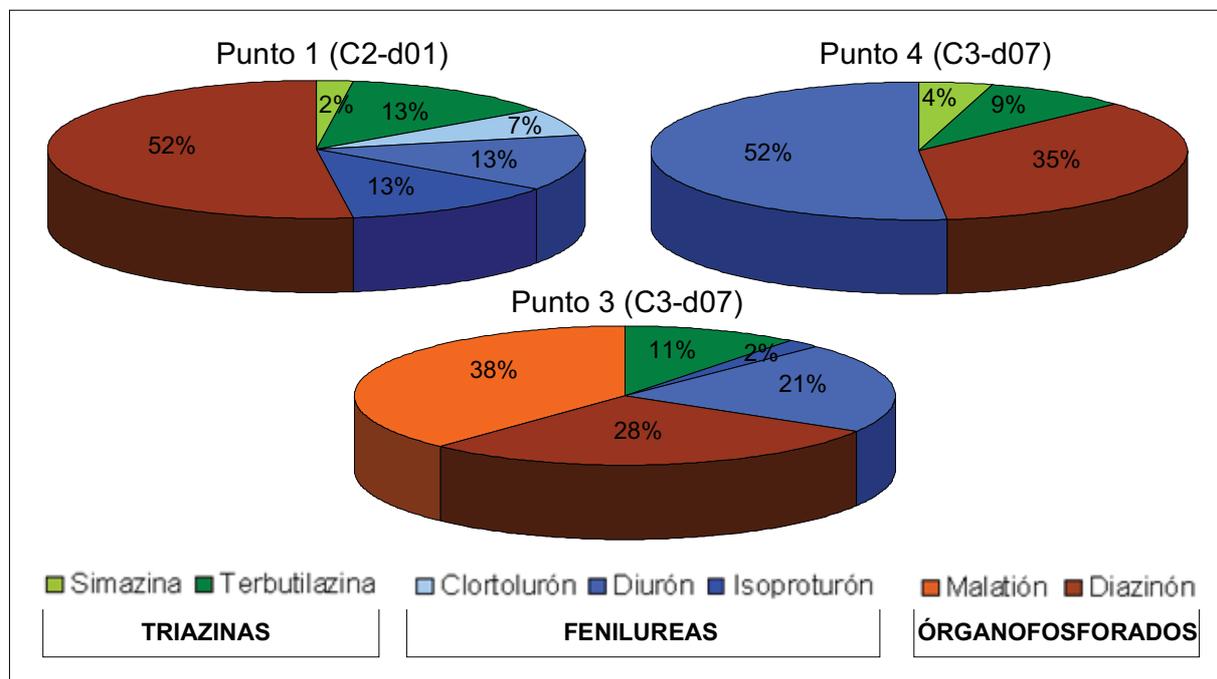


Figura 5 - 9. Contribución individual relativa de los plaguicidas detectados en las muestras que han mostrado los índices PRISW-1 más altos.

En la Figura 5-9 se indican tres muestras con alto riesgo la contribución individual de

los diversos plaguicidas detectados al índice PRISW-1.

Como se muestra en esta figura, los organofosforados diazinón y malatión, y la fenilurea diurón son los principales contribuyentes a la toxicidad global y, por tanto, los plaguicidas más problemáticos. Por familias, los organofosforados seguidos de las fenilureas y después de las triazinas son las clases de plaguicidas más revelantes.

En ríos como el Llobregat la realidad del estado de la comunidad acuática es bastante diferente a la que nos encontramos en el Delta del Ebro en el sentido de que, debido a la dilución que experimentan los plaguicidas al llegar a las bahías del delta tras su paso por los canales de drenaje, las especies de bivalvos que habitan en esta zona están en general expuestas a concentraciones de plaguicidas más bajas que las que soportan los organismos acuáticos de agua dulce donde los niveles de concentración suelen ser mayores (Damásio et al. 2010).

Los resultados del estudio llevado a cabo en el río Llobregat mostraron que, aunque los niveles de plaguicidas que se encuentran en esta cuenca cumplen las NCA, la ERA a través del índice PRISW-1 indica que el control de los plaguicidas en este río no debe ser descuidado, ya que se calcularon riesgos medios y altos para los organismos acuáticos tanto en el río como en dos de sus afluentes. En el punto estudiado más alto del río (punto 2) el riesgo para algas y *daphnias* fue similar, sin embargo, en la parte más baja del río (punto 1), tras la desembocadura de una serie de depuradoras y canales de riego, el riesgo para macroinvertebrados fue mayor. En el río Anoia (punto 3), afluente de bajo caudal y por lo mismo de alta concentración de contaminantes, los niveles de riesgo superaron el valor de 40, indicando un riesgo alto, principalmente para la comunidad de macroinvertebrados. En la riera de Rubí (punto 4), punto con los menores caudales del estudio, las especies más afectadas parecen ser las algas, con niveles de riesgo también por encima del valor de PRISW-1 de 40.

Los principales responsables de estos riesgos clasificados como altos parecen ser: el insecticida diazinón en el punto 1, el insecticida malatión en el punto 3 y el herbicida diurón en el punto 4. Es importante tener en cuenta que la parte baja del río Llobregat recibe aguas de muchas depuradoras por estar en una zona predominantemente urbana, lo que conlleva, tal y como se describe en el Capítulo 3 de esta memoria, la introducción regular de una serie de plaguicidas de uso urbano, entre ellos, el diazinón y el diurón.

5.4. EDARs: estudio del impacto de las aguas residuales en el medio acuático receptor mediante el índice ERPWI.

A pesar de que los plaguicidas son probablemente la clase de contaminantes orgánicos más estudiados en el medio acuático, su presencia y comportamiento en las

EDARs ha sido escasamente estudiado, quizá porque estas sustancias se han considerado de origen típicamente agrícola y no urbano. Sin embargo, independientemente de la fuente, estos contaminantes no sólo están presentes en las EDARs sino que, además, lo están a altas concentraciones (como ya se ha comentado en el Capítulo 3 de esta memoria), lo que significa un riesgo importante para la comunidad acuática de las aguas superficiales, principales receptoras de los efluentes de las EDARs.

Hasta hace poco, los métodos de evaluación de riesgos de plaguicidas en aguas naturales no habían tenido en cuenta la presencia y el grado de eliminación de los plaguicidas en las EDARs. El índice WCSI (del inglés *Water Cycle Spreading Index*) propuesto por Reemtsma y colaboradores (2006), para los contaminantes polares que entran en el ciclo del agua por medio de aguas residuales municipales, considera la concentración de los contaminantes orgánicos en los efluentes y la eliminación relativa de cada uno de ellos en el tratamiento, pero no tiene en consideración la toxicidad de los compuestos para los organismos acuáticos.

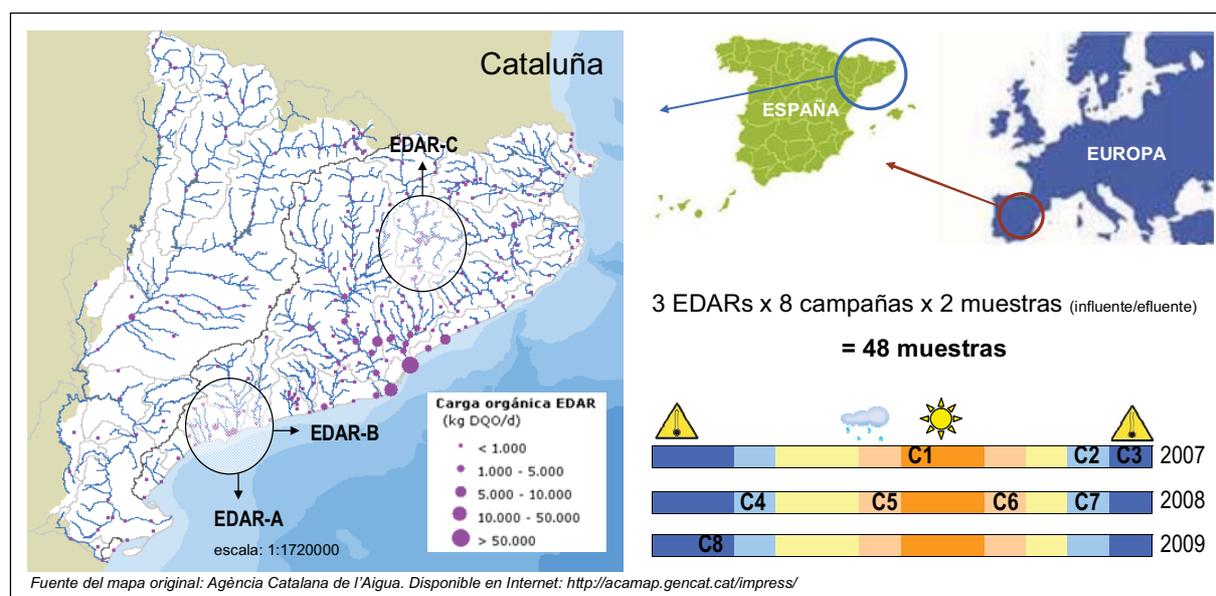


Figura 5 - 10. Mapa de las EDARs en Cataluña caracterizadas por su carga orgánica (demanda química de oxígeno por día - DQO/d) y detalle de la toma de muestras de agua en tres de ellas.

En este contexto, el principal objetivo de este estudio, integrado dentro del proyecto SOSTAQUA (CEN 2007-1039), fue evaluar la relevancia ambiental de esta fuente de plaguicidas para el medio ambiente acuático, teniendo en cuenta no sólo la concentración y grado de eliminación de los plaguicidas durante la depuración de las aguas residuales, sino también su toxicidad en tres organismos representativos del medio acuático: algas, *daphnias* y peces. Para ello, se diseñó un nuevo índice, el ERPWI (del inglés *Environmental*

Relevance of Pesticides from Waste water treatment plants Index), que combina estos tres aspectos y se aplicó a los datos obtenidos del análisis de 22 plaguicidas en aguas residuales y tratadas de tres EDARs durante 8 campañas (ver Figura 5-10). Para más detalles sobre el método de análisis, el desarrollo del índice y las EDARs, consultar la publicación #2.

5.4.1. Resultados

La Figura 5-11 presenta el ERPWI (promedio del índice para cada organismo) de los seis plaguicidas más representativos de cada EDAR, a lo largo de las 8 campañas realizadas. Como se observa en las tres depuradoras, el diazinón fue el único plaguicida en presentar un riesgo muy alto para el medio ambiente, lo que está de acuerdo con su bajísimo EC_{50} y sus altas concentraciones en las EDARs. Le siguen el diurón, uno de los herbicidas más tóxicos para algas, y la simazina, una triazina muy recalcitrante.

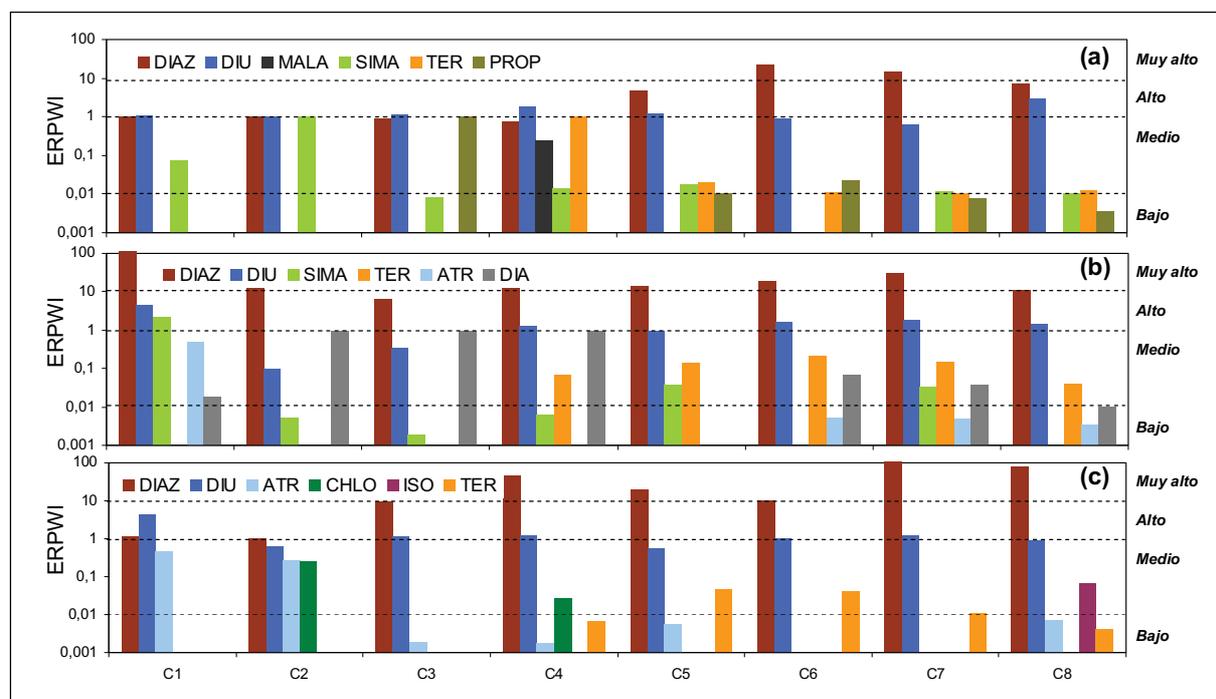


Figura 5 - 11. ERPWI de los 6 plaguicidas más representativos de cada EDAR, separados por campaña: (a) EDAR-A; (b) EDAR-B; (c) EDAR-C.

Por otra parte, todas las EDARs (A, B y C) presentaron índices en su mayoría indicativos de un nivel de riesgo ecológico medio (con 59, 45 y 40% de sus índices en ese nivel de riesgo, respectivamente). La EDAR-A, la única que trabaja con un tratamiento terciario, es la que presentó el menor número de índices en el nivel de riesgo muy alto (6%, frente a 16% y 13% en las EDAR-B y C, respectivamente), lo que es coherente debido a que, como ya se ha discutido en el Capítulo 3 (ver Figura 3-5), el diazinón se elimina

considerablemente tras tratamientos químicos (terciarios). Al comparar los índices por campaña no se observó ninguna diferencia significativa, tan sólo la presencia de la terbutilazina a un nivel de riesgo medio a partir de la cuarta campaña (realizada en marzo de 2008). Cabe recordar que la prohibición de la simazina y la atrazina en 2004 ha causado que otras triazinas como la terbutilazina hayan empezado a usarse en grandes proporciones a partir de junio de 2007, fecha límite de uso de esas dos triazinas.

La Figura 5-12 muestra comparativamente (a) la eliminación de los distintos plaguicidas en las EDARS (promedio las tres plantas); (b) los resultados del cálculo del índice WCSI, propuesto por Reemtsma y colaboradores en 2006 (Reemtsma et al. 2006) y que tiene en cuenta únicamente la concentración y el grado de eliminación de cada plaguicida, y (c) los resultados del cálculo del índice ERPWI en el conjunto de las muestras estudiadas. La diferencia en los resultados obtenidos con ambos índices muestra claramente la importancia de tener en cuenta la toxicidad de los compuestos para los distintos organismos acuáticos, ya que si bien en base al WCSI los plaguicidas más relevantes son el diazinón, el mecoprop y el diurón, según el ERPWI el herbicida ácido mecoprop es uno de los menos relevantes. La explicación se puede encontrar en su toxicidad acuática, que es extremadamente baja (237, 420 y 150 mg/L para las algas, *daphnias* y peces, respectivamente), en contraste con la del herbicida diurón (0,0027, 12 y 4,3 mg/L) y el insecticida diazinón (6,4, 0,001 y 3,1 mg/L). La sensibilidad del índice se comprobó trazando el ERPWI en función de la concentración de cada plaguicida a la salida y entrada de cada EDAR, dando resultados satisfactorios (ver publicación #2).

Como ya se ha comentado anteriormente, las aguas regeneradas suelen ser reutilizadas mientras que las tratadas pero no regeneradas suelen ser vertidas a ríos y mares, por lo que es comprensible que el perfil de contaminación de los ríos guarde una cierta relación con el perfil de contaminación de las aguas tratadas. Esta relación puede ser más o menos acentuada dependiendo principalmente de la concentración de EDARs en la zona del río estudiada.

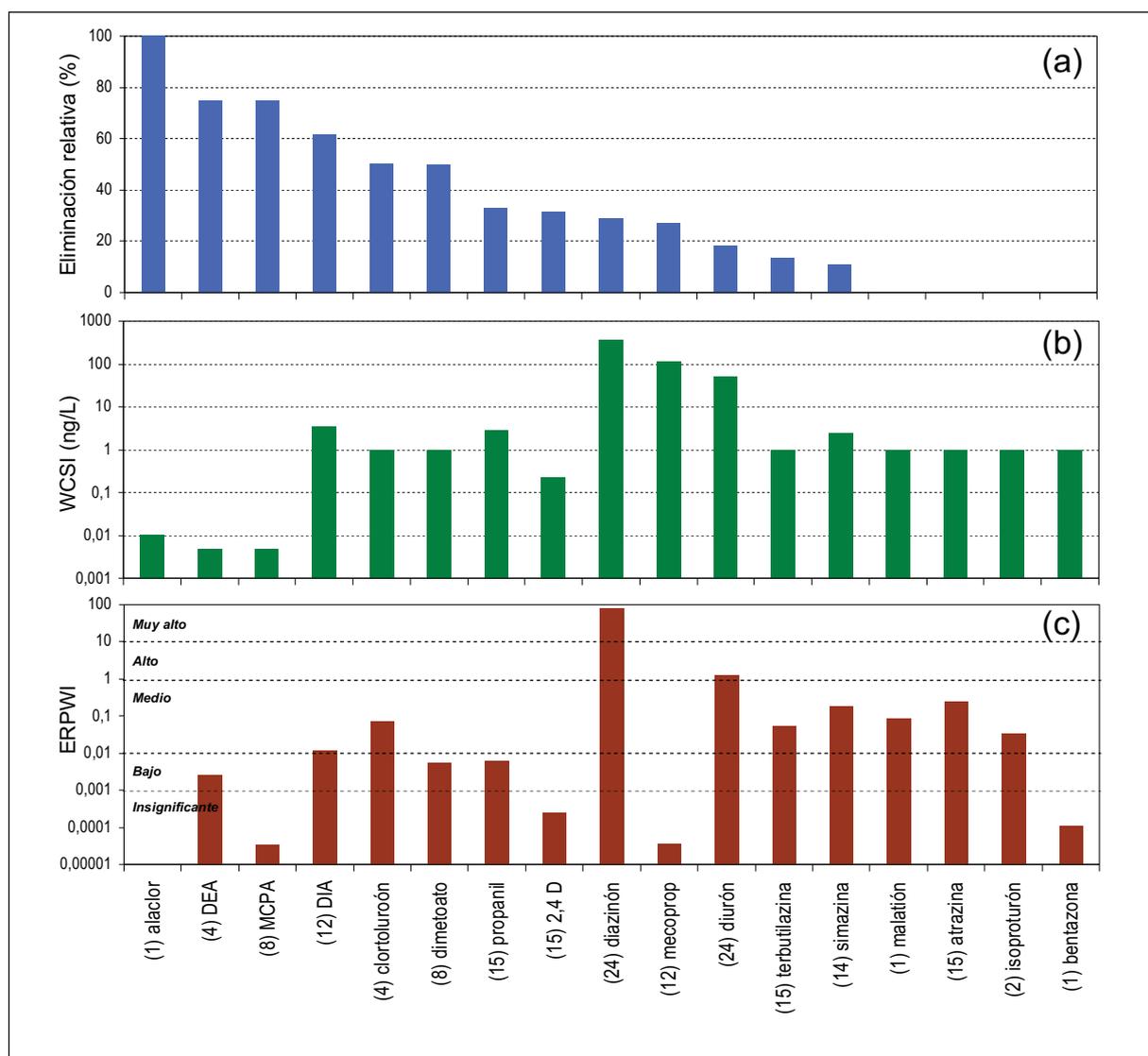


Figura 5 - 12. (a) Eliminación relativa media de los plaguicidas detectados en las tres EDARs; (b) índice WCSI (calculado según Reemtsa et al. 2006); (c) índice ERPWI (valor medio correspondiente a las tres EDARs y los tres organismos). Números en paréntesis indican el número de casos.

En este estudio, los resultados del índice ERPWI (creado a partir de datos de eliminación, concentración y toxicidad de cada plaguicida en muestras de agua residual) mostraron un perfil bastante similar al presentado en el apartado anterior como resultado de la ERA en aguas del río Llobregat. De acuerdo con este índice, los compuestos más problemáticos en el área de estudio son el diazinón y el diurón, seguidos (en este orden) por la atrazina, la simazina, el malatión, el clortolurón, la terbutilazina y el isoproturón. La mayoría de estos compuestos (diurón, atrazina, simazina e isoproturón) están incluidos en la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la DMA (Directiva 2000/60/CE) y están sujetos a NCA, circunstancia que viene a validar en parte el índice desarrollado. Pero, ¿estos

efluentes representan realmente un peligro para la comunidad acuática tras su dilución en ríos de medio y alto caudal? Bunzel y colaboradores estudiaron los efectos de los contaminantes orgánicos provenientes de las EDARs (entre ellos plaguicidas) en las comunidades de invertebrados acuáticos, para lo cual relacionaron la presencia de una serie de macroinvertebrados en diversos puntos, la toxicidad teórica de una serie de insecticidas y fungicidas para esos organismos (por medio de TUs e índices) y la proximidad de diversas EDARs a los puntos donde se encontraron las especies más sensibles, concluyendo que las EDARs siguen siendo una fuente importante de contaminantes orgánicos que agotan el oxígeno y afectan a las comunidades acuáticas (Bunzel et al. 2013).

5.5. Predicción de niveles de contaminación en el río Llobregat

Se llevó a cabo la aplicación de un modelo predictivo de concentración de contaminantes en el río Llobregat con el fin de predecir niveles de plaguicidas en puntos del río donde no hay datos disponibles, a partir de datos reales de concentración y flujos de otros puntos del río (ver publicación #3). Para ello, se consideró el río como una unidad unidimensional, es decir, donde el flujo de aguas se da en tan sólo una dirección. Además, se consideraron fuentes de entrada y salida de aguas.

Con el objetivo de ayudar a restituir el caudal del río Llobregat con una parte (hasta $3,25 \text{ m}^3/\text{s}$) de las aguas regeneradas de la EDAR El Prat de Llobregat, en 2008 se construyó una conducción desde la salida de la EDAR hasta un punto de vertido en el río situado aguas arriba, a la altura de Molins de Rei. Para evaluar el posible impacto de estas aguas en la calidad del agua del río, se tomaron muestras de agua a 0,2 km aguas arriba del punto de vertido de las aguas regeneradas (1), en la zona de captación de agua del río para la potabilización en Sant Joan Despí (2) y a la salida de las aguas regeneradas en la EDAR (3) correspondientes también a las aguas de vertido a la salida de la conducción de las aguas regeneradas (ver Figura 5-13 - en este apartado sólo se muestran las muestras relevantes para este capítulo), y se analizaron tal y como se describe en la publicación #3. Los datos del caudal (Q) del río se obtuvieron de la Agència Catalana de l'Aigua (ACA) y corresponden al caudal a la altura de la entrada de la estación de tratamiento de agua potable (ETAP), es decir, en Sant Joan Despí (2). Los datos correspondientes al caudal de salida del agua regenerada de la EDAR El Prat se obtuvieron directamente de la estación de tratamiento de agua residual.

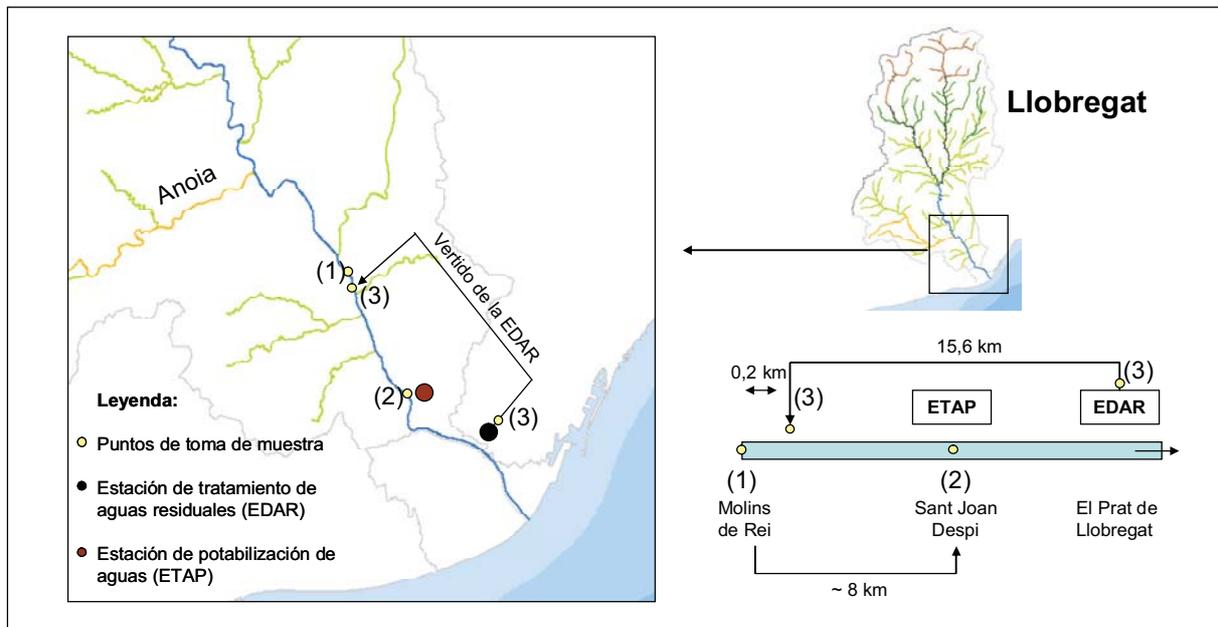


Figura 5 - 13. Características de la zona de estudio.

La modelación matemática del flujo de agua en un río consiste en intentar conocer los valores que toman las variables relacionadas (concentración, calado, velocidades, caudal, etc.) a partir de la resolución por métodos numéricos de unas ecuaciones obtenidas con una serie de hipótesis (Cea y Bladé, 2013). Las hipótesis (H) que se mantuvieron en este modelo de balance de flujo de masa son:

- H1: el movimiento del río es unidimensional
- H2: el fondo es fijo y no erosionable: esto sin duda tiene influencia en los niveles de agua.
- H3: hay conservación de masa. Al tratarse de plaguicidas polares y poco volátiles, la pérdida por volatilización o adsorción a materiales menos polares (por ejemplo, sedimentos) se asume insignificante. Debido al corto espacio de tiempo del estudio, la degradación también se considera insignificante.
- H4: no hay más captaciones de agua o afluentes del río que las consideradas en el modelo: esto se puede aplicar cuando efectivamente eso ocurre y cuando el flujo de agua estimado de las captaciones o afluentes son insignificantes en relación con el caudal y las entradas y salidas de agua consideradas en el modelo (Q_1 y Q_2).

Con las hipótesis establecidas, se crearon las relaciones matemáticas entre caudal (Q), concentración de plaguicidas (C) y flujo de masa (F), variables relevantes para este modelo. El esquema gráfico y las ecuaciones del modelo se presentan en la Figura 5-14 y los caudales reales y calculados en la Figura 5-15.

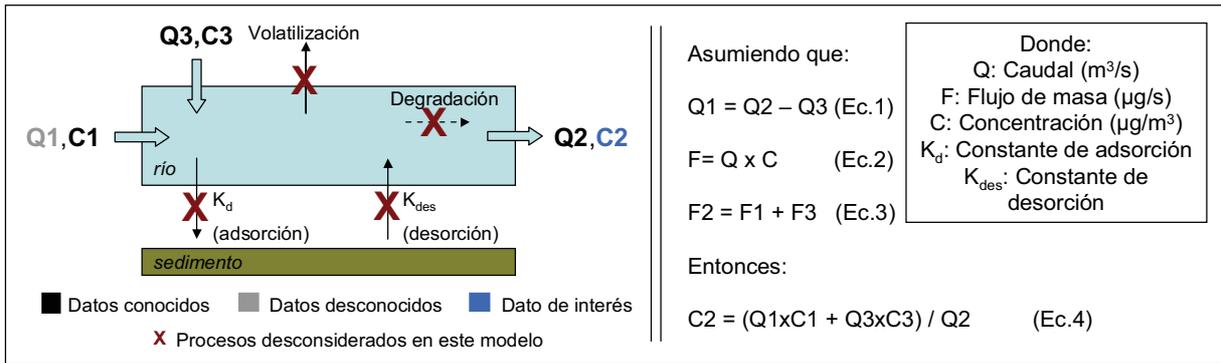


Figura 5 - 14. Detalles del modelo de balance de flujo de masa adoptado en la parte baja del río Llobregat: diagrama y ecuaciones.

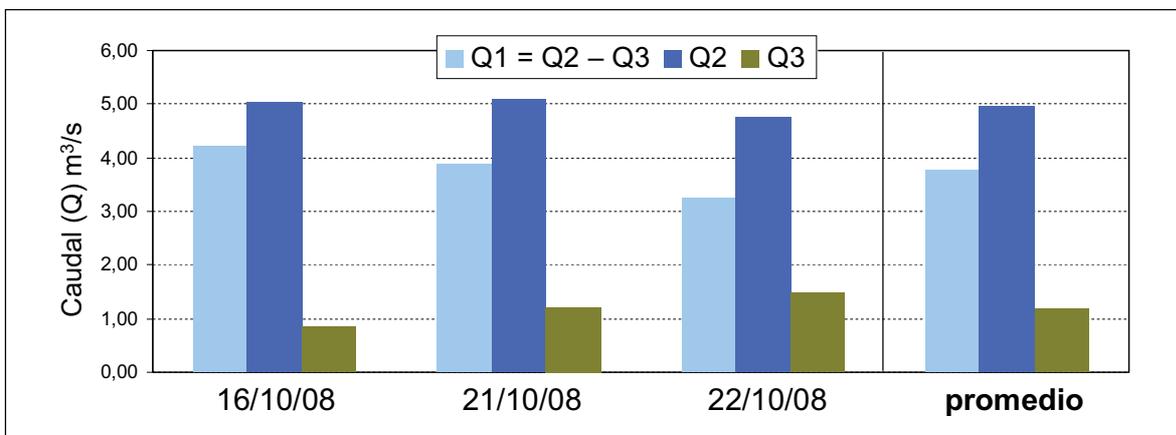


Figura 5 - 15. Caudal (m³/s) de los diferentes puntos estudiados en las 3 campañas de muestreo realizadas.

5.5.1. Resultados

El modelo matemático se aplicó para obtener concentraciones teóricas de plaguicidas a la altura de Sant Joan Despí (2). Para estudiar la eficacia del modelo, las concentraciones obtenidas con el modelo se compararon con las concentraciones reales de ese punto (resultados en la publicación #3). La Figura 5-16 presenta la correlación de ambas concentraciones.

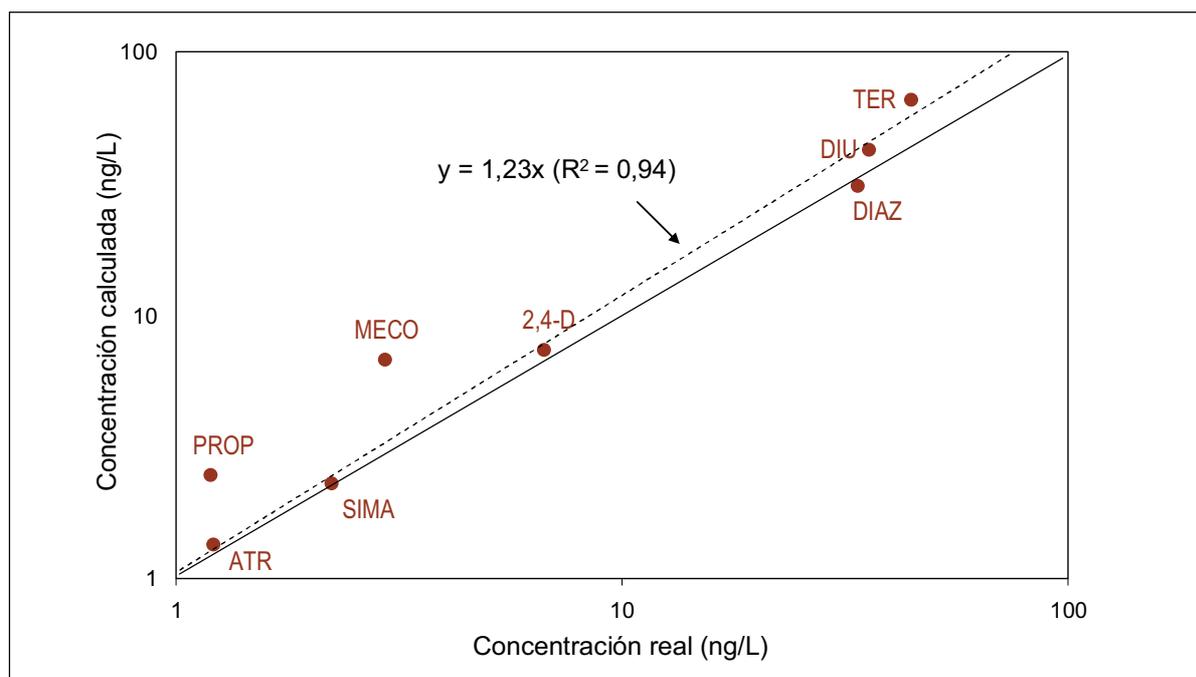


Figura 5 - 16. Correlación entre el promedio de la concentración real (eje x) y la concentración calculada (eje y) de los plaguicidas detectados (8 de un total de 22) en el punto (2) del estudio. Línea continua: correlación ideal; línea discontinua: correlación real.

En muchos casos el R^2 suele ser usado como un criterio de valoración de la capacidad de explicación de los modelos debido a que representa el porcentaje de la varianza justificado por la variable independiente. En este caso el R^2 indica una muy buena correlación entre los datos ($R^2 > 0,9$). La pendiente de la recta generada a partir del gráfico de correlación nos indica que en general las concentraciones calculadas se encuentran en promedio un 23% por encima de las respectivas reales. La sobreestimación observada en los resultados de concentraciones podría atribuirse a varias razones, todas ellas basadas en desviaciones de la ecuación Ec.4. Entre estos factores, se pueden citar dos:

- el no cumplimiento de la hipótesis H3 (sobre la conservación de masa), causando la desaparición de los compuestos por algún tipo de mecanismo de degradación (química o biológica), adsorción o transformación en cantidades significativas, o bien la aparición de más compuestos por escorrentía superficial tras su aplicación en la zona de estudio.
- el no cumplimiento de la hipótesis H4 (sobre las entradas y salidas de caudales) por la posible existencia de alguna entrada de agua (corriente, descarga, etc.) entre los puntos (1) y (2) causando un efecto de dilución, lo que justificaría que las concentraciones reales hayan estado por debajo de las concentraciones calculadas.

Sin embargo, este segundo factor afectaría a todos los compuestos por igual y eso no se observa: atrazina, simazina, 2,4-D y diazinón presentaron niveles de concentración calculada prácticamente iguales a las reales. Por ese motivo, el primer factor es más factible puesto que es dependiente de las propiedades físico-químicas de los compuestos. Por otro lado, el mecoprop y el propanil son los plaguicidas que presentaron las concentraciones más bajas en relación con las calculadas, sin embargo sus propiedades físico-químicas no consiguen justificar tales observaciones. Es importante resaltar que una variación de tan sólo el 20% puede ser aleatoria y estadísticamente insignificante, considerando el bajo número de muestras estudiadas. Para reafirmar las observaciones hechas, serían necesarios estudios con un número mayor de muestras.

Como observación general, la ecuación de balance de flujo de masa podría calificarse como una herramienta valiosa para predecir concentraciones de contaminantes aguas abajo si se conocen los flujos y las concentraciones (del río y de las descargas de los efluentes) que ocurren aguas arriba, y si la distancia es moderada.

Otros investigadores también han hecho uso de una serie de modelos para predecir, estimar y valorar la presencia de plaguicidas en el medio ambiente acuático. En 2008, Comoretto y colaboradores analizaron campos de cultivo de arroz en el delta del río Ródano, en Francia, por medio de modelos de escorrentía y concluyeron que este tipo de actividad comportaba importantes cargas de plaguicidas disueltos sobre los humedales (Comoretto et al. 2008). Más recientemente, en 2011, investigadores alemanes y australianos (Burgert et al. 2011) usaron modelos del tipo GIS (sistemas de información geográfica, del inglés *Geographic Information System*) para predecir el riesgo de escorrentía de insecticidas a aguas superficiales. Además de eso, predijeron por medio de modelos los efectos ecológicos causados por esos insecticidas en la comunidad de macroinvertebrados, resultando en un modelo muy útil debido a que su uso permite identificar de forma confiable áreas de alto riesgo de exposición a insecticidas sin altos costes de laboratorio.

5.6. Modelo dinámico medioambiental del río Llobregat

Con la finalidad de crear un modelo dinámico del río Llobregat basado en las características del río y en los datos reales de concentración de plaguicidas producidos durante los estudios de doctorado, se realizó una estancia de 3 meses en el grupo de Ecología Acuática & Gestión de la Calidad del Agua (Aquatic Ecology and Water Quality Management Group) de la Universidad de Wageningen, en Holanda.

Los objetivos del trabajo fueron los siguientes:

- Aprender las técnicas de diseño de modelos dinámicos ecológicos;
- Aplicar los modelos a datos generados durante los estudios de doctorado

- Llegar a elucidar en mayor profundidad el comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente.

Para ello, se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- Selección del mejor programa hidrológico: Tras haber evaluado los datos disponibles de plaguicidas en aguas ambientales y los programas que se pueden aplicar a los fines propuestos, se seleccionaron el programa hidrológico DuFlow Modelling Studio (DMS) y el modelo OMIVE (del holandés *Organische MicroVErontreinigen* - para describir el comportamiento y el destino de microcontaminantes orgánicos en aguas superficiales unidimensionales).
- Recogida de datos: Se contactaron agencias y centros catalanes y españoles con el fin de adquirir datos de interés para la creación del modelo. También se realizó un estudio bibliográfico en busca de variables y propiedades tanto del ecosistema de estudio, como de los microcontaminantes a ser evaluados en el modelo.
- Creación del modelo: El modelo DuFlow comprende el desarrollo de 3 partes: la NET (la network), el DUFLOW (modelo de flujo) y el OMIVE (modelo de microcontaminantes).

La Network es un editor gráfico que permite dibujar de forma interactiva la esquematización de toda una red, en este caso, del río Llobregat. La Network del Llobregat que se decidió modelar comienza a la altura de *Castellbell i el Vilar* y termina a la altura de *Sant Joan Despí*, resultando en 50 kilómetros de río.

El modelo OMIVE describe el comportamiento y el destino de los contaminantes orgánicos en aguas superficiales unidimensionales. Este modelo considera los siguientes procesos:

- la absorción que ocurre en: la materia en suspensión (SS, del inglés *suspended solid*), el carbono orgánico particulado (POC, del inglés *particulate organic carbon*) y disuelto (DOC, del inglés *dissolved organic carbon*), y el carbono orgánico correspondiente a algas (AOC, del inglés *algae organic carbon*),
- intercambio con la parte inferior (capa superior del sedimento) del sistema,
- intercambio con la atmósfera,
- la degradación.

La Figura 5-17 presenta los principales componentes y procesos de transporte que se consideran en el modelo OMIVE. Todos los procesos se analizan a partir de la cantidad del analito disuelto en agua (C_{W-dis}), cantidad adsorbida al carbono orgánico disuelto (C_{W-DOC})

y al carbono orgánico particulado (C_{W-POC}), todo esto tanto en el agua como en el sedimento. Es importante que también se considere la cantidad adsorbida al carbono orgánico del alga (C_{W-AOC}).

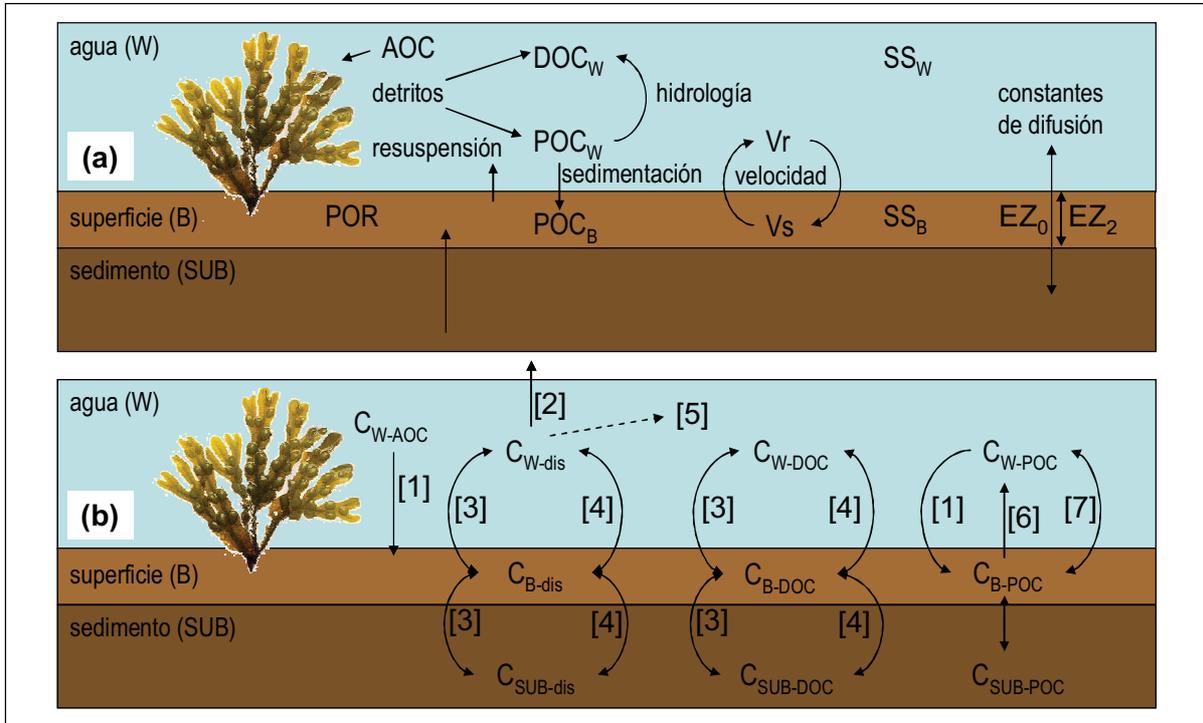


Figura 5 - 17. El sistema: (a) principales componentes (POR: porosidad); (b) descripción de los principales procesos de transporte del modelo OMIVE: [1] sedimentación, [2] volatilización, [3] difusión, [4] advección, [5] degradación, [6] resuspensión, [7] pseudo advección

Las ecuaciones de balance de masa de los micro-contaminantes adoptado por el modelo OMIVE se basan en un equilibrio de adsorción tal y como se describe en la Figura 5-18.

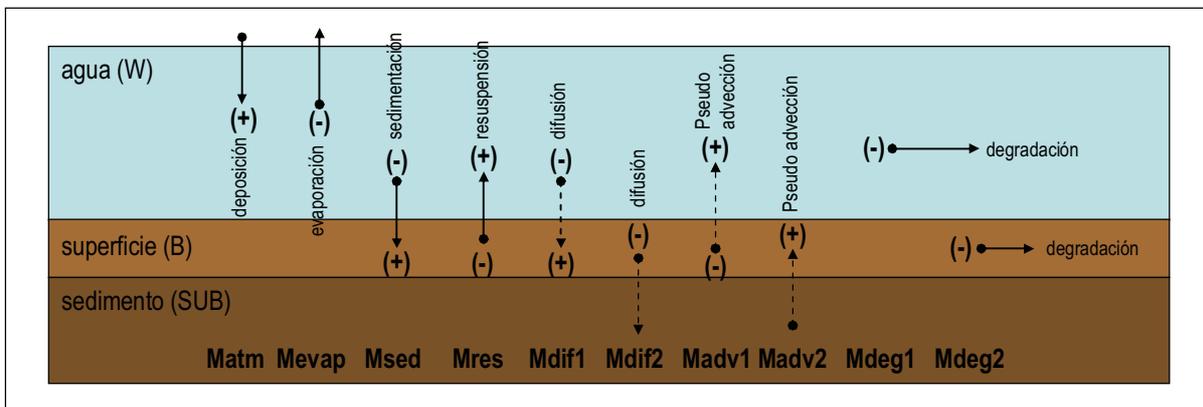


Figura 5 - 18. Equilibrio de masa adoptado por el modelo OMIVE.

5.6.1. Resultados

Para la creación de la network se consultaron datos sobre cartografía (shape files y coordenadas exactas de puntos estratégicos del río y sus afluentes), afluentes del río (localización, geometría del lecho, anchura y profundidad), lecho del río (geometría del lecho del río, anchura y profundidad), presas (localización, geometría y función de la presa – captación, hidroeléctrica, etc.), captación de aguas en el río Llobregat (localización y datos cronológicos de caudal de captación), descarga de aguas en el río Llobregat (localización y datos cronológicos de caudal y otras propiedades del agua descargada), y flujo de agua del río y afluentes (datos cronológicos de caudales). Para la obtención de estos datos se contactaron las siguientes agencias, centros y/o institutos: AGBAR (Aigües de Barcelona), ACA (Agència Catalana de l'Aigua), ICC (Instituto de Cartografía de Cataluña), CNIG (Centro Nacional de Información Geográfica), IDEC (Infraestructura de datos especiales de Cataluña), IGN (Instituto Geográfico Nacional), AEMET (Agencia Estatal de Meteorología), MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), entre otros. La Figura 5-19 muestra la Network finalizada.

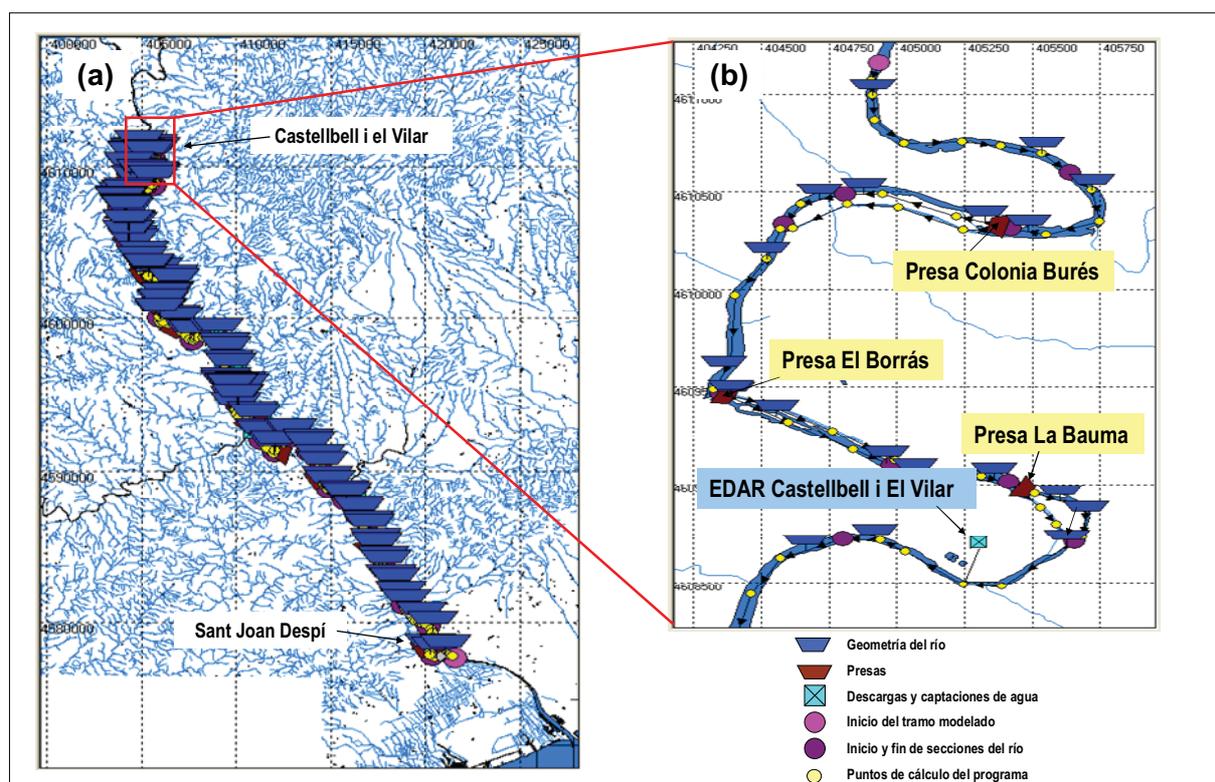


Figura 5 - 19. La Network: (a) visión general del tramo de 50 km de río modelado; (b) detalle del primer tramo modelado.

Modelo de flujo (DUFLOW)

Para dar inicio al modelo de flujo, se definieron las condiciones iniciales que consisten en una serie de parámetros entre ellos la descarga inicial del río, la fecha de inicio y fin de cálculo y la escala temporal de análisis. La Figura 5-20 muestra el estado de los puntos del río durante un periodo de 72 hrs.

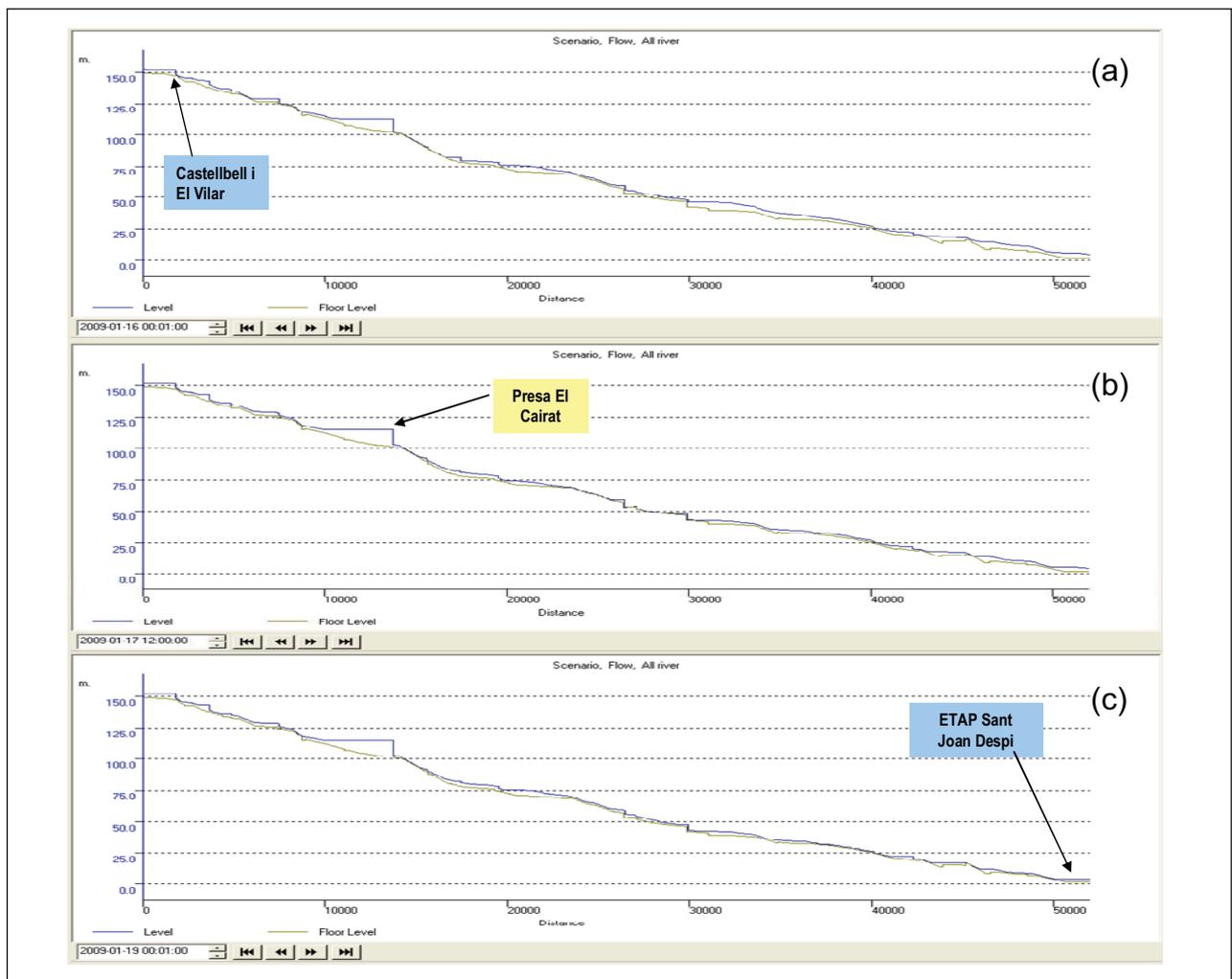


Figura 5 - 20. Modelo de flujo del río durante un periodo de 72 hrs: (a) en condiciones iniciales; (b) tras 36 hrs; (c) tras 72 hrs.

Analizando los datos desde un punto de vista cronológico, la Figura 5-21 muestra la evolución del flujo en dos puntos del río: antes y después de la captación de agua en Sant Joan Despí durante un periodo de 72 horas.

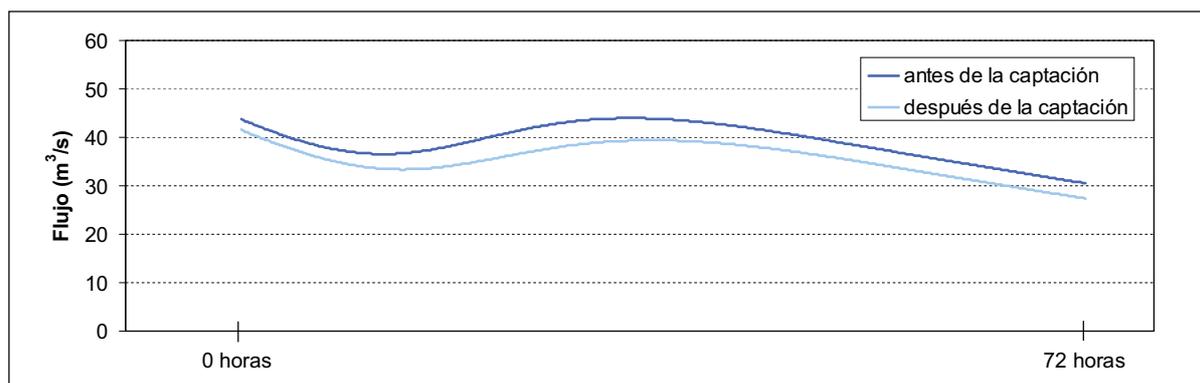


Figura 5 - 21. Evolución del flujo antes y después de la captación de agua en Sant Joan Despí durante un periodo de 72 horas.

La diferencia de flujo observada entre los dos puntos (aprox 4 m³/s) se debe, como era de esperar, a la captación de agua que ocurre en ese punto, en la ETAP Sant Joan Despi.

En resumen, la creación de la network se realizó con éxito. El modelo hidrológico DUFLOW hasta este momento es viable para un pequeño espacio de tiempo debido, entre otros aspectos, a la complejidad de la matriz de estudio, el río Llobregat. La búsqueda de datos al respecto de este río, el ajuste de parámetros y la búsqueda de las condiciones iniciales para la aplicación del modelo de flujo se han visto parcialmente impedidos a causa de la complejidad del río. En este punto, queda pendiente aplicar el modelo de flujo para grandes espacios de tiempo, para poder ejecutar el modelo de microcontaminantes (modelo OMIVE).

5.7. Discusión de los resultados

5.7.1. Los plaguicidas más relevantes

Cabe destacar que los plaguicidas más problemáticos antes mencionados (diazinón, diurón, malatión, terbutilazina) están en los puestos más altos en la lista de clasificación de evaluación de riesgos elaborada por von der Ohe y colaboradores para la priorización de 500 contaminantes orgánicos (clásicos y emergentes), debido a su alto potencial contaminante de cuencas fluviales, en el marco de la política de aguas de la UE (von der Ohe et al. 2011). El estudio generó una clasificación de los contaminantes en seis categorías en función de la información disponible, lo que permite a las entidades reguladoras poder evaluar y decidir sobre acciones futuras (aplicación de NCA, mejora de métodos de análisis, campañas de vigilancia, etc). En cada categoría, los compuestos fueron ordenados en base a la frecuencia y el grado en el que los mismos superaron sus

correspondientes PNECs. El diazinón está en la categoría uno, en el primer lugar de la lista, reservada a los compuestos con datos suficientes de toxicidad para la aplicación de NCA, debido a que los niveles de exposición a los mismos indican un peligro potencial (la acción en este caso consistiría en la aplicación de NCA y la inclusión en programas de vigilancia). Dentro de la misma lista y categoría se encuentran la terbutilazina y el diurón, ocupando el tercer y séptimo lugar respectivamente. Por otro lado, el malatión se encuentra en la segunda categoría (en la 9ª posición), reservada a compuestos con informaciones consistentes de riesgos y que hayan sido detectados en el medio ambiente pocas veces, razón por la cual los autores proponen una revisión más intensa de los estudios llevados a cabo sobre esta categoría de compuestos, con el objetivo de recopilar más información sobre su riesgo. Los resultados obtenidos por Ginebreda y colaboradores también muestran coherencia con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, al proponer la priorización del diurón, la terbutilazina y principalmente del diazinón (entre otros), tras un estudio de ERA llevado a cabo en el río Llobregat (Ginebreda et al. 2014).

Pero no sólo los plaguicidas en su forma inicial representan un peligro para la comunidad acuática. La mayoría de los productos de transformación de plaguicidas suelen ser más polares, están presentes en muchos casos a concentraciones por encima de la de los respectivos plaguicidas y en algunos casos son mucho más tóxicos. Es el caso, por ejemplo, del malaoxón (producto de transformación del malatión), mucho más tóxico que el malatión y presente a más concentración en moluscos del delta del Ebro (publicación científica #4). Lamentablemente, en muchos casos la falta de información sobre la formación de estos compuestos y sus propiedades físico-químicas y tóxicas dificulta su estudio en el medio ambiente. En 1998, Belfroid y colaboradores analizaron los riesgos para los ecosistemas acuáticos asociados de 78 productos de transformación de plaguicidas, y sólo encontró propiedades físico-químicas para el 30-40% de ellos (Belfroid et al. 1998). Según este estudio, en general, más del 50% de los productos de transformación de triazinas, carbamatos y ácidos fenoxipropiónicos presenta, en teoría, un riesgo similar o mayor que el plaguicida de origen, mientras que más del 50% de los productos de transformación de los piretroides sintéticos, plaguicidas órganofosforados y ditiocarbamatos presentan un riesgo menor. Hoy en día, después de 15 años, la información al respecto de los productos de transformación aún continúa siendo insuficiente.

5.7.2. Las NCA y el riesgo ambiental

Varios estudios combinando el análisis químico de plaguicidas (a veces junto con otros contaminantes orgánicos) con estudios de toxicidad o ecotoxicidad identifican a los plaguicidas como los posibles responsables de efectos tóxicos observados en la comunidad

acuática, en situaciones con frecuencia en las que las NCA no se superan. Por ejemplo, un estudio realizado en el río Llobregat por Ricart y colaboradores puso de manifiesto una posible relación entre los herbicidas de tipo triazina y alteraciones en la distribución de las comunidades de diatomeas, y también algunos efectos de plaguicidas órganofosforados y fenilureas en aspectos estructurales y funcionales de los *biofilms*, a pesar de que ninguno de los plaguicidas analizados (22 en total) superó las NCA en ninguna de las muestras de agua investigadas (un total de 28 muestras procedentes de 7 puntos distintos y tomadas a lo largo de cuatro campañas en 2005 y 2006) (Ricart et al. 2010). Otro ejemplo es el trabajo realizado por Schafer y colaboradores en 24 puntos de agua superficial de Australia durante 5 meses. Tras el uso de índices y correlaciones, Schafer sugiere que la comunidad de macroinvertebrados en el medio acuático se ve efectivamente afectada al punto de sufrir cambios como producto de su exposición a insecticidas y fungicidas aun cuando éstos no superen las concentraciones máximas permitidas (Schafer et al. 2011).

Todos estos antecedentes sugieren un impacto negativo de los plaguicidas en la comunidad acuática aun cuando éstos no superan las NCAs, observación compartida en esta Tesis Doctoral en base a los resultados de ERA obtenidos a lo largo de los diversos estudios realizados y al número de casos en los cuales tanto las muestras como los plaguicidas han superado las NCAs de normativas vigentes.

En relación al estado general de todas las aguas analizadas durante esta Tesis Doctoral, y tomando como referencia las NCA, más restrictivas, establecidas en la Directiva 2006/118/CE para aguas subterráneas (100 y 500 ng/L para plaguicidas individuales y totales, respectivamente), se ha visto que 19 de los 22 plaguicidas estudiados en aguas naturales (subterránea, superficial) o con destino final el medio ambiente (agua tratada) superaron los 100 ng/L en por lo menos uno de los estudios llevados a cabo (Figura 5-22). Los únicos plaguicidas que nunca presentaron valores superiores a 100 ng/L fueron los herbicidas isoproturón y mecoprop, así como la triazina prohibida desde 2002, cianazina. Por otro lado, el herbicida prohibido propanil, el molinato, el MCPA, la bentazona, así como los insecticidas malatión y el ya prohibido fenitrotión (todos ellos de intenso uso en el cultivo del arroz) superaron los 100 ng/L tan sólo en el Delta del Ebro, en 9, 69, 73, 86, 58 y 22% de las muestras, respectivamente. El herbicida diurón fue el único en superar los 100 ng/L por lo menos una vez en cada uno de los cuatro estudios de campo llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, y cuatro herbicidas superaron la NCA sólomente en aguas subterráneas: linurón, metolacloro, y los productos de transformación deisopropilatrazina y desetilatrazina (en 0,4, 0,8, 1,7 y 10,7% de las muestras, respectivamente). Clortolurón, dimetoato, 2,4-D, atrazina y diazinón superaron los 100 ng/L en por lo menos dos estudios y varias veces, pero principalmente en las aguas tratadas (4,2, 4,2, 8,3, 12,5 y 20,8% de las muestras).

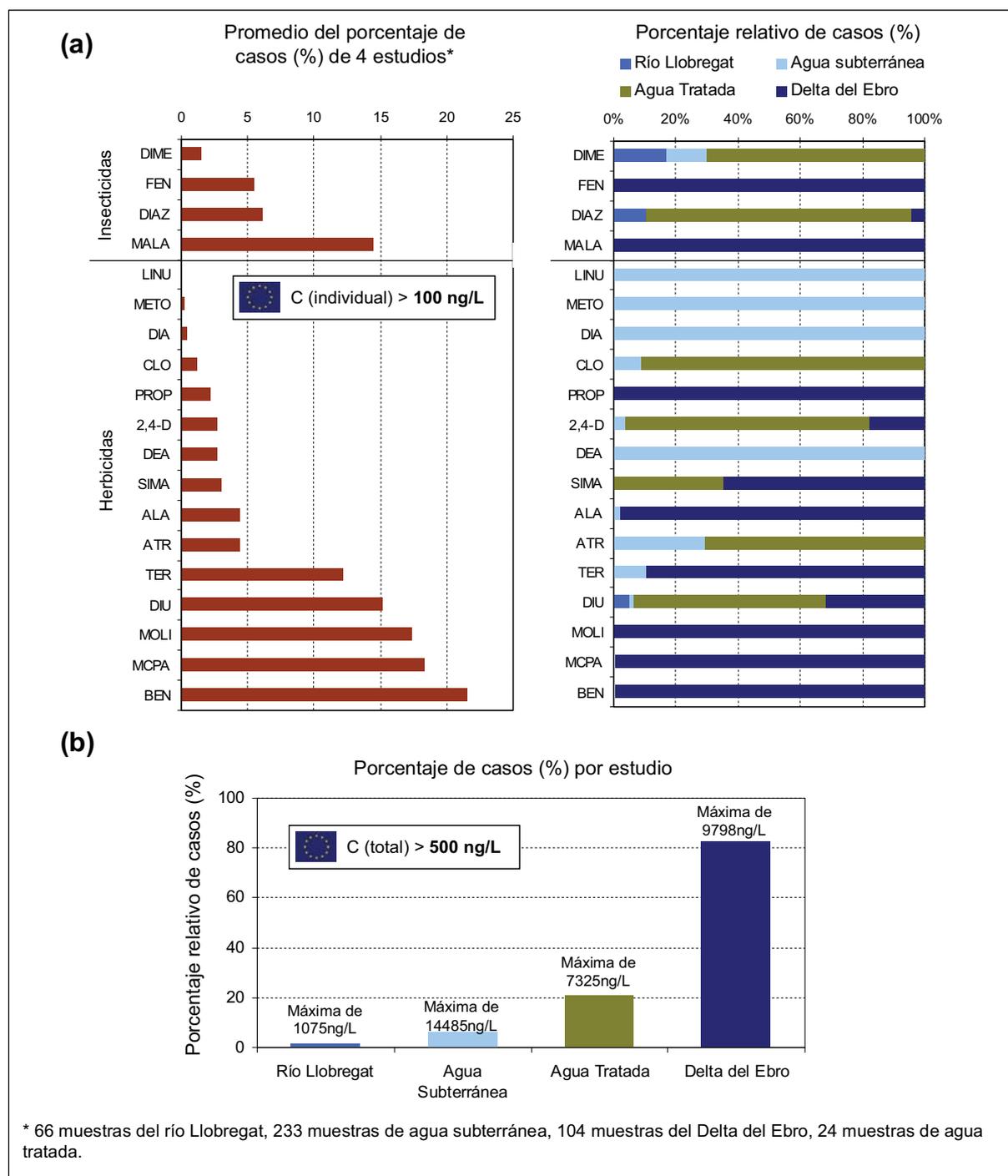


Figura 5 - 22. Resumen de casos en los que los plaguicidas estudiados han superado las NCA establecidas en la Directiva 2006/118/CE: (a) niveles de plaguicidas individuales > 100 ng/L; (b) niveles de plaguicidas totales > 500 ng/L.

En el caso de la NCA para plaguicidas totales, 16% de las 640 muestras de agua analizadas mostraron niveles por encima de 500 ng/L. Cabe señalar que durante los estudios de recarga artificial de acuíferos ningún plaguicida o muestra superó las NCA, razón por la cual tales muestras no se citan en el resumen presentado en la Figura 5-22.

Los otros 4 estudios presentaron por lo menos una muestra superando este umbral.

Se trata de 1 muestra de la cuenca del río Llobregat (riera de Rubí), 14 muestras de agua subterránea (la mayoría en Lleida, M48), 5 muestras de agua tratada (de EDARs sin tratamiento terciario) y 86 muestras del Delta del Ebro (99% de las salidas de los canales de riego y 48% de las bahías). Estas muestras no sólo superaron los 500 ng/L de plaguicidas totales, sino que incluso alcanzaron concentraciones máximas de 1075, 14485, 7325 y 9798 ng/L por estudio, respectivamente.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES



Conclusiones

The following conclusions can be drawn from the work done during the Doctoral Thesis:

- ❖ The analytical methods developed for the analysis of different chemical classes of pesticides and transformation products in water (online SPE-LC-ESI-MS/MS) and sediment (PLE followed by SPE and LC-ESI-MS/MS) show high sensitivity (with limits of determination for most of compounds between 0.01-1.00 ng/L and 0.15-3.00 ng/g, respectively), high selectivity (provided by the use of two SRM transitions for compound ensuring correct confirmation of the analytes) and reliability of results (due to the use of the isotope dilution method). Other advantages of the developed methodologies are their versatility (analysis of several families of compounds), relative simplicity and speed (due to the automation of several steps of the analysis).
- ❖ Studies carried out in four WWTPs have revealed not only the presence of high concentrations of pesticides in urban areas (> 500 ng/L of individual pesticides), but also their poor removal during wastewater treatment. Pesticide levels are often higher in treated waters (wastewater effluents) than in the corresponding influent waters suggesting the occurrence of possible deconjugation, hydrolysis and/or desorption processes leading to an increase of their concentration in the aqueous phase during wastewater treatment. The tertiary treatments studied have also been shown inefficient. Triazines are not eliminated by the tested tertiary treatments and thus enter the water cycle. Other pesticides, such as diuron and diazinon, are partially removed, with elimination rates varying between 15% and 80%, respectively.
- ❖ The water reuse study carried out in the Llobregat River indicates that the use of reclaimed water in this river neither affects significantly the water quality of the river nor the efficiency of the drinking water treatment plant located in the studied area, basically because the load of contaminants in both the treated wastewater and the receiving media are very similar. Therefore, this practice appears as a good option to maintain/increase the river flow and ensure the supply of drinking water to the city of Barcelona.
- ❖ The studies conducted in surface waters have shown that in urban areas (lower reach of the Llobregat River) the most ubiquitous pesticides are diazinon, diuron and terbuthylazine (diazinon also presented the highest concentrations) while in agricultural areas dedicated to rice cultivation, the most ubiquitous and abundant

pesticides are MCPA, molinate and bentazone, all used in rice crops, and malathion, which was detected at high concentrations not only in water but also in mussels.

- ❖ In groundwater, Lleida was the area of the Catalan region most affected by pesticide contamination (due to intensive soil irrigation), and the triazines atrazine and simazine were the most ubiquitous herbicides (due to their high GUS index and the extensive cultivation of maize), followed by diuron (long time, multi-purpose used herbicide).
- ❖ The artificial recharge study carried out in the lower reach of the Llobregat River has shown that the installation of a reactive layer (constituted mainly by compost) at the bottom of the infiltration basin improves the quality of the infiltrated water, and that the recharge process does not affect negatively the water quality of the aquifer underneath. Thus, as in the case of the reuse of reclaimed water, this technology appears as a useful and feasible means to increase the water table with the corresponding associated advantages that this has (storage of water, barrier against seawater intrusion, etc.). Regarding pesticides, conclusive results could only be obtained in the case of simazine, which was found to leach easily in the absence of the reactive layer but not with it, and diuron, whose adsorption/degradation during artificial recharge would contribute to its dilution in the groundwater.
- ❖ In sediments, only five out of the 26 pesticides investigated were detected and at relatively low concentrations (< 70 ng/g): chlorpyrifos, terbutylazine, diazinon, diuron and deisopropylatrazine. The results obtained are related to the organic matter content of the sediment and to some physico-chemical properties of the pesticides, such as water solubility, mobility, bioaccumulation potential and volatility. The detection of diuron in the sediments reinforces the idea that this compound is retained in the process of artificial recharge.
- ❖ The most important factors governing the occurrence and distribution of the pesticides in the different environmental compartments are: intensive land use (agricultural or urban), intense irrigation/rainfall/runoff, and favourable physico-chemical properties of the pesticides (for example, high K_{oc} in sediments or high GUS index in the case of groundwater).
- ❖ The ERA studies carried out in the Ebro Delta have shown considerably good agreement between the water toxicity levels experimentally measured and those

theoretically calculated from the pesticides present, indicating that these compounds are important factors of chemical stress to the aquatic ecosystem. The most relevant compounds in this respect are malathion and, to a lesser extent, simazine and diuron to algae, and molinate to bacteria.

- ❖ The ERA studies carried out in the Llobregat River have shown in most cases medium and high risk to aquatic organisms due to the presence of pesticides. Results indicate that crustaceans would be mainly affected by diazinon and malathion due to the inhibition of the acetyl cholinesterase, while algae would be mainly affected by the presence of the herbicide diuron.
- ❖ The ERA studies carried out in the WWTPs through the development and implementation of the so-called ERPW index indicate that the most problematic pesticides in this context are the insecticide diazinon and the herbicide diuron, followed by atrazine, simazine, malathion, chlortoluron, terbutylazine and isoproturon. It may be worth pointing out that four of these compounds are included in the list of priority substances of the WFD, which confirms the usefulness of the developed index.
- ❖ All ERA studies performed indicate that pesticides are an important source of stress for the aquatic environment and, among those studied, stand out, in this order, diazinon, malathion, diuron, terbutylazine, simazine, atrazine, chlortoluron and isoproturon. All of them are included in the list of priority compounds or occupy top positions in a prioritization list of 500 classic and emerging organic contaminants recently developed by von der Ohe et al (diazinon leads this list).
- ❖ Regarding prediction models, the flow balance model applied in the Llobregat River has revealed efficient and helpful, predicting with a low margin of error (< 25%) pesticide levels about 8km away from the reference point. The application of this kind of model to longer stretches is completely feasible, as long as the proper variables (for example, flow and concentration) are taken into consideration.
- ❖ With respect to the general status of waters, considering the more restrictive EQS, set out by the Directive 2006/118/EC for groundwater, results showed that 19 out of the 22 investigated pesticides exceeded in at least one study the level of 100 ng/L (diuron in all 4 field studies performed) whereas 16% of the analysed samples had total pesticide levels higher than 500 ng/L. Alachlor was the only pesticide exceeding

the EQS for inland surface waters.

- ❖ Finally, the quality of natural waters (as to the occurrence of pesticides concerns) could be improved by adopting different measures such as: establishment of regulations (EQS) for pesticides in treated wastewater; ban of the most toxic and/or persistent pesticides (starting with diuron, malathion and terbuthylazine); increasing control over the trade and use of banned pesticides (eg , diazinon); implementation of more efficient water treatment techniques for the removal of organic contaminants in WWTPs; use of shorter amounts of pesticides in agricultural and urban applications; use of new pesticides less toxic and bio available in the environment; performance of more studies for identification of transformation products of pesticides (many of which are more toxic than the parent compounds); and realization of more ERA to evaluate the impact of pesticides.

BIBLIOGRAFIA



- ABCdesevilla, 2005. Agricultura prohíbe ahora la Terbutilazina igual que hizo con la Simazina tras contaminar el Chanza en 2002. Disponible en Internet: http://www.abcdesevilla.es/hemeroteca/historico-14-07-2005/sevilla/Andalucia/agricultura-prohibe-ahora-la-terbutilazina-igual-que-hizo-con-la-simazina-tras-contaminar-el-chanza-en-2002_203785345792.html#, consultado en julio de 2013.
- Aboufadi, K., De Potter, C., Prevost, M. y Sauve, S., 2010. Time-dependent integrity during storage of natural surface water samples for the trace analysis of pharmaceutical products, feminizing hormones and pesticides. *Chemistry Central Journal*, 4: 8.
- Abraham, R., Sarasa, J., Causape, J., Garcia-Garizabal, I. y Ovelleiro, J.L., 2011. Influence of irrigation on the occurrence of organic and inorganic pollutants in soil, water and sediments of a Spanish agrarian basin (Lerma). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1): 124-134.
- ACA (Agència Catalana de l'Aigua). Disponible en Internet: <http://www.gencat.cat/aca/>.
- AFIP - Atmospheric Fate & Impacto of Pesticides. 2008. Qué son los pesticidas? Disponible en Internet: <http://www.era-orleans.org/AFIP/ES/Index.html>, consultado en marzo de 2013.
- Agilent Technology, 2009. Guía de selección de columnas para HPLC Agilent. Disponible en Internet: http://www.chem.agilent.com/Library/selectionguide/Public/5990-4435ES_low.pdf, consultado en abril de 2013.
- Ahumada, F.D.A. y Guerrero, D.J.A., 2010. Study of matrix effect in pesticide analysis by gas chromatography. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17(1): 51-58.
- American Laboratory. Accelerated Solvent Extraction With Acid Pretreatment for Improved Laboratory Productivity. Disponible en Internet: <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/743-Accelerated-Solvent-Extraction-With-Acid-Pretreatment-for-Improved-Laboratory-Productivity/>, consultado en mayo de 2013.
- Asperger, A., Efer, J., Koal, T. y Engewald, W., 2002. Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*, 960(1-2): 109-119.
- Aydin, M.E., Ozcan, S., Beduk, F. y Tor, A., 2013. Levels of organochlorine pesticides and heavy metals in surface waters of Konya closed basin, Turkey. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Balderacchi, M., Boccelli, R. y Trevisan, M., 2007. Tools to Assess Pesticide Environmental

- Fate. La Goliardica Pavese, Piacenza, 144 pp.
- Balderacchi, M., Di Guardo, A., Vischetti, C. y Trevisan, M., 2008. The Effect of Crop Rotation on Pesticide Leaching in a Regional Pesticide Risk Assessment. *Environmental Science & Technology*, 42(21): 8000-8006.
- Barakat, A.O., Khairy, M. y Aukaily, I., 2013. Persistent organochlorine pesticide and PCB residues in surface sediments of Lake Qarun, a protected area of Egypt. *Chemosphere*, 90(9): 2467-2476.
- Barata, C., Damasio, J., Lopez, M.A., Kuster, M., de Alda, M.L., Barcelo, D., Riva, M.C. y Raldua, D., 2007. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ Toxicol Chem*, 26(2): 370-379.
- Barceló, D. y Alpendurada, M.F., 1996. A review of sample storage and preservation of polar pesticides in water samples. *Chromatographia*, 42(11-12): 704-712.
- Barceló, D. y Hennion, M.C., 2003. Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, 19. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 556 pp.
- Barceló, D. y Navarro-Ortega, A. SCARCE: Snapshots on recent results and achievements Dec2009-Nov2013. Presentado en: 4th SCARCE International Conference, 25-26 noviembre 2013, Cádiz, España.
- Barceló, D. (coord.), Ayora, C., Barceló, D., Carrera, J., Castaño, S., Folch, M., Calvo, E.G., Gómez-Alday, J.J., Guasch, H., Jofre, J., Lema, J.M., de Alda, M.J.L., Lucena, F., Moreno-Amich, R., Muñoz, I., Nieto, J.M., Omil, F., Ortiz, I., Romaní, A., Sabater, S., Salgot, M., Sánchez-Vila, X., Sanz, D., Suárez, S. y Torrens, A., 2008. Aguas continentales. Gestión de recursos hídricos, tratamiento y calidad del agua. CSIC, Madrid, 276 pp.
- Bass, J.K., Ortega, L., Rosales, C., Petersen, N.J. y Philen, R.M., 2001. What's being used at home: a household pesticide survey. *Revista panamericana de salud pública*, 9(3): 138-44.
- Baugros, J.B., Cren-Olive, C., Giroud, B., Gauvrit, J.Y., Lanteri, P. y Grenier-Loustalot, M.F., 2009. Optimisation of pressurised liquid extraction by experimental design for quantification of pesticides and alkyl phenols in sludge, suspended materials and atmospheric fallout by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(25): 4941-4949.
- Baugros, J.B., Giroud, B., Dessalces, G., Grenier-Loustalot, M.F. y Cren-Olive, C., 2008. Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Analytica Chimica Acta*, 607(2): 191-203.
- Bedding, N.D., McIntyre, A.E., Lester, J.N. y Perry, R., 1988. Analysis of waste-waters for

- polynuclear aromatic-hydrocarbons .1. Method development and validation. *Journal of Chromatographic Science*, 26(12): 597-605.
- Behloul, M., Grib, H., Drouiche, N., Abdi, N., Lounici, H. y Mameri, N., 2013. Removal of Malathion Pesticide from Polluted Solutions by Electrocoagulation: Modeling of Experimental Results using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology*, 48(4): 664-672.
- Belfroid, A.C., van Drunen, M., Beek, M.A., Schrap, S.M., van Gestel, C.A.M. y van Hattum, B., 1998. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 222(3): 167-183.
- Benejam, L., Benito, J. y García-Berthou, E., 2010. Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. *Water, Air, and Soil Pollution*, 210(1-4): 231-242.
- Berho, C., Togola, A., Coureau, C., Ghestem, J.P. y Amalric, L., 2013. Applicability of polar organic compound integrative samplers for monitoring pesticides in groundwater. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-9.
- Bermudez-Couso, A., Arias-Estevez, M., Novoa-Muñoz, J.C., Lopez-Periago, E., Soto-Gonzalez, B. y Simal-Gandara, J., 2007. Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards. *Water Research*, 41(19): 4515-4525.
- Bidlingmeyer, B.A., 1993. *Practical HPLC Methodology and Applications*. John Wiley & Sons Inc, New York, 464 pp.
- Bixio, D., Thoeye, C., De Koning, J., Joksimovic, D., Savic, D., Wintgens, T. y Melin, T., 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*, 187(1-3): 89-101.
- Blasco, C. y Pico, Y., 2009. Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28(6): 745-757.
- Bonanse, R.I., Amé, M.V. y Wunderlin, D.A., 2013. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*, 90(6): 1860-1869.
- Bono-Blay, F., Guart, A., de la Fuente, B., Pedemonte, M., Cinta Pastor, M., Borrell, A. y Lacorte, S., 2012. Survey of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and herbicides in Spanish source waters intended for bottling. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8): 3339-3349.
- Borba da Cunha, A.C., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., Pizzolato, T.M. y dos Santos, J.H.Z., 2004. Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*,

- 378(4): 940-54.
- Bourne, S., 1978. Preservation of organophosphorous pesticides in water samples. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 13(2): 75-86.
- Brondi, S.H.G., de Macedo, A.N., Vicente, G.H.L. y Nogueira, A.R.A., 2011. Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(1): 18-22.
- Broseus, R., Vincent, S., Aboufadi, K., Daneshvar, A., Sauve, S., Barbeau, B. y Prevost, M., 2009. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water Research*, 43(18): 4707-4717.
- Brown, C.D., Hart, A., Lewis, K.A. y Dubus, I.G., 2003. P-EMA (I): simulating the environmental fate of pesticides for a farm-level risk assessment system. *Agronomie*, 23(1): 67-74.
- Bueno, M.J.M., Aguera, A., Hernando, M.D. y Gomez, M.J., 2009. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1216(32): 5995-6002.
- Bunzel, K., Kattwinkel, M. y Liess, M., 2013. Effects of organic pollutants from wastewater treatment plants on aquatic invertebrate communities. *Water Research*, 47(2): 597-606.
- Burgert, S., Schafer, R.B., Foit, K., Kattwinkel, M., Metzeling, L., MacEwan, R., Kefford, B.J. y Liess, M., 2011. Modelling aquatic exposure and effects of insecticides - Application to south-eastern Australia. *Science of the Total Environment*, 409(14): 2807-2814.
- Burkhardt, M., Kupper, T., Hean, S., Haag, R., Schmid, P., Kohler, M. y Boller, M., 2007. Biocides used in building materials and their leaching behavior to sewer systems. *Water Science and Technology*, 56(12): 63-67.
- Cabras, P. y Angioni, A., 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4): 967-973.
- Cacho, C., Turiel, E. y Perez-Conde, C., 2009. Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples. *Talanta*, 78(3): 1029-1035.
- Cahill, M.G., Caprioli, G., Stack, M., Vittori, S. y James, K.J., 2011. Semi-automated liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method for basic pesticides in wastewater effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(2): 587-594.
- Caldas, S.S., Bolzan, C.M., Guilherme, J.R., Silveira, M.A.K., Escarrone, A.L.V. y Primel, E.G., 2013. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides

- in surface and treated waters: method development and survey. *Environmental Science and Pollution Research*: 1-9.
- Cappelini, L.T.D., Cordeiro, D., Govoni Brondi, S.H., Prieto, K.R. y Vieira, E.M., 2012. Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environmental Technology*, 33(20): 2299-2304.
- Caquet, T., Roucaute, M., Mazzella, N., Delmas, F., Madigou, C., Farcy, E., Burgeot, T., Allenou, J.P. y Gabellec, R., 2013. Risk assessment of herbicides and booster biocides along estuarine continuums in the Bay of Vilaine area (Brittany, France). *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2): 651-666.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Fernández-Laespada, M.E., Calvo-Seronero, L. y Sánchez-San Román, F.J., 2003. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Research*, 37(4): 928-938.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Herrero-Hernández, E., Sánchez-San Román, F.J. y Prado Flores, M.G., 2002. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography: Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. *Journal of Chromatography A*, 950(2002): 157-166.
- Carrasco Marín, F. y Menéndez Díaz, J.A., 2010. Nuevos materiales y tecnologías para el tratamiento del agua. Universidad Internacional de Andalucía, 312 pp.
- Carriger, J. y Rand, G., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation. *Ecotoxicology*, 17(7): 660-679.
- Carvalho, J.J., Jeronimo, P.C.A., Goncalves, C. y Alpendurada, M.F., 2008. Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem*, 392: 955-968.
- Casas, V., Llompарт, M., Garcia-Jares, C., Cela, R. y Dagnac, T., 2007. Effects of sample pretreatment and storage conditions in the determination of pyrethroids in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(5): 1841-1849.
- Cea, L. y Bladé, E., Modelización matemática en lecho fijo del flujo en ríos. Modelos 1D y 2D en régimen permanente y variable. 30 pp. Disponible en Internet: <http://iberaula.es/articulos-tecnicos>, consultado en julio de 2013.
- Combi, T., Taniguchi, S., Figueira, R.C.L., Mahiques, M.M.d. y Martins, C.C., 2013. Spatial distribution and historical input of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from a subtropical estuary (Guaratuba Bay, SW Atlantic). *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2): 247-252.

- Comoretto, L., Arfib, B., Talva, R., Chauvelon, P., Pichaud, M., Chiron, S. y Hohener, P., 2008. Runoff of pesticides from rice fields in the Ile de Camargue (Rhône river delta, France): Field study and modeling. *Environmental Pollution*, 151(3): 486-493.
- Corsini, E., Liesivuori, J., Vergieva, T., Van Loveren, H. y Colosio, C., 2008. Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Human and Experimental Toxicology*, 27(9): 671-680.
- Council of the European Communities, 1998. Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of European Community L.*, 330: 32.
- Council of the European Communities, 2002. Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Community L.*, 221: 8-17.
- Council of the European Communities, 2004a. Decision 2004/247/EC, concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance. *Off J Eur Community L*, 78.
- Council of the European Communities, 2004b. Decision 2004/248/EC concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance. *Off J Eur Community L*, 78.
- Council of the European Communities, 2006. Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration. *Official Journal of European Community L.*, 372: 19.
- Council of the European Communities, 2007a. Decision 2007/389/EC concerning the non-inclusion of malathion in Annex I to Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of European Community L.*, 146: 19.
- Council of the European Communities, 2007b. Decision 2007/393/EC, concerning the non-inclusion of diazinon in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance. *Off J Eur Community L*, 148.
- Council of the European Communities, 2008. Decision 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy. *Official Journal of European Community L.*, 348: 84.
- Council of the European Communities, 2009. Directive 2009/90/EC, laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status. *Official Journal of European Community L.*, 201: 36.

- Crescenzi, C., Dicorcia, A., Madbouly, M.D. y Samperi, R., 1995. Pesticide stability studies upon storage in a graphitized carbon-black extraction cartridge. *Environmental Science & Technology*, 29(9): 2185-2190.
- Chavez-Eng, C.M., Constanzer, M.L. y Matuszewski, B.K., 2002. High-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric evaluation and determination of stable isotope labeled analogs of rofecoxib in human plasma samples from oral bioavailability studies. *Journal of Chromatography B*, 767(1): 117-129.
- Dagnac, T., Bristeau, S., Jeannot, R., Mouvet, C. y Baran, N., 2005. Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurised liquid extraction, GC-MS/MS, LC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography A*, 1067(1-2): 225-233.
- Damasio, J., Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barcelo, D., Soares, A.M.V.M., Lopez, M.A., Riva, M.C. y Barata, C., 2010. Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology*, 19(6): 1084-94.
- de Bruyn, B., Freissinet, C. y Vauclin, M., 2006. An indice for pesticide potential vulnerability of surface waters: assessment on the Leysse catchment (Savoie). *Houille Blanche- Revue Internationale De L Eau*(2): 106-112.
- Drozdzyński, D. y Kowalska, J., 2009. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 394(8): 2241-7.
- El Atrache, L.L., Sabbah, S. y Morizur, J.P., 2005. Identification of phenyl-N-methylcarbamates and their transformation products in Tunisian surface water by solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 65(2): 603-612.
- El País, 2009. Prohibida la recogida de ostras y mejillones en el delta del Ebro por la presencia de una toxina. Disponible en Internet: http://elpais.com/diario/2009/09/22/catalunya/1253581644_850215.html, consultado en enero de 2010.
- Environmental protection agency, 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms* U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 275 pp.
- Environmental Protection Agency. About Pesticides. Disponible en Internet: http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what_pesticide, consultado en marzo de 2013.
- Eroski consumer, 2005. Se suspende el uso del herbicida terbutilazina. Disponible en Internet: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/2005/08/01/19371.php>,

- consultado en julio de 2013.
- Estévez, E., Cabrera, M.d.C., Molina-Díaz, A., Robles-Molina, J. y Palacios-Díaz, M.d.P., 2012. Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain). *Science of The Total Environment*, 433(0): 538-546.
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1997. Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Capítulo 4 - Los plaguicidas, en cuanto contaminantes del agua; E.D. Ongley, FAO, Burlington, pp 59-76.
- FAO/CEPE. 1991. *Legislation and Measures for the Solving of Environmental Problems Resulting from Agricultural Practices (With Particular Reference to Soil, Air and Water), Their Economic Consequences and Impact on Agrarian Structures and Farm Rationalization*. Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa, (CEPE) Y FAO, *Agri/Agrarian Structures and Farm Rationalization Report No. 7*. Naciones Unidas, Ginebra.
- Fenoll, J., Hellin, P., Martínez, C.M., Flores, P. y Navarro, S., 2011. Determination of 48 pesticides and their main metabolites in water samples by employing sonication and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 85(2): 975-982.
- Fernández-Alba, A., 2005. Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues (Wilson & Wilson's Comprehensive analytical chemistry; v. 43). *Comprehensive analytical chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 487 pp.
- Fernandez-Gomez, C., Antonio Lopez-Lopez, J., Matamoros, V., Diez, S., Garcia-Vargas, M. y Moreno, C., 2013. Atmospheric influence on the distribution of organic pollutants in the Guadalquivir River estuary, SW Spain. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4): 3209-3218.
- Ferrer, I. y Barcelo, D., 1996. Determination and stability of pesticides in freeze-dried water samples by automated on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 737(1): 93-99.
- Finizio, A., Calliera, M. y Vighi, M., 2001. Rating systems for pesticide risk classification on different ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(3): 262-274.
- Fuentes, E., Baez, M.E. y Labra, R., 2007. Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. *Journal of Chromatography A*, 1169(1-2): 40-46.
- Galassi, S., Provini, A. y Halfon, E., 1996. Risk assessment for pesticides and their metabolites in water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 65(1-4): 331-344.

- García-Valcarcel, A.I. y Tadeo, J.L., 2009. A combination of ultrasonic assisted extraction with LC-MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge. *Analytica Chimica Acta*, 641(1-2): 117-123.
- Garrido, T., Fraile, J., Ninerola, J.M., Figueras, M., Ginebreda, A. y Olivella, L., 2000. Survey of ground water pesticide pollution in rural areas of Catalonia (Spain). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 78(1): 51-65.
- Gascuel-Oudou, C., Aurousseau, P., Cordier, M.-O., Durand, P., Garcia, F., Masson, V., Salmon-Monviola, J., Tortrat, F. y Trepos, R., 2009. A decision-oriented model to evaluate the effect of land use and agricultural management on herbicide contamination in stream water. *Environmental Modelling & Software*, 24(12): 1433-1446.
- Geiss, S. y Gebert, S., 2006. Extraction of highly polar organophosphorus pesticides from water. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica*, 34(5): 464-473.
- Generalitat de Catalunya, 2008. El Agua en Cataluña: diagnosis y propuestas de actuación. Agencia Catalana del Agua. 99 pp.
- Generalitat de Catalunya, 2011. Mapes de distribució de la superfície agrícola. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Disponible en Internet: <http://www20.gencat.cat/portal/site/DAR/menuitem.3645c709047c363053b88e10b031e1a0/?vgnextoid=3963361d78b24110VgnVCM1000000b0c1e0aRCRD&vgnnextchannel=3963361d78b24110VgnVCM1000000b0c1e0aRCRD>, consultado en enero de 2013.
- Ghafoor, A., Jarvis, N.J. y Stenström, J., 2012. Modelling pesticide sorption in the surface and subsurface soils of an agricultural catchment. *Pest Management Science*: 3453.
- Ghanem, A., Bados, P., Perreau, F., Benabdallah, R., Plagellat, C., de Alencastro, L.F. y Einhorn, J., 2008. Multiresidue analysis of atrazine, diuron and their degradation products in sewage sludge by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1): 345-352.
- Ginebreda, A., Kuzmanovic, M., Guasch, H., de Alda, M.L.p., López-Doval, J.C., Muñoz, I., Ricart, M., Romaní, A.M., Sabater, S. y Barceló, D., 2014. Assessment of multi-chemical pollution in aquatic ecosystems using toxic units: Compound prioritization, mixture characterization and relationships with biological descriptors. *Science of The Total Environment*, 468-469(0): 715-723.
- Gobierno Español, 2007. Real Decreto 1620/2007, de 7 de diciembre, por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *Boletín Oficial del Estado*, 294: 50639.
- Golluscio, R.A., Roset, P.A., Sala, O.E. y Paruelo, J.M., 1994. Modelos en ecología. *Ecología Austral*, 4(2): 123-132.

- Gomez, S., Gorri, D. y Irabien, A., 2011. Organochlorine pesticide residues in sediments from coastal environment of Cantabria (northern Spain) and evaluation of the Atlantic Ocean. *Environmental Monitoring and Assessment*, 176(1-4): 385-401.
- Gustafson, D.I., 1989. Groundwater ubiquity score - a simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(4): 339-357.
- Guzzella, L., Pozzoni, F. y Giuliano, G., 2006. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environmental Pollution*, 142(2): 344-353.
- Haarstad, K. y Ludvigsen, G.H., 2007. Ten years of pesticide monitoring in Norwegian ground water. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 27(3): 75-89.
- Heidler, J. y Halden, R.U., 2009. Fate of organohalogenes in US wastewater treatment plants and estimated chemical releases to soils nationwide from biosolids recycling. *Journal of Environmental Monitoring*, 11(12): 2207-2215.
- Hellar-Kihampa, H., De Wael, K., Lugwisha, E., Malarvannan, G., Covaci, A. y Van Grieken, R., 2013. Spatial monitoring of organohalogen compounds in surface water and sediments of a rural-urban river basin in Tanzania. *Science of the Total Environment*, 447: 186-197.
- Henriksen, T., Svensmark, B. y Juhler, R.K., 2002. Analysis of Metribuzin and transformation products in soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 957(1): 79-87.
- Hernandez-Hernandez, C.N.A., Valle-Mora, J., Santiesteban-Hernandez, A. y Bello-Mendoza, R., 2007. Comparative ecological risks of pesticides used in plantation production of papaya: Application of the SYNOPS indicator. *Science of the Total Environment*, 381(1-3): 112-125.
- Hernandez, F., Ibanez, M., Sancho, J.V. y Pozo, O.J., 2004. Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points. *Analytical Chemistry*, 76(15): 4349-4357.
- Hernandez, F., Sancho, J.V., Ibanez, M. y Grimalt, S., 2008. Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 27(10): 862-872.
- Hernandez, F., Sancho, J.V. y Pozo, O.J., 2005. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(4): 934-946.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M.S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M.S. y Sánchez-Martín, M.J., 2013. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *Journal of Hydrology*, 486: 234-245.

- Hildebrandt, A., Guillamon, M., Lacorte, S., Tauler, R. y Barcelo, D., 2008. Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res*, 42(13): 3315-3326.
- Hildebrandt, A., Lacorte, S. y Barcelo, D., 2007. Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4): 1459-1468.
- Hildebrandt, A., Lacorte, S. y Barcelo, D., 2009. Occurrence and fate of organochlorinated pesticides and PAH in agricultural soils from the Ebro River basin. *Arch Environ Contam Toxicol*, 57(2): 247-55.
- Hladik, M.L. y Kuivila, K.M., 2008. Analysis of chlorothalonil and three degradates in sediment and soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7): 2310-2314.
- Holvoet, K., van Griensven, A., Seuntjens, P. y Vanrolleghem, P.A., 2005. Sensitivity analysis for hydrology and pesticide supply towards the river in SWAT. *Physics and Chemistry of the Earth*, 30(8-10): 518-526.
- Hou, L. y Lee, H.K., 2004. Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1038(1-2): 37-42.
- Huntscha, S., Singer, H.P., McArdell, C.S., Frank, C.E. y Hollender, J., 2012. Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1268: 74-83.
- Hutta, M., Chalanyova, M., Halko, R., Gora, R., Dokupilova, S. y Rybar, I., 2009. Reversed phase liquid chromatography trace analysis of pesticides in soil by on-column sample pumping large volume injection and UV detection. *Journal of Separation Science*, 32(12): 2034-2042.
- Ibáñez, M., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J. y Hernández, F., 2005. Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1081(2): 145-155.
- IBT-UNAM, Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas (2004) por Camilo Ayala Bretón. Disponible en Internet: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_proteinas.pdf, consultado en mayo de 2013.
- INE (Instituto Nacional de Ecología) 2000. Características de peligrosidad ambiental de plaguicidas: Manual de trabajo. Instituto Nacional de Ecología, México. 270 pp.

- Jansson, C. y Kreuger, J., 2010. Multiresidue analysis of 95 pesticides at low nanogram/liter levels in surface waters using online preconcentration and high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 93(6): 1732-1747.
- Jeannot, R., 1994. Preservation techniques for analysis of organic-compounds in water samples - a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 57(3): 231-236.
- Jelic, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sanchez, R., Ventura, F., Petrovic, M. y Barcelo, D., 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, 45(3): 1165-1176.
- Jonsson, E., Emmerman, A. y Norberg, H. 1990. Problemmrå den I yttremiljön vid kemisk bekämpning - förslag till åtgärder. Rapport utarbetad av lantbrukstyrelsens arbetsgrupp "Yttre miljö - kantzoner". Lantbrukstyrelsens rapport 1991: 2 Jönköping, Sverige. (As reported in WWF, 1992).
- Jordan, T.B., Nichols, D.S. y Kerr, N.I., 2009. Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 394(8): 2257-66.
- Jurado, A., Vazquez-Sune, E., Carrera, J., Lopez de Alda, M., Pujades, E. y Barcelo, D., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment*, 440: 82-94.
- Kahle, M., Buerge, I.J., Hauser, A., Muller, M.D. y Poiger, T., 2008. Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environmental Science & Technology*, 42(19): 7193-7200.
- Kampioti, A.A., da Cunha, A.C.B., de Alda, M.L. y Barcelo, D., 2005. Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(8): 1815-1825.
- Katsoyiannis, A. y Samara, C., 2004. Persistent organic pollutants (POPS) in the sewage treatment plant of Thessaloniki, northern Greece: occurrence and removal. *Water Research*, 38(11): 2685-2698.
- Kattwinkel, M., Jan-Valentin, K., Foit, K. y Liess, M., 2011. Climate change, agricultural insecticide exposure, and risk for freshwater communities. *Ecological Applications*, 21(6): 2068-2081.
- Knäbel, A., Stehle, S., Schaefer, R.B. y Schulz, R., 2012. Regulatory FOCUS Surface Water Models Fail to Predict Insecticide Concentrations in the Field. *Environmental Science*

- & Technology, 46(15): 8397-8404.
- Koeber, R., Fleischer, C., Lanza, F., Boos, K.S., Sellergren, B. y Barcelo, D., 2001. Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers. *Analytical Chemistry*, 73(11): 2437-2444.
- Koelmans, A.A., Hubert, E., Koopman, H.W., Portielje, R. y Crum, S.J.H., 2000. Modeling the vertical distribution of carbendazim in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4): 793-800.
- Köhne, J.M., Köhne, S. y Simunek, J., 2009. A review of model applications for structured soils: b) Pesticide transport. *Journal of Contaminant Hydrology*, 104(1-4): 36-60.
- Kolpin, D.K., Schnoebelen, D.J. y Thurman, E.M., 2004. Degradates provide insight to spatial and temporal trends of herbicides in ground water. *Ground Water*, 42(4): 601-608.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T. y Glassmeyer, S.T., 2006. Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the Total Environment*, 354(2-3): 191-197.
- Kruithof, J.C. y Martijn, B.J., 2013. UV/H₂O₂ treatment: An essential process in a multi barrier approach against trace chemical contaminants, *Water Science and Technology: Water Supply*, 13(1): 130-138.
- Kuster, M., de Alda, M.L. y Barcelo, D., 2006. Analysis of pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometric techniques. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6): 900-916.
- Kuster, M., de Alda, M.L. y Barcelo, D., 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, 1216(3): 520-529.
- Kuster, M., Diaz-Cruz, S., Rosell, M., Lopez de Alda, M. y Barcelo, D., 2010. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. *Chemosphere*, 79(8): 880-886.
- Kuster, M., Jose Lopez de Alda, M., Dolores Hernando, M., Petrovic, M., Martin-Alonso, J. y Barcelo, D., 2008a. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358(1-2): 112-123.
- Kuster, M., de Alda, M.J.L., Barata, C., Raldua, D. y Barcelo, D., 2008b. Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 75(2): 390-401.

- Kvicalova, M., Doubravova, P., Jobanek, R., Jokesova, M., Ocenaskova, V., Suessenbekova, H. y Svobodova, A., 2012. Application of Different Extraction Methods for the Determination of Selected Pesticide Residues in Sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(1): 21-26.
- Lacorte, S. y Fernandez-Albaz, A.R., 2006. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6): 866-880.
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D. y Scholz, N.L., 2009. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: Implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environmental Health Perspectives*, 117(3): 348-353.
- Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Hebert, V., Stark, J.D. y Scholz, N.L., 2013. Interactive neurobehavioral toxicity of diazinon, malathion, and ethoprop to juvenile coho salmon. *Environmental Science and Technology*, 47(6): 2925-2931.
- Lambropoulou, D.A. y Albanis, T.A., 2007. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2): 195-228.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R. y Porte, C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196(2): 247-257.
- Lazartigues, A., Fratta, C., Baudot, R., Wiest, L., Feidt, C., Thomas, M. y Cren-Olive, C., 2011. Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle. *Talanta*, 85(3): 1500-1507.
- Llebot, C., Solé, J., Delgado, M., Fernández-Tejedor, M., Camp, J. y Estrada, M., 2011. Hydrographical forcing and phytoplankton variability in two semi-enclosed estuarine bays. *Journal of Marine Systems*, 86: 69-86.
- Leendertse, P.C. y Reus, J., 1999. Evaluation of pesticide risk indicators in Europe: Results of the CAPER project. In: A.A.M. DelRe et al. (Editors), *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics*. La Goliardica Pavese, 27100 Pavia, pp. 809-821.
- Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A. y Fuerhacker, M., 2008. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75(1): 284-293.
- Li, C., Zheng, M., Gao, L., Zhang, B., Liu, L. y Xiao, K., 2013. Levels and distribution of PCDD/Fs, dl-PCBs, and organochlorine pesticides in sediments from the lower reaches of the Haihe River basin, China. *Environmental Monitoring and Assessment*,

- 185(2): 1175-1187.
- Liess, M. y von der Ohe, P.C., 2005. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4): 954-965.
- Liu, G., Li, J., Yin, L., Liu, L., Qi, H. y Wu, Y., 2012. Distribution characteristics of organochlorine pesticides in surface and vertical sediments from the Zha Long Wetland, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7): 2681-2689.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M. y Gawlik, B.M., 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*, 44(14): 4115-4126.
- Lopez-Serna, R., Postigo, C., Blanco, J., Perez, S., Ginebreda, A., Lopez de Alda, M., Petrovic, M., Munne, A. y Barcelo, D., 2012. Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on the presence emerging contaminants in a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4): 1000-1012.
- Luque, N. y Rubio, S., 2012. Extraction and stability of pesticide multiresidues from natural water on a mixed-mode admicellar sorbent. *Journal of Chromatography A*, 1248(0): 74-83.
- Lyytikäinen, M., Kukkonen, J.V.K. y Lydy, M.J., 2003. Analysis of pesticides in water and sediment under different storage conditions using gas chromatography. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(4): 437-444.
- Llebot, C., Solé, J., Delgado, M., Fernández-Tejedor, M., Camp, J. y Estrada, M., 2011. Hydrographical forcing and phytoplankton variability in two semi-enclosed estuarine bays. *Journal of Marine Systems*, 86(2011): 69-86.
- Macneale, K.H., Kiffney, P.M. y Scholz, N.L., 2010. Pesticides, aquatic food webs, and the conservation of Pacific salmon. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8(9): 475-482.
- MAGRAMA 2007, Volumen de agua reutilizada año 2007. Disponible en Internet: http://servicios2.magrama.es/sia/indicadores/ind/ficha.jsp?cod_indicador=45&factor=r espuesta, consultado en julio de 2013.
- MAGRAMA 2011, Consumo de fitosanitarios en la agricultura. Disponible en Internet: http://servicios2.magrama.es/sia/indicadores/ind/ficha.jsp?cod_indicador=23&factor=presion, consultado en marzo de 2013.
- MAGRAMA 2012, Perfil Ambiental de España 2011: Informe basado en indicadores. Gobierno de España, Madrid, 293 pp.
- Malaguerra, F., Albrechtsen, H.-J. y Binning, P.J., 2013. Assessment of the contamination of drinking water supply wells by pesticides from surface water resources using a finite

- element reactive transport model and global sensitivity analysis techniques. *Journal of Hydrology*, 476: 321-331.
- Manache, G. y Melching, C.S., 2004. Sensitivity analysis of a water-quality model using Latin hypercube sampling. *Journal of Water Resources Planning and Management-Asce*, 130(3): 232-242.
- Mañosa, S., Mateo, R. y Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment*, 71(2): 187-205.
- Margni, M., Rossier, D., Crettaz, P. y Jolliet, O., 2002. Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 93(1-3): 379-392.
- Marin, J.M., Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., Lopez, F.J. y Hernandez, F., 2009. Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects. *Journal of Chromatography A*, 1216(9): 1410-1420.
- Martini, L.F.D., Caldas, S.S., Bolzan, C.M., Bundt, A.C., Primel, E.G. y de Avila, L.A., 2012. Risk assessment of surface and groundwater contamination by the rice pesticides. Risco de contaminação das águas de superfície e subterrâneas por agrotóxicos recomendados para a cultura do arroz irrigado, 42(10): 1715-1721.
- Masia, A., Ibañez, M., Blasco, C., Sancho, J.V., Pico, Y. y Hernandez, F., 2013. Combined use of liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in systematic screening of pesticides and other contaminants in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 761: 117-127.
- Meier-Augenstein, W., 1999. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 842(1-2): 351-371.
- Milhome, M.A.L., de Sousa, D.D.B., Lima, F.D.F. y do Nascimento, R.F., 2009. Assessment of surface and groundwater potential contamination by agricultural pesticides applied in the region of Baixo Jaguaribe, CE, Brazil. *Engenharia Sanitaria E Ambiental*, 14(3): 363-372.
- MNCN (Museo Nacional de Ciencias Naturales) del CSIC. Laboratorio de Cromatografía. La espectrometría de masas. Disponible en Internet: <http://www.mncn.csic.es/index.jsp?seccion=1325&id=2011071211330001&activo=12> #, consultado en abril de 2013.
- Molina-Morales, Y., Flores-García, M., Balza-Quintero, A., Benítez-Díaz, P. y Miranda-Contreras, L., 2012. Levels of pesticides in surface waters in an agricultural region of Mérida State, Venezuela, between 2008 and 2010. Niveles de plaguicidas en aguas

- superficiales de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela, entre 2008 y 2010, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(4): 289-301.
- Morasch, B., Bonvin, F., Reiser, H., Grandjean, D., de Alencastro, L.F., Perazzolo, C., Chevre, N. y Kohn, T., 2010. Occurrence and fate of micropollutants in the vidy bay of Lake Geneva, Switzerland. Part II: micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(8): 1658-1668.
- Moreno-González, R., Campillo, J.A., Garía, V. y León, V.M., 2013. Seasonal input of regulated and emerging organic pollutants through surface watercourses to a Mediterranean coastal lagoon. *Chemosphere*, 92(3): 247-257.
- Moussavi, G., Hosseini, H. y Alahabadi, A., 2013. The investigation of diazinon pesticide removal from contaminated water by adsorption onto NH₄Cl-induced activated carbon. *Chemical Engineering Journal*, 214: 172-179.
- Muñoz, I., Gomez-Ramos, M.J., Aguera, A., Garcia-Reyes, J.F., Molina-Diaz, A. y Fernandez-Alba, A.R., 2009. Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28(6): 676-694.
- Navarro-Ortega, A., Tauler, R., Lacorte, S. y Barcelo, D., 2010. Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin. *Journal of Hydrology*, 383(1-2): 5-17.
- Navarro, A., Tauler, R., Lacorte, S. y Barcelo, D., 2010. Occurrence and transport of pesticides and alkylphenols in water samples along the Ebro River Basin. *Journal of Hydrology*, 383(1-2): 18-29.
- Navarro, S., Hernández-Bastida, J., Cazaña, G., Pérez-Lucas, G. y Fenoll, J., 2012. Assessment of the leaching potential of 12 substituted phenylurea herbicides in two agricultural soils under laboratory conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(21): 5279-5286.
- Neumeister, L. y Weber, C., 2009. PAN international, Lista de plaguicidas altamente peligrosos. Pesticide Action Network International, Hamburgo, 15 pp.
- Nilsson, L.B. y Skansen, P., 2012. Investigation of absolute and relative response for three different liquid chromatography/tandem mass spectrometry systems; the impact of ionization and detection saturation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(12): 1399-1406.
- Nitschke, L. y Schussler, W., 1998. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere*, 36(1): 35-41.
- Nomen, R., Sempere, J., Chavez, F., Amaya de Lopez, N. y Dolores Rovira, M., 2012. Measurement of pollution levels of organochlorine and organophosphorus pesticides in water, soil, sediment, and shrimp to identify possible impacts on shrimp production

- at Jiquilisco Bay. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(8): 3547-3555.
- Nuevatribuna 2011, El agua y los campos de golf españoles. Disponible en Internet: <http://www.nuevatribuna.es/articulo/medio-ambiente/el-agua-y-los-campos-de-golf-espanoles/20110216111419040057.html>, consultado en junio de 2013.
- Ochoa, V., Riva, C., Faria, M., de Alda, M.L., Barceló, D., Fernandez Tejedor, M., Roque, A. y Barata, C., 2012. Are pesticide residues associated to rice production affecting oyster production in Delta del Ebro, NE Spain? *Science of the Total Environment*, 437: 209-218.
- Ormad, M., Miguel, N., Mosteo, R., Rodríguez, J. y Ovelleiro, J.L., 2011. Study of the Presence of Pesticides in Treated Urban Wastewaters. In: M. Stoytcheva (Editor), *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*. InTech, Croatia, pp. 453-470.
- Ormad, M.P., Miguel, N., Claver, A., Matesanz, J.M. y Ovelleiro, J.L., 2008. Pesticides removal in the process of drinking water production. *Chemosphere*, 71(1): 97-106.
- Ort, C., Lawrence, M.G., Reungoat, J. y Mueller, J.F., 2010. Sampling for PPCPs in Wastewater Systems: Comparison of Different Sampling Modes and Optimization Strategies. *Environmental Science & Technology*, 44(16): 6289-6296.
- Padovani, L., Trevisan, M. y Capri, E., 2004. A calculation procedure to assess potential environmental risk of pesticides at the farm level. *Ecological Indicators*, 4(2): 111-123.
- Pailleux, F. y Beaudry, F., 2012. Internal standard strategies for relative and absolute quantitation of peptides in biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 26(8): 881-891.
- Palma, P., Kuster, M., Alvarenga, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., Lopez de Aida, M.J., Barcelo, D. y Barbosa, I.R., 2009. Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environment International*, 35(3): 545-551.
- PAN-UK (Pesticide Action Network-UK), 2005. Diuron. *Pesticides News*, 67: 20-21.
- Petrovic, M., Farre, M., de Alda, M.L., Perez, S., Postigo, C., Kock, M., Radjenovic, J., Gros, M. y Barcelo, D., 2010. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J Chromatogr A*, 1217(25): 4004-17.
- Petrovic, M., Gonzalez, S. y Barcelo, D., 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 22(10): 685-696.
- Pitarch, E., Portoles, T., Marin, J.M., Ibañez, M., Albarran, F. y Hernandez, F., 2010. Analytical strategy based on the use of liquid chromatography and gas chromatography with triple-quadrupole and time-of-flight MS analyzers for

- investigating organic contaminants in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(7): 2763-2776.
- Postigo, C., de Alda, M.J.L. y Barcelo, D., 2008. Fully automated determination in the low nanogram per liter level of different classes of drugs of abuse in sewage water by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(9): 3123-3134.
- Postigo, C., de Alda, M.J.L., Barcelo, D., Ginebreda, A., Garrido, T. y Fraile, J., 2010. Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection. *Journal of Hydrology*, 383(1-2): 83-92.
- Probst, M., Berenzen, N., Lentzen-Godding, A. y Schulz, R., 2005. Scenario-based simulation of runoff-related pesticide entries into small streams on a landscape level. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(2): 145-159.
- Pussemier, L., 1999. SyPEP: A system for predicting the environmental impact of pesticides in Belgium. In: Del Re, A. A. M., Brown, C., Capri, E., Errera, G., Evans, S. P. y Trevisan, M. (Eds), *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics*, Proc. of the XI Symposium Pesticide Chemistry, Cremona, Italy, pp. 851-859.
- Quinete, N., Wang, J., Fernandez, A., Castro, J. y Gardinali, P.R., 2013. Outcompeting GC for the detection of legacy chlorinated pesticides: online-SPE UPLC APCI/MSMS detection of endosulfans at part per trillion levels. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(18): 5887-5899.
- Quintana, J., Marti, I. y Ventura, F., 2001. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *Journal of Chromatography A*, 938(1-2): 3-13.
- Ramon, M., Fernandez, M. y Galimany, E., 2007. Development of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) seed from two different origins in a semi-enclosed Mediterranean Bay (NE Spain). *Aquaculture*, 264(1-4): 148-159.
- RAP-AL - Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. Lista de plaguicidas altamente peligrosos. Disponible en Internet: http://www.rap-al.org/index.php?seccion=3&f=edicion.php&id_publicacion=7&id_edicion=146, consultado en marzo de 2013.
- Reemtsma, T., Alder, L. y Banasiak, U., 2013. A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1271: 95-104.
- Reemtsma, T., Weiss, S., Mueller, J., Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., Ventura, F. y

- Knepper, T.P., 2006. Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: A European perspective. *Environmental Science & Technology*, 40(17): 5451-5458.
- Reus, J., Leendertse, P., Bockstaller, C., Fomsgaard, I., Gutsche, V., Lewis, K., Nilsson, C., Pussemier, L., Trevisan, M., van der Werf, H., Alfaro, F., Blumel, S., Isart, J., McGrath, D. y Seppala, T., 2002. Comparison and evaluation of eight pesticide environmental risk indicators developed in Europe and recommendations for future use. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 90(2): 177-187.
- Reus, J. y Leendertse, P.C., 2000. The environmental yardstick for pesticides: a practical indicator used in the Netherlands. *Crop Protection*, 19(8-10): 637-641.
- Ricart, M., Guasch, H., Barcelo, D., Brix, R., Conceição, M.H., Geiszinger, A., de Alda, M.J.L., Lopez-Doval, J.C., Muñoz, I., Postigo, C., Romani, A.M., Villagrasa, M. y Sabater, S., 2010. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities. *Journal of Hydrology*, 383(1-2): 52-61.
- Ricciardi, F., Bonnineau, C., Faggiano, L., Geiszinger, A., Guasch, H., Lopez-Doval, J., Muñoz, I., Proia, L., Ricart, M., Romaní, A. y Sabater, S., 2009. Is chemical contamination linked to the diversity of biological communities in rivers? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(5): 592-602.
- Ríos, A.C., 2007. Aplicación de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tandem a la determinación de antidepresivos en plasma y fluido oral., Tesis Doctoral: Facultade de Medicina e Odontoloxía, Univ Santiago de Compostela, 250 pp.
- Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M.J.L. y Barcelo, D., 2004. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2): 85-92.
- Rosales-Conrado, N., 2009. Hydrolysis study and extraction of spiroxamine from soils of different physico-chemical properties. *Chemosphere*, 77(6): 821-828.
- SANCO, 2011. Document No SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 40 pp.
- Sanchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J. y Lacorte, S., 2011. Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(38): 6799-6811.
- Sánchez-Chardi, A., López-Fuster, M.J. y Nadal, J., 2007. Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): Sex- and age-dependent variation. *Environmental Pollution*, 145(1):

7-14.

- Santos, X. y Llorente, G.A., 2009. Decline of a common reptile: case study of the viperine snake *Natrix maura* in a Mediterranean wetland. *Acta Herpetologica*, 4(2): 161-169.
- Saraji, M., Rezaei, B., Boroujeni, M.K. y Bidgoli, A.A.H., 2013. Polypyrrole/sol-gel composite as a solid-phase microextraction fiber coating for the determination of organophosphorus pesticides in water and vegetable samples. *Journal of Chromatography A*, 1279: 20-26.
- Sarmah, A.K., Close, M.E., Pang, L.P., Lee, R. y Green, S.R., 2005. Field study of pesticide leaching in a Himatangi sand (Manawatu) and a Kiripaka bouldery clay loam (Northland). 2. Simulation using LEACHM, HYDRUS-1D, GLEAMS, and SPASMO models. *Australian Journal of Soil Research*, 43(4): 471-489.
- Schafer, R.B., Caquet, T., Siimes, K., Mueller, R., Lagadic, L. y Liess, M., 2007. Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Science of the Total Environment*, 382(2-3): 272-285.
- Schafer, R.B., Gerner, N., Kefford, B.J., Rasmussen, J.J., Beketov, M.A., de Zwart, D., Liess, M. y von der Ohe, P.C., 2013. How to Characterize Chemical Exposure to Predict Ecologic Effects on Aquatic Communities? *Environmental Science & Technology*, 47(14): 7996-8004.
- Schafer, R.B., Pettigrove, V., Rose, G., Allinson, G., Wightwick, A., von der Ohe, P.C., Shimeta, J., Kuhne, R. y Kefford, B., 2011. Effects of Pesticides Monitored with Three Sampling Methods in 24 Sites on Macroinvertebrates and Microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 45(4): 1665-1672.
- Schleier, J.J. y Peterson, R.K.D., 2013. A refined aquatic ecological risk assessment for a pyrethroid insecticide used for adult mosquito management. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4): 948-953.
- Schneider, M. y Goss, K. U., 2012. Volatilization Modeling of Two Herbicides from Soil in a Wind Tunnel Experiment under Varying Humidity Conditions. *Environmental Science & Technology*, 46(22): 12527-12533.
- Schummer, C., Mothiron, E., Appenzeller, B.M.R., Rizet, A.L., Wennig, R. y Millet, M., 2010. Temporal variations of concentrations of currently used pesticides in the atmosphere of Strasbourg, France. *Environmental Pollution*, 158(2): 576-584.
- Shaw, G., 2011. New evidence for association of pesticides with Parkinson disease. *Neurology Today*, 11(7): 16-21.
- Shen, X., Su, Q., Zhu, X. y Gao, Y., 2007. Determination of pesticide residues in soil by modified matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Annali Di Chimica*, 97(8): 647-653.

- Silva, E., Pereira, A.C., Estalagem, S.P., Moreira-Santos, M., Ribeiro, R. y Cerejeira, M.J., 2012. Assessing the Quality of Freshwaters in a Protected Area within the Tagus River Basin District (Central Portugal). *Journal of Environmental Quality*, 41(5): 1413-1426.
- Singer, H., Jaus, S., Hanke, I., Lueck, A., Hollender, J. y Alder, A.C., 2010. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environmental Pollution*, 158(10): 3054-3064.
- Soitu.es, 2008. Los científicos recomiendan cultivar mejillones fuera de las bahías del Ebro. Disponible en Internet: http://www.soitu.es/soitu/2008/07/26/info/1217072262_578032.html, consultado en febrero de 2010.
- Soto, D.X., Roig, R., Gacia, E. y Catalan, J., 2011. Differential accumulation of mercury and other trace metals in the food web components of a reservoir impacted by a chlor-alkali plant (Flix, Ebro River, Spain): Implications for biomonitoring. *Environmental Pollution*, 159(6): 1481-1489.
- Sprague, J.B. y Ramsay, B.A., 1965. Lethal effects of mixed copper and zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 22: 425-432.
- Stehle, S., Knäbel, A. y Schulz, R., 2012. Probabilistic risk assessment of insecticide concentrations in agricultural surface waters: a critical appraisal. *Environmental Monitoring and Assessment*: 1-16.
- Stenrød, M., Heggen, H.E., Bolli, R.I. y Eklo, O.M., 2008. Testing and comparison of three pesticide risk indicator models under Norwegian conditions--A case study in the Skuterud and Heiabekken catchments. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(1-3): 15-29.
- Stokvis, E., Rosing, H. y Beijnen, J.H., 2005. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(3): 401-407.
- Teijon, G., Candela, L., Tamoh, K., Molina-Diaz, A. y Fernandez-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*, 408(17): 3584-3595.
- Terrado, M., Kuster, M., Raldua, D., De Alda, M.L., Barcelo, D. y Tauler, R., 2007. Use of chemometric and geostatistical methods to evaluate pesticide pollution in the irrigation and drainage channels of the Ebro river delta during the rice-growing season. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4): 1479-1488.
- Toan, P.V., Sebesvari, Z., Bläsing, M., Rosendahl, I. y Renaud, F.G., 2013. Pesticide

- management and their residues in sediments and surface and drinking water in the Mekong Delta, Vietnam. *Science of the Total Environment*, 452-453: 28-39.
- Travisi, C.M., Nijkamp, P., Vighi, M. y Giacomelli, P., 2004. *Managing Pesticide Risks for Non-Target Ecosystems with Pesticide Risk Indicators: a Multicriteria Approach*, Tinbergen Institute, Amsterdam, 25 pp.
- Tudela, E., Munoz, G. y Munoz-Guerra, J.A., 2012. Matrix effect marker for multianalyte analysis by LC-MS/MS in biological samples. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 901: 98-106.
- UNEP – United Nations Environment Programme (2007). Number of registered active pesticide ingredients. Disponible en Internet: http://www.grid.unep.ch/products/4_Maps/gwater_pestic_graphb.jpg, consultado en abril de 2013.
- Valhondo, C., Carrera, J., Ayora, C., Barbieri, M., Nödler, K., Licha, T., Huerta, M., 2014. Behavior of nine selected emerging trace organic contaminants in an artificial recharge system supplemented with a reactive barrier. *Environ Sci & Poll Res*. DOI: 10.1007/s11356-014-2834-7.
- Van Ael, E., Covaci, A., Blust, R. y Bervoets, L., 2012. Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: Environmental distribution and bioaccumulation. *Environment International*, 48: 17-27.
- Van Beusekom, O.C., Eljarrat, E., Barcelo, D. y Koelmans, A.A., 2006. Dynamic modeling of food-chain accumulation of brominated flame retardants in fish from the Ebro river basin, Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(10): 2553-2560.
- Van der Werf, H.M.G. y Zimmer, C., 1998. An indicator of pesticide environmental impact based on a fuzzy expert system. *Chemosphere*, 36(10): 2225-2249.
- Van Pinxteren, M., Bauer, C. y Popp, P., 2009. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of 10 pesticides in water: A comparison between membrane-assisted solvent extraction and solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1216(31): 5800-5806.
- Vercruyse, F. y Steurbaut, W., 2002. POCER, the pesticide occupational and environmental risk indicator. *Crop Protection*, 21(4): 307-315.
- Verro, R., Finizio, A., Otto, S. y Vighi, M., 2009. Predicting Pesticide Environmental Risk in Intensive Agricultural Areas. II: Screening Level Risk Assessment of Complex Mixtures in Surface Waters. *Environmental Science & Technology*, 43(2): 530-537.
- Vidal, M.L., Bassères, A. y Narbonne, J.F., 2002. Seasonal variations of pollution biomarkers in two populations of *Corbicula fluminea* (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 131(2): 133-151.
- Villaverde, J., Hildebrandt, A., Martinez, E., Lacorte, S., Morillo, E., Maqueda, C., Viana, P. y

- Barcelo, D., 2008. Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. *Science of the Total Environment*, 390(2-3): 507-513.
- Von der Ohe, P.C., Dulio, V., Slobodnik, J., De Deckere, E., Kühne, R., Ebert, R.-U., Ginebreda, A., De Cooman, W., Schüürmann, G. y Brack, W., 2011. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Science of The Total Environment*, 409(11): 2064-2077.
- Von der Ohe, P.C., Prub, A., Schafer, R.B., Liess, M., de Deckere, E. y Brack, W., 2007. Water quality indices across Europe - a comparison of the good ecological status of five river basins. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(9): 970-978.
- Wan, H.B., Wong, M.K. y Mok, C.Y., 1994. Comparative study on the quantum yields of direct photolysis of organophosphorus pesticides in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(11): 2625-2630.
- Wang, X., Cheng, J., Wang, X., Wu, M. y Cheng, M., 2012. Development of an improved single-drop microextraction method and its application for the analysis of carbamate and organophosphorus pesticides in water samples. *Analyst*, 137(22): 5339-5345.
- Wasswa, J., Kiremire, B.T., Nkedi-Kizza, P., Mbabazi, J. y Ssebugere, P., 2011. Organochlorine pesticide residues in sediments from the Uganda side of Lake Victoria. *Chemosphere*, 82(1): 130-136.
- Wode, F., Reilich, C., van Baar, P., Duennbier, U., Jekel, M. y Reemtsma, T., 2012. Multiresidue analytical method for the simultaneous determination of 72 micropollutants in aqueous samples with ultra high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1270: 118-126.
- Xie, J., Liu, T., Song, G., Hu, Y. y Deng, C., 2013. Simultaneous Analysis of Organophosphorus Pesticides in Water by Magnetic Solid-Phase Extraction Coupled with GC-MS. *Chromatographia*, 76(9-10): 535-540.
- Xing, Z., Chow, L., Rees, H., Meng, F., Li, S., Ernst, B., Benoy, G., Zha, T. y Hewitt, L.M., 2013. Influences of Sampling Methodologies on Pesticide-Residue Detection in Stream Water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(2): 208-218.
- Xue, N., Li, F., Hou, H. y Li, B., 2008. Occurrence of endocrine-disrupting pesticide residues in wetland sediments from Beijing, China. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(5): 1055-1062.
- Yang, D., Qi, S., Zhang, J., Wu, C. y Xing, X., 2013. Organochlorine pesticides in soil, water and sediment along the Jinjiang River mainstream to Quanzhou Bay, southeast China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89: 59-65.

- Yu, Z.G., Liu, B., Jiang, Z.H. y Zhang, G.L., 2009. Simultaneous determination of herbicide mefenacet and its metabolites residues in river water by solid phase extraction and rapid resolution liquid chromatography-mass spectrometry with pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1216(15): 3090-3097.
- Zamora, O., Paniagua, E.E., Cacho, C., Vera-Avila, L.E. y Perez-Conde, C., 2009. Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(6-7): 1745-1753.
- Zhao, S., Zhang, P.F., Crusius, J., Kroeger, K.D. y Bratton, J.F., 2011. Use of pharmaceuticals and pesticides to constrain nutrient sources in coastal groundwater of northwestern Long Island, New York, USA. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(5): 1337-1343.
- Zhao, Z., Zeng, H., Wu, J. y Zhang, L., 2013. Organochlorine pesticide (OCP) residues in mountain soils from Tajikistan. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 15(3): 608-616.



ANEXO I: Índice de abreviaturas y acrónimos

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACA: Agència Catalana d'Aigua

ACE: Estimación crónica - aguda (*Acute Chronic Estimation*)

ACN: Acetonitrilo

AEMET: Agencia Estatal de Meteorología

AERU: Agriculture & Environment Research Unit

AGBAR: Aigües de Barcelona

ALA: Alacloro

AOC: carbono orgánico correspondiente a algas (*Algae Organic Carbon*)

APCI: Ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

API: Ionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*)

AR: Agua Regenerada

ARNT: Agua Residual No Tratada

ART: Agua Residual Tratada

ASE: Extracción acelerada por disolventes (*Accelerated Solvent Extraction*)

AT: Agua Tratada

ATR: Atrazina

BEN: Bentazona

BSV: Puntos de agua subterránea

C: Concentración

CA: Carbón Activo

CAS number: número de identificación numérica única para compuestos químicos
(*Chemical Abstracts Service registry number*)

CE: Comunidad Europea

CFME: Micro extracción por flujo (*Continuous Flow Micro Extraction*)

CFP: Clorfenvinfos

CIA: Cianazina

Cl: cloración

CLO: Clortolurón

CMA: Concentración Máxima Admisible

CNIG: Centro Nacional de Información Geográfica

CPF: Clorpirifos

CR: Capa Reactiva

Cte. Henry: relación entre la concentración de una sustancia en aire y su concentración en agua en equilibrio

CV: Coeficiente de Variación

DAD: Detector de diodos en fila (*Diode Array Detector*)

DBO₅: Demanda biológica de oxígeno de 5 días

DCM: Diclorometano

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DEA: Desetilatrazina

DIA: Deisopropilatrazina

DIAZ: Diazinón

DIME: Dimetoato

Dir: Directiva

DIU: Diurón

DMA: Directiva Marco del Agua

DMS: Programa de modelo de flujo (*DuFlow Modelling Studio*)

DOC: Carbono orgánico disuelto (*Dissolved Organic Carbon*)

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DSPE: Dispersión en fase sólida (*Dispersive Solid Phase Extraction*)

EAT: Estimación de toxicidad aguda (*Estimating Acute Toxicity*)

EBR: Ebro

EC: Energía de Colisión

EC₅₀: Concentración efectiva que provoca la muerte u otro efecto en el 50% de los individuos expuestos (*Effective Concentration*)

ECD: Detector de captura de electrones (*Electron Capture Detector*)

EDAR: Estación de Depuración de Agua Residual

EI: Ionización por impacto electrónico (*Electronic Impact*)

EPA: Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency*)

EQS: Normas de calidad ambiental (*Environmental Quality Standards*)

ERA: Evaluación de Riesgo Ambiental

ERPWI: índice de relevancia ambiental de los plaguicidas provenientes de EDARs (*Environmental Relevance of Pesticides from Waste water treatment plants Index*)

ESI: Ionización por electropulverización (*ElectroSpray Ionization*)

ETAP: Estación de Tratamiento de Agua Potable

F: Flujo

FEN: Fenitrotión

FOX: Fenitrotión oxón

FPD: Detector fotométrico de llama (*Flame Photometric Detector*)

GC: Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*)

GIS: Sistema de información geográfica (*Geographic Information System*)

GPC: Cromatografía de permeación en gel (*Gel Permeation Chromatography*)

GUA: Guadalquivir

GUS: Estimación del potencial de lixiviación de un plaguicida hacia aguas subterráneas (*Groundwater Ubiquity Score*)

H: Hipótesis

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectrometry*)

ICC: Instituto de Cartografía de Cataluña

ICE: Estimación de la correlación inter especies (*Interspecies Correlation Estimation*)

ID: Dilución isotópica (*Isotope Dilution*)

IDEC: Infraestructura de Datos Especiales de Cataluña

IGN: Instituto Geográfico Nacional

INF: Infiltración

IRI: Intensidad Relativa de Iones

IS: Patrón interno (*Internal Standard*)

ISO: Isoproturón

JUC: Júcar

K_d: Constante de adsorción

K_{des}: Constante de desorción

K_{oc}: Coeficiente de partición del carbono orgánico

K_{ow}: Coeficiente de partición octanol-agua

LC: Cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*)

LC₅₀: Concentración letal que provoca la muerte u otro efecto en el 50% de los individuos expuestos (*Letal Concentration*)

Ldet: Límite de determinación

LINU: Linurón

LLE: Extracción líquido-líquido (*Liquid Liquid Extraction*)

LLO: Llobregat

LOD: Límite de detección (*Limit Of Detection*)

LOQ: Límite de cuantificación (*Limit Of Quantification*)

LPME: Micro-extracción en fase líquida (*Liquid Phase Micro Extraction*)

LVI: Inyección de grandes volúmenes (*Large Volum Injection*)

m/e: Relación masa/carga

MAE: Extracción asistida por microondas (*Microwave Assisted Extraction*)

MAEP: Variación de la técnica MAE, con partición (*Microwave Assisted Extraction and partitioning*)

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

MALA: Malatión

MASE: Extracción líquido-líquido asistida por membranas (*Membrane Assisted Solvent Extraction*)

MCPA: Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi) acético

MECO: Mecoprop

MeOH: Metanol

METO: Metolacloro

MF: Microfiltración

MIP: Polímeros con impresión a nivel molecular (*Molecularly Imprinted Polymers*)

MISPE: Extracción en fase sólida de impresión molecular (*Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction*)

MM: Masa molecular

MMSPD: Dispersión en fase sólida de una matriz modificada (*Modified Matrix Solid Phase Dispersion*)

MOLI: Molinato

MOX: Malaoxón

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MS: Espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)

MSPE: Extracción en fase sólida magnética (*Magnetic Solid Phase Extraction*)

NCA: Normas de calidad ambiental

NET: Network

NF: Nanofiltración

NOEC: Concentración sin efectos observados (*No Observed Effect Concentration*)

NPD: Detector de nitrógeno-fósforo (*Nitrogen-Phosphorus Detector*)

N_t: Nitrógeno total

O₃: Ozonización

OI: Osmosis Inversa

OMIVE: modelo para describir el comportamiento y el destino de microcontaminantes orgánicos en aguas superficiales unidimensionales (del holandés *Organische MicroVErontreinigingen*)

OSC: Organización de la Sociedad Civil

PAHs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos (del inglés *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

PAN: Red de Acción en Plaguicidas (*Pesticide Action Network*)

PEC: Concentración ambiental esperada (*Predicted Environmental Concentration*)

PET: Politereftalato de Etileno.

pKa: -log de la constante de disociación ácido-base

- PLE:** Extracción con líquidos presurizados (*Pressurized Liquid Extraction*)
- PNEC:** Concentración sin efecto (*Predicted No Effect Concentration*)
- POC:** Carbono orgánico particulado (*Particulated Organic Carbon*)
- POCIS:** Muestreador pasivo para compuestos orgánicos polares (*Polar Organic Chemical Integrative Samplers*)
- POR:** porosidad
- PRISW-1:** Índice de riesgo de plaguicidas para sistemas de agua superficial (*short-term Pesticide Risk Index for Surface Water system*)
- PROP:** Propanil
- PSE:** Extracción con disolventes presurizados (*Pressurized Solvent Extraction*)
- P_t:** Fósforo total
- Q:** Analizador de tipo cuadrupolo (*Quadrupole*)
- QqLIT:** Analizador híbrido cuadrupolo – trampa lineal de iones (*Linear Ion Trap*)
- QqQ:** Analizador de triple cuadrupolo
- QqToF:** Analizador híbrido cuadrupolo – tiempo de vuelo (*Time Of Flight*)
- QuEchERS:** Extracción rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction*)
- R:** Recuperación
- RA:** Recuperación Absoluta
- RAM:** Material de acceso restringido (*Restricted Access Material*)
- Reg:** Reglamento
- RP-LC:** Cromatografía de líquidos en fase reversa (*Reversed Phase-Liquid Chromatography*)
- rpm:** revoluciones por minuto
- RR:** Recuperación Relativa
- RRLC:** Cromatografía de líquidos de rápida resolución (*Rapid Resolution Liquid Chromatography*)
- RUB:** Rubí
- SBSE:** Extracción por sorción sobre barras magnéticas (*Stir Bar Sorptive Extraction*)
- SD:** Desviación estándar (*Standard Deviation*)
- SDB:** Copolímero de estireno-divinilbenceno (*Styrene DivinylBenzene copolymer*)
- SDME:** Micro extracción en gota (*Single Drop Micro Extraction*)
- SED:** Sedimento
- SILIS:** Patrón interno marcado isotópicamente (*Stable Isotopically Labeled Internal Standard*)
- SIMA:** Simazina
- SLE:** Extracción sólido-líquido (*Solid Liquid Extraction*)

- SMZ:** Sulfametoxazol
- SOH:** Hidroxi simazina
- SPE online:** Extracción en fase sólida en línea (*online Solid Phase Extraction*)
- SPE:** Extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*)
- SPME:** Micro extracción en fase sólida (*Solid Phase Micro Extraction*)
- SRM:** Registro de reacciones seleccionadas (*Selected Reaction Monitoring*)
- SS:** Sólidos en Suspensión
- SUB:** Subterránea
- SUP:** Superficial
- TER:** Coeficiente de exposición toxicológica (*Toxicological Exposure Ratio*)
- TER:** Terbutilazina
- TFC:** Cromatografía de flujo turbulento (*Turbulent-Flow Chromatography*)
- THM:** Trihalometanos
- TOC:** Carbono orgánico total (*Total Organic Carbon*)
- ToF:** Analizador de tiempo de vuelo (*Time of Flight*)
- TR:** Tiempo de Retención
- TU:** Unidad tóxica (*Toxic Unit*)
- UE:** Unión Europea
- UF:** Ultrafiltración
- UHPLC:** Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)
- UNT:** Unidades Nefelométricas de Turbidez
- UPLC:** Cromatografía de líquidos de ultra resolución (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)
- USE:** Extracción por sonicación (*Ultra-Sonication Extraction*)
- UV:** Ultravioleta
- WCSI:** Índice de difusión en el ciclo del agua (*Water Cycle Spreading Index*)

ANEXO II: Índice de tablas

Tabla 1 - 1. Lista y descripción de clasificaciones de plaguicidas.....	23
Tabla 1 - 2. Lista de índices, indicadores y modelos que se aplican en la evaluación de riesgo de plaguicidas en matrices ambientales.	35
Tabla 1 - 3. Orden cronológico de leyes (separadas por tipo) de aplicación a los plaguicidas en las matrices ambientales estudiadas en esta memoria.....	38
Tabla 1 - 4. Metodologías aplicadas en diversos estudios (orden cronológico) para el análisis de plaguicidas en muestras de agua.	46
Tabla 1 - 5. Metodologías aplicadas en diversos estudios (orden cronológico) para el análisis de plaguicidas en muestras sólidas.....	51
Tabla 1 - 6. Plaguicidas y productos de transformación investigados en esta Tesis Doctoral.	62
Tabla 1 - 7. Plaguicidas y productos de transformación investigados en esta tesis: estructura molecular, número CAS, MM, solubilidad en agua, Pka, K_{oc} , K_{ow} , constante de Henry e índice GUS.	64
Tabla 1 - 8. Ámbito de aplicación de los insecticidas/fungicidas objeto de estudio. Celdas en amarillo indican plaguicidas que se formulan en conjunto para un uso dado..	69
Tabla 1 - 9. Ámbito de aplicación de los herbicidas objeto de estudio. Celdas en amarillo indican plaguicidas que se formulan en conjunto para un uso dado.....	72
Tabla 1 - 10. Estatus legal de los plaguicidas objeto de estudio.....	75
Tabla 2 - 1. Condiciones experimentales finales del MS/MS.	85
Tabla 2 - 2. Condiciones MS/MS seleccionadas para el análisis en modo SRM de los 22 plaguicidas objeto de estudio.	87
Tabla 2 - 3. Condiciones experimentales finales del MS/MS.	107
Tabla 2 - 4. Condiciones MS/MS seleccionadas para el análisis en modo SRM de los analitos objeto de estudio (en negrita las correspondientes a los plaguicidas).	107
Tabla 2 - 5. Estructuras de las propuestas de fragmentación de los analitos (SRM1, SRM2) y de sus respectivos compuestos deuterados (SRMd).....	111
Tabla 2 - 6. Linealidad y resultados (recuperación relativa y coeficiente de variación) obtenidos en los estudios de recuperación (n=6) llevados a cabo en las distintas matrices de agua.....	124
Tabla 2 - 7. Resultados del estudio de recuperación y precisión a dos niveles, R1 y R2, y límites de los métodos aplicados al análisis de muestras de agua subterránea y sedimento.	128

Tabla 2 - 8. Tipos de calibraciones aplicadas en los últimos 5 años a estudios donde 20 ó más plaguicidas se han investigado en muestras de agua por medio de técnicas del tipo LC-MS ⁿ .	134
Tabla 3 - 1. Total de muestras analizadas en el estudio de evaluación del impacto de la re-utilización de aguas residuales tratadas.	177
Tabla 3 - 2. Principales tratamientos terciarios existentes y su aplicación en las EDARs estudiadas en esta Tesis Doctoral.	182
Tabla 3 - 3. Principales usos de las aguas regeneradas permitidos por ley (Ormad et al. 2011).	187
Tabla 4 - 1. Descripción de las 289 muestras analizadas.	263
Tabla 4 - 2. Composición de las muestras del 1 ^{er} ensayo de adsorción.	264
Tabla 4 - 3. Composición de las muestras del 2 ^o ensayo de adsorción.	266
Tabla 4 - 4. Análisis descriptivo de los resultados por analito y zona de muestreo.	267
Tabla 4 - 5. Datos utilizados para el estudio de las interacciones agua superficial – sedimento - agua subterránea.	284
Tabla 4 - 6. Resumen cualitativo de la presencia (frecuencia de detección y concentración) de los plaguicidas en los diferentes estudios (E1 a E6).	288
Tabla 5 - 1. Puntuación del TER y clasificación del índice PRISW-1 (Finizio et al. 2001).	306

ANEXO III: Índice de figuras

Figura 1 - 1. Número de ingredientes activos de plaguicidas registrados en Europa.	24
Figura 1 - 2. Consumo de fitosanitarios en España. (a) Consumo de las diversas familias de plaguicidas en 2010 y serie histórica (b) en kg de ingrediente activo por hectárea y (c) en millones de euros.....	25
Figura 1 - 3. Fuentes y destino de los plaguicidas. EDAR: Estación de Depuración de Agua Residual; ETAP: Estación de Tratamiento de Agua Potable.....	26
Figura 1 - 4. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) a la salida de EDARs. ..	28
Figura 1 - 5. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en aguas superficiales..	29
Figura 1 - 6. Intervalo de concentraciones (ng/g) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en sedimentos.....	30
Figura 1 - 7. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en aguas subterráneas.	31
Figura 1 - 8. Intervalo de concentraciones (ng/L) de plaguicidas individuales observadas en diversos estudios (orden cronológico de muestreo) en aguas potables.....	32
Figura 1 - 9. Número de publicaciones científicas (total de 4554) que abordan el tema de los plaguicidas en aguas, suelos y/o sedimentos en los últimos 23 años según SCOPUS; fecha: 04.04.2013. Criterio de búsqueda: pesticides or insecticides and surface water or groundwater or wastewater or sedimento or soil in Article title, Abstract, Keywords).....	33
Figura 1 - 10. Características de las 4554 publicaciones relacionadas con el ámbito de plaguicidas y medio ambiente: clasificación de los 20 países que más publican al respecto (diagrama de barras) y áreas de conocimiento en las que se clasifican (diagrama circular).	33
Figura 1 - 11. Gestión de las sustancias químicas. Fuente: INE 2000.	34
Figura 1 - 12. Resumen de las técnicas de extracción aplicadas a muestras de aguas en los estudios citados en la Tabla 1-4.	48
Figura 1 - 13. Esquema parcial de la extracción en fase sólida en línea con la cromatografía (SPE online): (A) paso de la muestra por el cartucho; (B) elución de los analitos hacia la columna cromatográfica.....	49
Figura 1 - 14. Resumen de las técnicas de extracción aplicadas a muestras sólidas en los estudios citados en la Tabla 1-5.	52
Figura 1 - 15. Esquema de la técnica de extracción por líquidos presurizados (PLE). Adaptación de American Lab, 2013.....	53

Figura 1 - 16. Diagrama de flujo de selección de columnas para LC (adaptado de Bidlingmeyer, 1993).	55
Figura 1 - 17. Resumen de las técnicas de separación y detección aplicadas a muestras de agua y muestras sólidas en los estudios citados en las tablas 1-4 y 1-5.	56
Figura 1 - 18. Esquema del sistema MS/MS de un ACQUITY® TQ Detector de la empresa Waters®.....	58
Figura 2 - 1. Sistema de extracción en fase sólida automatizada: Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, Holanda).	82
Figura 2 - 2. Etapas del método de extracción de plaguicidas por SPE online usando un Prospekt-2.....	83
Figura 2 - 3. Gradiente de la fase móvil aplicado en el análisis cromatográfico.	84
Figura 2 - 4. Modos de espectrometría operados durante la optimización del método MS/MS.	86
Figura 2 - 5. Cromatogramas correspondientes al análisis por online SPE-LC-MS/MS de 5 mL de agua de grado HPLC fortificada con 100 ng/L de cada analito.	109
Figura 2 - 6. Cromatogramas de las transiciones, fragmentación y espectros de los herbicidas diurón (A), simazina (B) y bentazona (C) y de sus respectivos IS en una solución patrón con la mezcla de compuestos a 1 ng/μL y de los SILIS a 0,1 ng/μL. SRMd: SRM del compuesto deuterado.....	110
Figura 2 - 7. Transiciones del MCPA. Respuesta de cinco transiciones (2 del MCPA d3 y 3 del MCPA) durante el análisis de una mezcla de plaguicidas y una mezcla de deuterados, respectivamente.	117
Figura 2 - 8. Tiempo de retención (TR) de los analitos objeto de estudio.....	119
Figura 2 - 9. Gradientes de fase móvil probados para el análisis del cocktail de contaminantes orgánicos.....	120
Figura 2 - 10. Ejemplo de compuestos con IRIs muy distintas (baja (a) y alta (b)), y su efecto en el cálculo del límite de determinación (Ldet) del método.....	122
Figura 2 - 11. Recuperación absoluta y recuperación relativa obtenida para los distintos plaguicidas (ordenados en base a su tiempo de retención cromatográfico) en agua HPLC (nivel de fortificación = 500 ng/L, n = 5).....	123
Figura 2 - 12. Cálculo del efecto causado por las matrices de ART (agua residual tratada) y ARNT (agua residual no tratada) en el análisis del clortolurón mediante online SPE-LC-MS/MS.	125
Figura 2 - 13. Estudio del efecto matriz. Supresión y aumento de señal (%) causada por la presencia de la matriz al analizar agua residual tratada (ART) y agua residual no tratada (ARNT) en muestras fortificadas a 500 ng/L (n=3).....	126

- Figura 2 - 14.** Límites del método (Ldet (a) y LOD (b)) para cada una de las 5 matrices de agua en estudio: agua de grado HPLC, agua subterránea (SUB), agua superficial (SUP), agua residual tratada (ART) y agua residual no tratada (ARNT).....127
- Figura 2 - 15.** Esquema de proceso analítico desarrollado para el análisis de plaguicidas en agua por online SPE-LC-MS/MS: (a) preparación de la muestra; (b1) método de extracción de 22 plaguicidas; (b2) método de extracción de 4 plaguicidas y otros contaminantes; (c) método de análisis.....129
- Figura 2 - 16.** Esquema de proceso analítico desarrollado para el análisis de plaguicidas en sedimento por PLE-SPE-LC-MS/MS en los dos métodos desarrollados: (a) preparación de la muestra; (b) preparación de la celda; (c) extracción por PLE; (d) purificación y concentración por SPE; (e) concentración del extracto; (f) método de análisis.130
- Figura 2 - 17.** Estudio del efecto matriz. Promedio de supresión y aumento de señal (%) causada por la presencia de la matriz al analizar agua subterránea (SUB), agua residual tratada (ART), agua residual no tratada (ARNT) y sedimento (SED) en muestras fortificadas a 100 ng/L y 50 ng/g (aguas y sedimento, respectivamente).....132
- Figura 3 - 1.** Ciclo del agua urbana.....139
- Figura 3 - 2.** Eliminación de plaguicidas en las EDARs. Porcentaje de casos en los que se ha dado la eliminación parcial o total de los plaguicidas, o se han registrado aumentos de las concentraciones a la salida de las depuradoras cuando comparadas a las respectivas aguas de entrada. Sólo se han considerado los casos (en paréntesis) en que el analito se haya detectado en por lo menos una de las aguas, de entrada o de salida (ver las condiciones de los cálculos en la publicación #2).181
- Figura 3 - 3.** Concentración (ng/L) de simazina (SIMA), terbutilazina (TER), diurón (DIU) y diazinón (DIAZ) antes (AT – agua tratada) y después (AR – agua regenerada) del tratamiento terciario aplicado en la EDAR-A y en la EDAR de El Prat de Llobregat.183
- Figura 3 - 4.** Concentración total de plaguicidas (ng/L) en aguas de la EDAR de El Prat de Llobregat: (AT) aguas tratadas (punto #5); (AR) aguas regeneradas (punto #3) (apartado 3.3.1).....184
- Figura 3 - 5.** Estudio de la eliminación de plaguicidas con diferentes tratamientos: sulfato de aluminio (Al), oxidación con cloro (Cl), oxidación con ozono, adsorción con

carbón activo (CA), y combinaciones de ellos. Resultados extraídos de Ormad et al. 2008.....	185
Figura 3 - 6. Volumen de agua residual regenerada que se re-utiliza en España, por zonas. Datos de MAGRAMA 2007.....	187
Figura 3 - 7. Concentración total de plaguicidas (ng/L) en el río Llobregat (punto #2) antes y después del inicio del vertido de aguas regeneradas.	188
Figura 3 - 8. Concentración total de plaguicidas (ng/L) en aguas de (E) entrada (punto #2) y (S) salida (punto #4) de la potabilizadora, antes y después del inicio del vertido de aguas regeneradas en el río.	190
Figura 4 - 1. Distribución de agua en el mundo.....	193
Figura 4 - 2. Ciclo de contaminación de las aguas y los sedimentos por plaguicidas. DOC: carbono orgánico disuelto (del inglés <i>dissolved organic carbon</i>); POC: carbono orgánico particulado (del inglés <i>particulated organic carbon</i>).....	194
Figura 4 - 3. Fotografías de las balsas de decantación e infiltración durante el proceso de recarga artificial.....	260
Figura 4 - 4. Detalles de los puntos de toma de muestra: (A) perfil vertical; (B) perfil horizontal; (C) muestras de capa reactiva.	262
Figura 4 - 5. Filtración de las muestras del ensayo de adsorción.....	265
Figura 4 - 6. Perfil de concentraciones (ng/L) de los 4 plaguicidas al entrar en la balsa de infiltración (INF) y en el agua subterránea / intersticial (parte inferior) a lo largo de las distintas campañas.	269
Figura 4 - 7. Concentraciones de diurón y de simazina (media \pm desviación estándar) encontradas en las campañas de referencia (BLANCO, C1 y C3), en la campaña de recarga sin capa reactiva (C2) y durante todas las campañas de recarga con capa reactiva (C4-C25). Entre paréntesis: número de muestras analizadas en cada caso.	270
Figura 4 - 8. Estudio de correlación por tipo de campaña (con o si capa reactiva) entre el punto de agua subterránea de referencia (BSV-1) y los demás puntos de agua subterránea que se han muestreado de forma regular: (A) BSV-2; (B) BSV-5; (C) BSV-8.1; (D) BSV-8.3; (E) BSV-9; (F) BSV-10.	271
Figura 4 - 9. Primer ensayo de adsorción: concentración de los analitos en la muestra No. 1 (BLANCO) correspondiente a agua de río dopada con los compuestos a 1000 ng/L.....	273
Figura 4 - 10. Resultados de los ensayos de adsorción. Concentración de los analitos en los ensayos con (a) arcilla, hierro y compost (1 ^{er} ensayo), y con (b) compost fresco y capa reactiva (2 ^o ensayo).	273

Figura 4 - 11. Detalles de los puntos de toma de muestra.	275
Figura 4 - 12. Niveles de plaguicidas (ng/g) en las muestras de sedimento.....	276
Figura 4 - 13. Los plaguicidas estudiados en función de la propabilidad de hallazgo en sedimentos, basándose estrictamente en 4 de sus propiedades: solubilidad, movilidad (K_{oc}), potencial de bioacumulación (K_{ow}) y volatilidad (Cte. de henry). En destaque, cuatro de los cinco plaguicidas detectados en el estudio.	276
Figura 4 - 14. Concentración de los plaguicidas detectados en sedimentos en función del contenido de materia orgánica (TOC).....	277
Figura 4 - 15. Las aguas en Cataluña: Distrito de Cuenca Fluvial (mapa) y usos del agua (diagrama circular) (Generalitat de Catalunya, 2008).	278
Figura 4 - 16. Localización de los puntos (círculos negros) en donde se ha estudiado la interacción agua superficial - sedimento - agua subterránea en (a) la zona del Delta del Ebro y (b) el río Llobregat. Mapas facilitados por la Agencia Catalana del Agua (ACA), (http://acamap.gencat.cat/impress/#).	282
Figura 5 - 1. Ejemplos de estudios de transporte y toxicidad realizados en los diversos compartimentos ambientales y ecológicos.	294
Figura 5 - 2. Fases implicadas en el proceso de ERA de plaguicidas en el medio ambiente acuático. Las etapas destacadas en colores indican los procesos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral.	296
Figura 5 - 3. Mapa de los puntos de toma de muestra en el Delta del Ebro.	298
Figura 5 - 4. Toxicidad teórica de los plaguicidas en los 6 puntos estudiados para los tres microorganismos acuáticos: (a) crustáceos; (b) algas; (c) bacterias.....	300
Figura 5 - 5. Toxicidades teóricas y experimentales en los distintos puntos de muestreo para los tres microorganismos acuáticos estudiados: (a) crustáceos; (b) algas; (c) bacterias. %I: promedio del porcentaje de inhibición (a mayor inhibición, mayor toxicidad).	301
Figura 5 - 6. Características de la zona de estudio.	304
Figura 5 - 7. Caudales del río Llobregat (m ³ /s) en los puntos (1) y (2) durante las tres campañas de estudio.	305
Figura 5 - 8. Resultados separados por campañas: (a) concentración total de plaguicidas; (b) flujo de masa de plaguicidas; (c) unidades tóxicas relativas para los tres organismos acuáticos; e (d) índice PRISW-1 para cada muestra.	307
Figura 5 - 9. Contribución individual relativa de los plaguicidas detectados en las muestras que han mostrado los índices PRISW-1 más altos.	308

Figura 5 - 10. Mapa de las EDARs en Cataluña caracterizadas por su carga orgánica (demanda química de oxígeno por día - DQO/d) y detalle de la toma de muestras de agua en tres de ellas.....	310
Figura 5 - 11. ERPWI de los 6 plaguicidas más representativos de cada EDAR, separados por campaña: (a) EDAR-A; (b) EDAR-B; (c) EDAR-C.....	311
Figura 5 - 12. (a) Eliminación relativa media de los plaguicidas detectados en las tres EDARs; (b) índice WCSI (calculado según Reemtsa et al. 2006); (c) índice ERPWI (valor medio correspondiente a las tres EDARs y los tres organismos). Números en paréntesis indican el número de casos.	313
Figura 5 - 13. Características de la zona de estudio.	315
Figura 5 - 14. Detalles del modelo de balance de flujo de masa adoptado en la parte baja del río Llobregat: diagrama y ecuaciones.	316
Figura 5 - 15. Caudal (m ³ /s) de los diferentes puntos estudiados en las 3 campañas de muestreo realizadas.	316
Figura 5 - 16. Correlación entre el promedio de la concentración real (eje x) y la concentración calculada (eje y) de los plaguicidas detectados (8 de un total de 22) en el punto (2) del estudio. Línea continua: correlación ideal; línea discontinua: correlación real.....	317
Figura 5 - 17. El sistema: (a) principales componentes (POR: porosidad); (b) descripción de los principales procesos de transporte del modelo OMIVE: [1] sedimentación, [2] volatilización, [3] difusión, [4] advección, [5] degradación, [6] resuspensión, [7] pseudo advección	320
Figura 5 - 18. Equilibrio de masa adoptado por el modelo OMIVE.....	320
Figura 5 - 19. La Network: (a) visión general del tramo de 50 km de río modelado; (b) detalle del primer tramo modelado.....	321
Figura 5 - 20. Modelo de flujo del río durante un periodo de 72 hrs: (a) en condiciones iniciales; (b) tras 36 hrs; (c) tras 72 hrs.....	322
Figura 5 - 21. Evolución del flujo antes y después de la captación de agua en Sant Joan Despí durante un periodo de 72 horas.	323
Figura 5 - 22. Resumen de casos en los que los plaguicidas estudiados han superado las NCA establecidas en la Directiva 2006/118/CE: (a) niveles de plaguicidas individuales > 100 ng/L; (b) niveles de plaguicidas totales > 500 ng/L.....	326