



# Agents antimicrobians en el sistema sòl-aigua: estudis de sorció

Marc Teixidó i Planes

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.



**Facultat de Química**  
**Departament de Química Analítica**

Programa de Doctorat:  
Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució  
BIENNI: 2006-2008

Tesi Doctoral:

**AGENTS ANTIMICROBIANS EN EL SISTEMA SÒL-AIGUA: ESTUDIS DE  
SORCIÓ**

Memòria presentada per

**MARC TEIXIDÓ i PLANES**

Per tal d'optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Directors:

**Dr. JOSÉ LUIS BELTRÁN**

**Dra. MERCÈ GRANADOS**



El Dr. **JOSÉ LUIS BELTRÁN BADIA**, professor titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i la Dra. **MERCÈ GRANADOS JUAN**, professora titular del mateix Departament,

FAN CONSTAR:

Que la present memòria titulada "**Agents antimicrobians en el sistema sòl-aigua: estudis de sorció**" ha estat realitzada sota la nostra direcció pel Sr. MARC TEIXIDÓ i PLANES en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i que tots els resultats presentats en la mateixa són fruit de les experiències realitzades pel citat doctorand.

I perquè així es faci constar, expedim i signem el present certificat.

Barcelona, 8 de març de 2013

Dr. **JOSÉ LUIS BELTRÁN ABADIA**

Dra. **MERCÈ GRANADOS JUAN**



## Abreviatures i acrònims

---

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>CEC</b>	Capacitat de bescanvi catiònic ( <i>cation exchange capacity</i> )
<b>CNT</b>	Nanotubs de carboni ( <i>carbon nanotubes</i> )
<b>C<sub>s</sub></b>	Concentració de sorbat en la fase sòlida
<b>CTC</b>	Clortetraciclina
<b>C<sub>w</sub></b>	Concentració de sorbat en la fase líquida
<b>DC</b>	Doxiciclina
<b>DMM</b>	Model dual simple ( <i>simple dual-mode model</i> )
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentració efectiva mitjana ( <i>median effective concentration</i> )
<b>EDA</b>	Donador-acceptor d'electrons ( <i>electron donor-acceptor</i> )
<b>EMA</b>	Agència Europea de Medicaments ( <i>European Medicines Agency</i> )
<b>EUA</b>	Estats Units d'Amèrica
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FL</b>	Fluorescència
<b>HOC</b>	Contaminants orgànics hidrofòbics ( <i>hydrophobic organic contaminants</i> )
<b>K<sub>d</sub></b>	Coeficient de distribució
<b>K<sub>OC</sub></b>	Coeficient de distribució normalitzat al contingut de carboni orgànic
<b>K<sub>ow</sub></b>	Coeficient de partició octanol-aigua
<b>LC</b>	Cromatografia de líquids ( <i>liquid chromatography</i> )

<b>LC<sub>50</sub></b>	Concentració letal mitjana ( <i>median lethal concentration</i> )
<b>LOQ</b>	Límit de quantificació ( <i>limit of quantification</i> )
<b>LSC</b>	Comptatge d'escintil·lació líquida ( <i>liquid scintillation counting</i> )
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>M<sub>s</sub></b>	Massa de sorbent
<b>MWSE</b>	Error quadràtic mitjà ponderat ( <i>mean weighted square error</i> )
<b>NLLS</b>	Regressió no lineal per mínims quadrats ( <i>nonlinear least squares</i> )
<b>OC</b>	Carboni orgànic ( <i>organic carbon</i> )
<b>ODR</b>	Regressió per distància ortogonal ( <i>orthogonal distance regression</i> )
<b>OECD</b>	Organització per a la cooperació i el desenvolupament econòmic ( <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i> )
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>OTC</b>	Oxitetraciclina
<b>PAH</b>	Hidrocarbur aromàtic policíclic ( <i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i> )
<b>PC</b>	Component principal ( <i>principal component</i> )
<b>PCA</b>	Anàlisi per components principals ( <i>principal component analysis</i> )
<b>PEC</b>	Concentració ambiental estimada ( <i>predicted environmental concentration</i> )
<b>PLS</b>	Regressió per mínims quadrats parcials ( <i>partial least squares regression</i> )
<b>PNEC</b>	Concentració estimada de no-efecte ( <i>predicted no effect concentration</i> )
<b>ppb</b>	Part per bilió
<b>ppm</b>	Part per milió
<b>ppt</b>	Part per trilió

<b>QSAR</b>	Relació quantitativa estructura-activitat ( <i>quantitative structure-activity relationship</i> )
<b>RMSE</b>	Arrel de l'error quadràtic mitjà ( <i>root mean square error</i> )
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>RQ</b>	Quocient de risc ( <i>risk quotient</i> )
<b>SMT</b>	Sulfametazina
<b>SMX</b>	Sulfametoxazole
<b>SPY</b>	Sulfapiridina
<b>STZ</b>	Sulfatiazole
<b>S<sub>w</sub></b>	Solubilitat en aigua
<b>TC</b>	Tetraciclina
<b>UE</b>	Unió Europea
<b>UFC</b>	Unitat formadora de colònies
<b>USDA</b>	Departament d'Agricultura dels EUA ( <i>United States Department of Agriculture</i> )
<b>UV</b>	Radiació ultraviolada
<b>vdW</b>	Forces de van der Waals
<b>VICH</b>	<i>Veterinary International Co-operation on Harmonisation</i>
<b>Vis</b>	Visible
<b>V<sub>w</sub></b>	Volum de líquid
<b>XRF</b>	Fluorescència de raigs X ( <i>X-ray fluorescence</i> )





## ÍNDIX

---

<b>Capítol 1. Objectius</b> .....	1
<b>Capítol 2. Introducció</b> .....	5
2.1. Agents antimicrobians .....	7
2.2. Ús d'agents antimicrobians en medicina veterinària .....	9
2.3. Presència d'antimicrobians en el medi ambient.....	13
2.3.1. Vies d'entrada als diferents compartiments ambientals .....	13
2.3.2. Contaminació de sòls agrícoles i sediments .....	16
2.4. Interacció dels agents antimicrobians amb el sòl.....	17
2.4.1. Sorció.....	17
2.4.2. Isotermes i models de sorció .....	21
2.5. Avaluació de risc ambiental .....	24
2.6. Agents antimicrobians estudiats .....	27
2.6.1. Tetraciclines .....	27
2.6.1.2. Presència en el medi ambient .....	31
2.6.2. Sulfonamides.....	33
2.6.2.1. Propietats fisicoquímiques.....	37
2.6.2.2. Presència en el medi ambient .....	39
2.7. Sòls.....	41
2.7.1. Fracció mineral.....	42
2.7.2. Carboni orgànic .....	43
2.7.3. Càrrega superficial .....	44
2.7.4. Capacitat de bescanvi catiònic .....	45
2.7.5. Perfils i classificació.....	45
2.8. Biochar .....	54

2.8.1. Biochar, un tipus de negre de carboni .....	54
2.8.2. Característiques del biochar: estructura i propietats fisicoquímiques .....	55
2.8.3. Aplicacions ambientals i agrícoles .....	59
2.8.4. Sorció de contaminants .....	62
<b>Capítol 3. Part experimental</b> .....	<b>85</b>
3.1. Instrumentació.....	87
3.1.1. Cromatografia de líquids .....	87
3.1.2. Espectrometria d'escintil·lació líquida .....	87
3.1.3. Altres instruments i equips.....	88
3.2. Reactius, dissolucions i materials .....	89
3.2.1. Reactius .....	89
3.2.2. Dissolvents .....	90
3.2.3. Sòls .....	91
3.2.4. Biochars .....	93
3.3. Metodologia de treball .....	95
3.3.1. Estudis de sorció .....	95
3.3.1.1. Sorció de tetraciclines en sòls .....	95
3.3.1.2. Sorció de sulfametazina en biochar i mescles sòl-biochar .....	96
3.3.2. Determinació de les concentracions aquoses de sorbat .....	100
3.3.2.1. Determinació cromatogràfica de tetraciclines .....	100
3.3.2.2. Determinació cromatogràfica de la sulfametazina .....	101
3.3.2.3. Determinació de la sulfametazina per escintil·lació líquida .....	102

<b>Capítol 4. Resultats i discussió</b> .....	105
4.1. Sorció de tetraciclines en sòls .....	107
4.1.1. Publicació 1. “Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction” .....	109
4.1.2. Discussió dels resultats .....	137
4.2. Sorció de sulfametazina en biochar i mescles sòl-biochar .....	143
4.2.1. Publicació 2. “Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon (biochar)” .....	145
4.2.2. Publicació 3. “Predicting contaminant adsorption in black carbon (biochar)-amended soil for the veterinary antimicrobial sulfamethazine” ..	163
4.2.3. Discussió dels resultats .....	213
4.3. Tractament de dades d'isotermes de sorció .....	224
4.3.1. Fonament matemàtic.....	226
4.3.2. Exemples d'aplicació .....	234
<b>Capítol 5. Conclusions</b> .....	249



**OBJECTIUS**

---

*Capítol 1*



L'objectiu general de la present tesi ha estat l'estudi de la sorció d'agents antimicrobians en el sistema sòl-aigua. Els fàrmacs estudiats han estat les tetraciclines i les sulfonamides, dues famílies àmpliament utilitzades en medicina veterinària, que presenten una entrada contínua al medi ambient. Des d'un punt de vista global, aquesta tesi pretén contribuir al coneixement del comportament d'aquests antimicrobians en el sòl. D'altra banda, també s'ha estudiat la capacitat del biochar per tal d'augmentar la retenció en el sòl d'un antimicrobià d'elevada mobilitat.

Aquests objectius es concreten en els següents punts:

- Caracteritzar i modelitzar la sorció de tetraciclines en un grup ampli de sòls per tal d'obtenir informació sobre els mecanismes que intervenen en la retenció d'aquests fàrmacs.
- Identificar les propietats fisicoquímiques de sòl i tetraciclina que tenen més influència sobre la sorció d'aquests fàrmacs i desenvolupar models de predicció de la sorció.
- Avaluar el potencial del biochar com a sorbent d'una sulfonamida d'elevada mobilitat ambiental en el sistema biochar-aigua i elucidar els mecanismes involucrats en la sorció.
- Estudiar la sorció d'una sulfonamida d'elevada mobilitat ambiental en sòls esmenats amb biochar.





## **INTRODUCCIÓ**

---

*Capítol 2*



## 2.1. Agents antimicrobians

Un agent antimicrobià és una substància capaç d'eliminar o inhibir el creixement i la reproducció de microorganismes com bacteris, fongs o protozous. Avui en dia, el seu ús s'estén des de la medicina humana i veterinària fins a l'horticultura.

Les malalties i infeccions han estat una de les principals causes de mortalitat des dels orígens de la humanitat. Per aquesta raó s'han estat buscant remeis eficaços, com l'ús d'antimicrobians, que permetessin guarir als individus malalts des de l'antiguitat. Existeixen indicis arqueològics de l'ús de tetraciclins a l'antiga Núbia, regió situada entre l'actual sud d'Egipte i nord del Sudan, fa uns 1500 anys [1]. D'altra banda, la medicina tradicional xinesa ha estat emprant durant milers d'anys herbes amb certa activitat antimicrobiana [2]. Però no va ser fins al segle XIX quan es va començar a entendre i establir una connexió entre la existència de microorganismes patògens i l'aparició de malalties [3]. Concretament, durant la segona meitat del segle XIX, L. Pasteur va observar que alguns microorganismes podien inhibir el creixement d'altres dins un mateix medi de cultiu. Vint anys després, M. Ward va batejar el fenomen mitjançant el terme "antibiosis" [4]. Però no va ser fins al segle XX quan es van començar a sintetitzar els primers antimicrobians. L'any 1909, S. Hata i P. Ehrlich van descobrir l'arsfenamina, el primer antimicrobià amb activitat contra la sífilis, el qual va ser comercialitzat posteriorment amb el nom de Salvarsan. Aquest fet, junt amb el descobriment de la penicil·lina (1928) i el prontosil (1932) per part de A. Fleming i G. Domagk respectivament, va marcar el principi de l'era dels antimicrobians.

Els agents antimicrobians poden presentar un origen "natural" (procedents de microorganismes com fongs o bacteris), semisintètic (compostos naturals químicament modificats) o sintètic. Tot i que el terme antibiòtic s'utilitza de forma genèrica, estrictament parlant, un antibiòtic és un agent antimicrobià d'origen natural. Així, podem considerar que la penicil·lina va ser el primer antibiòtic descobert, perquè Fleming la va obtenir d'un fong anomenat *Penicillium notatum*. Els antimicrobians d'origen natural més emprats actualment són:

- Aminoglicòsids
- $\beta$ -lactàmics
- Macròlids

- Polièns
- Polipèptids
- Tetraciclins

D'altra banda, els antimicrobians d'origen sintètic més emprats són:

- Quinolones
- Nitrofurans
- Nitroimidazoles
- Sulfonamides

Els agents antimicrobians poden actuar vers els microorganismes mitjançant diversos mecanismes, els més importants dels quals es troben recollits en la Taula 2.1.

**Taula 2.1.** Mecanismes d'acció d'agents antimicrobians.

Mecanismes d'acció	Grup	Exemples
Inhibició de la síntesi de la paret cel·lular	$\beta$ -lactàmics	Penicil·lina, cefalosporina, cefamicina, monobactàmic, inhibidor de $\beta$ -lactamasa, ampicil·lina
	Glicopèptids	Vancomicina, teicoplanina, daptomicina
	Altres	Bacitracina, fosfomicina, cicloserina
Inhibició de la integritat de la membrana citoplasmàtica	Polipèptids	Polimixina B, colistina, nisina
	Polièns antimicòtics	Nistatina, natamicina, amfotericina B
	Ionòfors	Calcimicina, monensina, salinomicina
Inhibició de la síntesi de proteïnes	Aminoglicòsids	Estreptomicina, kanamicina
	Tetraciclins	Oxitetraciclina, doxiciclina
	Macròlids	Eritromicina, claritromicina
	Lincosamides	Lincomicina, clindamicina
	Amfenicols	Cloramfenicol
	Altres	Àcid fusídic
Inhibició de la síntesi de d'àcids nucleics	Quinolones	Ciprofloxacina, norfloxacina
	Rifamicines	Rifampicina
	Nitroimidazoles	Metronidazole
Inhibició de la síntesi de metabòlits intermediaris	Sulfonamides	Sulfadiazina, sulfametazina
	Diaminopirimidines	Trimetoprim

## 2.2. Ús d'agents antimicrobians en medicina veterinària

Durant els últims temps, l'increment de la producció ramadera a escala mundial ha estimulat el desenvolupament de la ramaderia intensiva. Aquest tipus d'explotació es caracteritza per confinar una gran quantitat d'animals en espais reduïts i requereix el control de les infeccions per tal d'evitar contagis massius que comprometin la productivitat. En conseqüència, el consum d'antimicrobians en medicina veterinària ha experimentat un gran augment i ha motivat l'adopció de pautes diferents a les marcades en medicina humana [5]. Podem distingir diferents aplicacions:

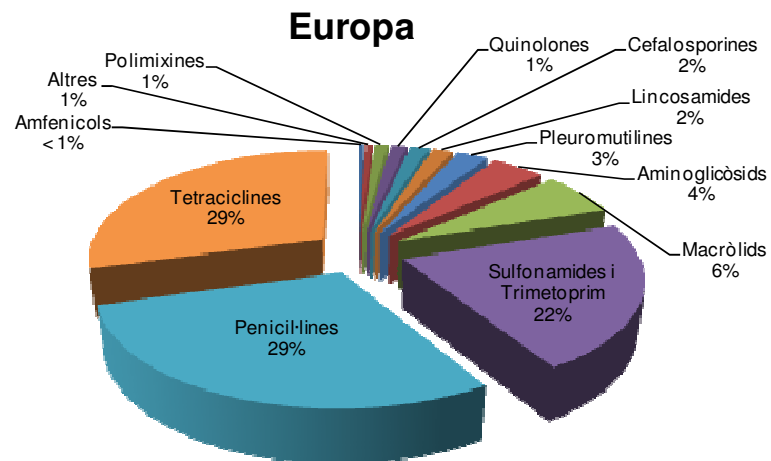
- *Prevenió, tractament i control de les malalties d'origen bacterià.* Aquests objectius poden ser assolits mitjançant l'aplicació terapèutica, metafilàctica i profilàctica d'agents antimicrobians. L'ús terapèutic fa referència al tractament de malalties diagnosticades. Les dosis terapèutiques administrades estan estrictament relacionades amb les espècies i l'estat de la malaltia, i solen ser altes durant períodes curts de temps. La metafilaxi es prefereix quan un petit grup dins de l'explotació ramadera presenta els primers símptomes de malaltia. Llavors, es duu a terme una medicació primerenca de tot el grup. Finalment, la profilaxi és sinònim d'una administració del fàrmac preventiva, per exemple abans d'intervencions quirúrgiques, transport de bestiar, barreja d'animals de diferents ramats o per prevenir d'algunes malalties com la mastitis en les vaques lleteres [6-7].
- *Promoció del creixement.* L'administració d'antimicrobians a dosis baixes durant llargs períodes de temps provoca un increment de l'índex de conversió d'un animal, és a dir, millora la seva eficiència alimentària fins al 10 % i l'animal engreixa més ràpidament [5, 8]. En general, aquesta pràctica es realitza mitjançant una administració de pinsos medicamentosos que contenen nivells subterapèutics d'antimicrobians [9]. L'origen de la mateixa es remunta a finals dels anys quaranta, quan es va descobrir que els pollastres alimentats amb pinsos que contenien residus de tetraciclina creixien més ràpidament [10-11]. D'ençà d'aquest descobriment, la utilització d'antimicrobians com a promotors de creixement es va estendre ràpidament com una pràctica habitual en la ramaderia intensiva. Avui en dia, hi ha molta controvèrsia sobre la incidència que aquesta pràctica pot tenir en l'augment de la resistència bacteriana. En la Unió Europea (UE), des de l'any 2006

està prohibit l'ús d'aquests agents per a promoure el creixement [12]. Tanmateix, en altres països encara és una pràctica habitual [13].

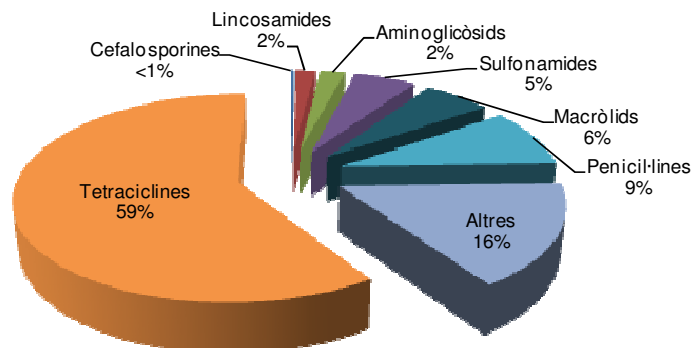
Les dades sobre vendes d'antimicrobians a nivell internacional són de difícil accés. Malgrat tot, s'estima que el consum mundial d'antimicrobians és d'1 a  $2 \times 10^5$  tones anuals i genera aproximadament 42000 milions de dòlars a l'any [14-15]. D'altra banda, tot i que existeix certa controvèrsia [16], la quantitat d'antibiòtics utilitzats per la indústria agroalimentària sembla estar entre un 35-70 % de la producció total, en funció del marc normatiu establert a cada país [17-19]. Per exemple, els Estats Units d'Amèrica (EUA) estan emplaçats a l'extrem superior d'aquest interval, mentre que la UE es troba actualment a l'extrem inferior. La Figura 2.1 resumeix les vendes d'antimicrobians als EUA i països europeus difoses per l'Agència Europea del Medicament o EMA (*European Medicines Agency*) i l'Administració nord-americana d'Aliments i Medicaments o FDA (*Food and Drug Administration*) en el període 2009-2010 [20-21]. S'observa que els antimicrobians més emprats són tetraciclins, sulfonamides, penicil·lines i macròlids.

En relació a les vendes dins el marc geogràfic europeu, tal com es pot observar en la Figura 2.2, Espanya és un dels consumidors més importants d'antimicrobians ja que es tracta d'un dels principals productors europeus de bestiar.

Concretament, la quantitat total d'antimicrobians venuda a Espanya, segons l'Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), va ser de 1102 tones durant el període 2009-2010 [22]. Els antimicrobians més utilitzats per ordre decreixent van ser: tetraciclins, sulfonamides i penicil·lines (Figura 2.3). En clau catalana, les tendències de consum a Catalunya són similars a les d'Espanya.

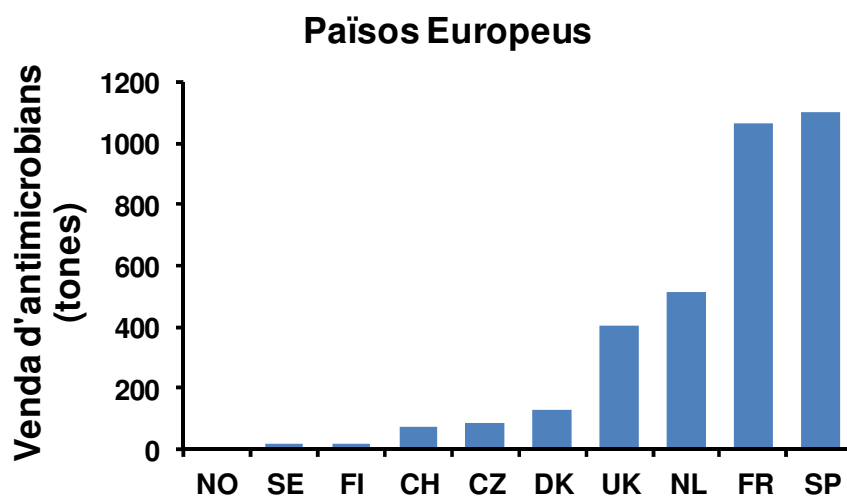


### Estats Units d'Amèrica (EUA)

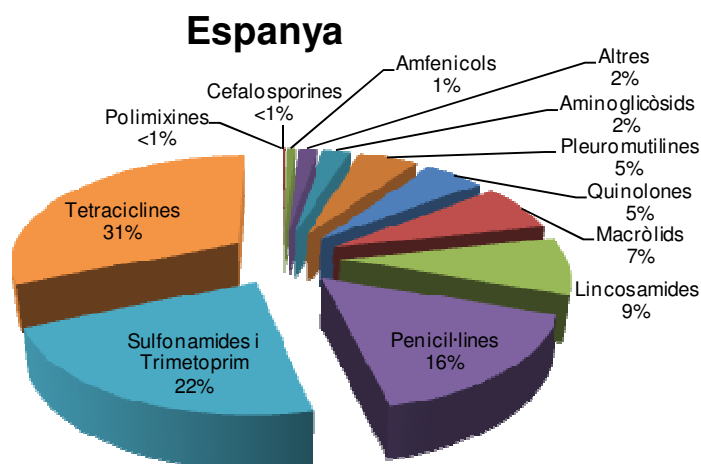


**Figura 2.1.** Vendes d'antimicrobians (percentatges sobre les tones totals) als EUA i en alguns països europeus durant el període 2009-2010. Fonts: EMA i FDA [20-21].





**Figura 2.2.** Venda d'antimicrobians en alguns països europeus durant el període 2009-2010. Acrònims: Noruega (NO), Suècia (SE), Finlàndia (FI), Suïssa (CH), República Txeca (CZ), Dinamarca (DK), Regne Unit (UK), Països Baixos (NL), França (FR) i Espanya (SP). Font: EMA [20].



**Figura 2.3.** Vendes d'antimicrobians (percentatges sobre les tones totals) a l'estat espanyol durant el període 2009-2010. Font: AEMPS [22].

L'ús d'antimicrobians en la ramaderia ha permès augmentar de forma molt important la producció d'aliments d'origen animal, però també presenta inconvenients. D'una banda, la possible presència de residus d'aquests fàrmacs en els aliments. D'altra banda, la seva entrada al medi ambient, la qual es tracta a continuació.

## 2.3. Presència d'antimicrobians en el medi ambient

En les dues últimes dècades, els científics han mostrat una preocupació creixent sobre la presència de productes farmacèutics, particularment substàncies amb acció antimicrobiana, en el medi ambient [23-25].

Els primers en informar del problema van ser Watts *et al.* [26] als anys vuitanta, quan van detectar tetraciclina i eritromicina en rius del Regne Unit. Des d'aquest fet, molts estudis posteriors han confirmat la presència de traces d'antimicrobians (p. ex. penicil·lines, tetraciclines, sulfonamides, macròlids i quinolones) a nivells de concentració que van des de parts per trilió (ppt) fins a parts per milió (ppm) en sòls, sediments, aigües subterrànies i superficials [27-32]. Aquests valors depenen de la via d'entrada, de les propietats fisicoquímiques del fàrmac i del medi, i de les condicions ambientals.

### 2.3.1. Vies d'entrada als diferents compartiments ambientals

Hi ha diverses vies d'entrada d'agents antimicrobians al medi ambient (Figura 2.4). Els principals focus que contribueixen a la disseminació dels antimicrobians són els següents:

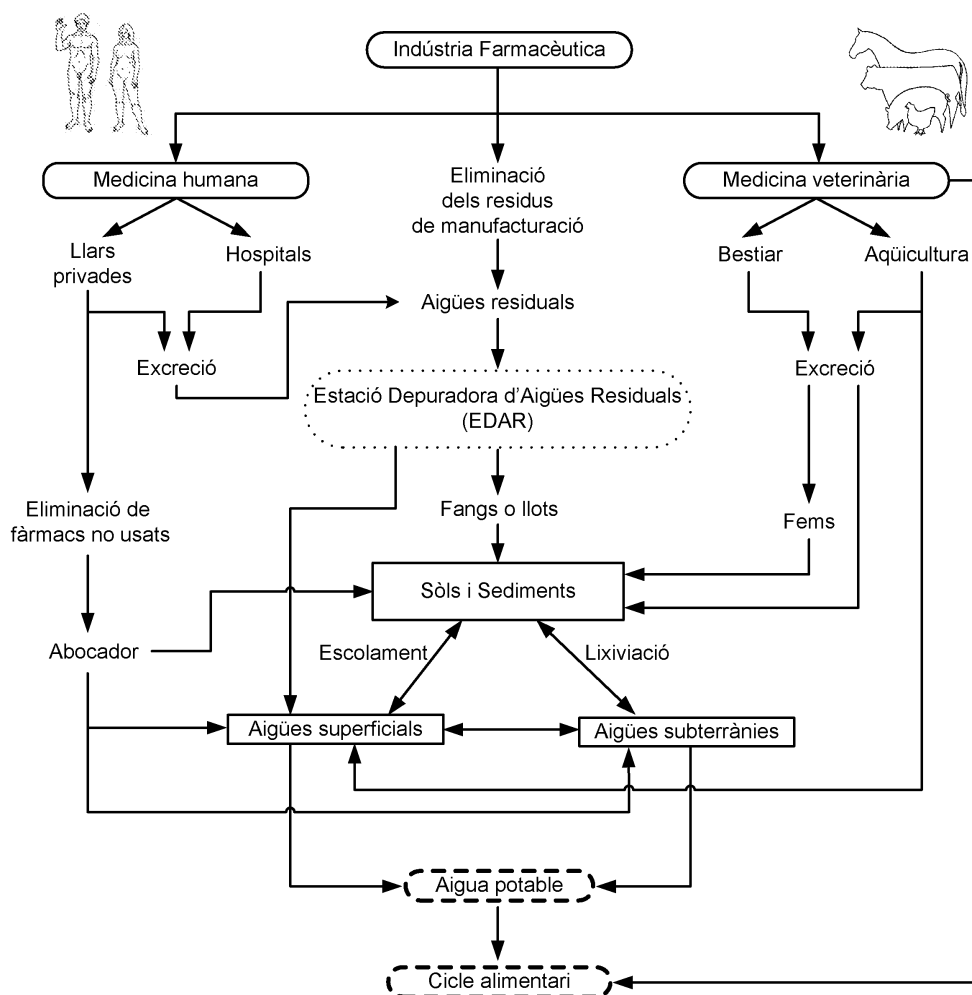
- *La medicina veterinària.* Aquesta es considera la via més important [33], ja que els antimicrobians no són metabolitzats completament pels animals. Tot i que el grau de metabolisme depèn de l'espècie animal, dosi i mode d'administració del fàrmac, s'estima que aproximadament entre el 30-90 % del compost actiu original s'excreta per l'orina o la femta [34-35]. En conseqüència, quan els fems d'animals medicats s'utilitzen per fertilitzar un sòl agrícola, entren en el sòl agents antimicrobians i els seus metabòlits. A més a més, els metabòlits d'aquests antimicrobians poden mantenir certa activitat biològica, així com retornar a l'estructura del compost original [36].

La piscicultura és una altra activitat que contribueix a la disseminació d'agents antimicrobians. Els estudis indiquen que aproximadament el 70-80 % dels fàrmacs administrats en aquesta pràctica acaben en els sediments [37].

- *La medicina humana.* Els antimicrobians i els seus metabòlits, procedents d'hospitals i llars, són transportats a través de la xarxa de clavegueram municipal fins a l'estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) corresponent, on no són

completament eliminats [38-40]. Per exemple, dins el territori espanyol, Alexy *et al.* [41] han demostrat l'existència de depuradores que presenten una eficiència d'eliminació per al sulfametoxazole que no supera el 60 %. Aquest fet és confirmat per la presència d'antimicrobians en els efluent i els fangs procedents de les depuradores [42-45]. En última instància, aquests compostos fins i tot poden arribar a les aigües destinades al consum humà [46-47].

- *Els residus de la indústria farmacèutica.* Aquesta tercera ruta té en compte la contribució dels residus procedents de la fabricació d'antimicrobians per part de la indústria farmacèutica. No obstant, les pràctiques de gestió de residus implementades fan que es tracti d'un focus poc rellevant [48].



**Figura 2.4.** Vies i possible distribució dels antimicrobians en el medi ambient.

La suma de tots aquests factors diferents facilita l'entrada contínua al medi ambient d'agents antimicrobians, metabòlits i productes de degradació. Tot i que sol tractar-se de concentracions relativament baixes, els antimicrobians poden provocar efectes negatius a llarg termini. D'una banda, la seva presència i persistència provoca una alteració del funcionament de les comunitats de microorganismes residents en el medi contaminat [49]. D'altra banda, l'exposició continuada a nivells baixos d'antimicrobians en el medi exerceix una pressió selectiva que afavoreix l'aparició i proliferació de bacteris resistents [50]. Aquest últim fenomen s'origina mitjançant la mutació i l'adquisició genètica de resistència a través de la transferència de gens horitzontal [51-53]. Hi ha estudis que indiquen l'existència d'una relació directa entre les pràctiques agrícoles que empren fems contaminats i la consegüent aparició de gens de resistència [54-55]. Així, a més de la resistència antimicrobiana procedent d'hàbitats clínics, també s'hi suma la d'origen mediambiental [56-57]. De fet, la dispersió de substàncies antimicrobianes en el medi ambient s'accepta com una de les principals causes de l'aparició de soques de bacteris resistents [58]. A més a més, els compartiments ambientals no són estancs i existeixen evidències de transferència de resistència a patògens humans [59]. Aquest fet ocasiona infeccions que cada cop són més difícils de tractar, fins al punt que poden donar lloc a seriosos efectes com són l'augment de la mortalitat, l'encariment dels tractaments, etc. [60-62]. Així, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) ha considerat que es tracta d'un risc molt important per a la salut pública i ha proposat implantar una estratègia global per tal de minimitzar-lo [63].

Des de fa uns anys, s'administren antimicrobians diferents en medicina veterinària i humana. Però aquesta mesura ha resultat ésser poc efectiva, ja que els bacteris poden desenvolupar resistències creuades, és a dir, poden esdevenir resistents a grups d'antimicrobians amb una estructura química similar [64].

A més d'accions com la ja adoptada a la UE, sobre la prohibició d'ús d'antimicrobians com a promotors del creixement, sembla absolutament necessari posar en marxa estratègies globals i establir un ús prudent tant en l'agricultura com en el consum humà d'antimicrobians.

### 2.3.2. Contaminació de sòls agrícoles i sediments

Durant els últims anys, molts estudis s'han centrat en la contaminació de sòls i sediments amb antimicrobians, ja que aquesta es considera una de les seves principals vies d'entrada al medi ambient. Aquesta incorporació pot succeir de manera directa o indirecta. La via directa, comprèn des de l'administració d'antimicrobians durant les pràctiques d'aqüicultura, fins al lliure pasturatge d'animals medicats en espais més o menys limitats. En aquests casos es produeix una contaminació important de sòls i aigües a nivell local. Per contra, la via indirecta és la que ocorre quan s'empren fems (sòlids o líquids) o fangs procedents d'una EDAR per tal de fertilitzar conreus agrícoles. En aquests residus també s'han detectat concentracions relativament elevades d'antimicrobians. Per exemple, la concentració de sulfonamides i tetraciclins en fems pot arribar a ser de l'ordre de centenars de  $\text{mg kg}^{-1}$  [65-66] i en fangs d'EDAR s'han reportat nivells de fluoroquinolones per sobre d' $1 \text{ mg kg}^{-1}$  [67].

Generalment, els fems es solen emmagatzemar durant períodes variables de temps, i al llarg d'aquests els antimicrobians es poden degradar i sofrir transformacions en major o menor mesura. Per tant, és recomanable deixar envellir els fems uns mesos abans d'aplicar-los per tal de minimitzar la posterior contaminació de sòls [68].

En funció de les propietats fisicoquímiques del parell sòl/antimicrobià, aquests últims seran més o menys persistents un cop incorporats al sòl. A partir d'aquí, els antimicrobians es poden escolar cap a les aigües superficials, lixiviar cap a les aigües subterrànies, quedar retinguts pels diferents components del sòl o ser sotmesos a processos de degradació tant biològics com fisicoquímics. Per la seva part, els processos de degradació biològica estan relacionats amb el catabolisme microbià. D'altra banda, també poden ser importants els processos de degradació abiòtica com la hidròlisi, la termòlisi, les reaccions redox i/o la fotodegradació [69]. En darrer terme, els antimicrobians també poden ser absorbits per plantes destinades al consum humà o arribar a organismes que habiten en el sòl [70].

## 2.4. Interacció dels agents antimicrobians amb el sòl

### 2.4.1. Sorció

La sorció és el procés fisicoquímic que engloba les possibles interaccions que determinen la retenció d'un contaminant en el sòl. L'estudi i la caracterització de la sorció és un tema complex, ja que poden tenir lloc de manera simultània diverses interaccions.

La sorció governa el destí, la mobilitat i els efectes que poden tenir els antimicrobians en el medi ambient. Així, els antimicrobians més fortament retinguts en el sòl són els que presenten menys disponibilitat per als organismes natius, menor tendència a ser transportats a les aigües subterrànies o superficials, menor fotodegradació i menor participació en processos d'hidròlisi, redox, etc. [71]. Els estudis de sorció són importants per realitzar avaluacions de risc ambiental o per planificar procediments de remeiació si existeix una contaminació [72].

El procés de sorció correspon al bescanvi de molècules o ions (sorbats), entre una fase fluïda (líquida o gas) i una fase sòlida (sorbent) en equilibri amb aquesta. En el marc d'aquesta tesi, la fase líquida correspon a la solució aquosa, mentre que la fase sòlida és el sòl. Des d'un punt de vista quantitatiu, la sorció d'un compost es descriu generalment mitjançant el coeficient de distribució ( $K_d$ ), expressat en unitats de volum per massa de sorbent ( $L\ kg^{-1}$ ).

$$K_d = \frac{C_S}{C_W} \quad (2.1)$$

Aquest coeficient estableix una relació, en condicions, d'equilibri entre  $C_S$  ( $mg\ kg^{-1}$ ) i  $C_W$  ( $mg\ L^{-1}$ ), que són la concentració de sorbat en la fase sòlida i la concentració de sorbat en la fase líquida, respectivament. Així, els compostos que presenten valors de  $K_d$  elevats, mostren una forta afinitat vers el sorbent i tindran menys tendència a ser transportats cap altres compartiments, com les aigües subterrànies i superficials. Cal recordar que  $K_d$  no és una constant termodinàmica, i per tant depèn d'altres variables, com el pH i la força iònica de la solució, les propietats fisicoquímiques del sòl, etc. Generalment, els estudis de desplaçament en columna i per lots, també coneguts amb els corresponents noms anglosaxons de "*column displacement*" i "*batch*", són els mètodes més emprats per a la determinació de  $K_d$  [73-74].

Un agent antimicrobià pot interaccionar amb els setis de la superfície del sorbent mitjançant un procés de quimiosorció, fisiosorció i/o bescanvi iònic. La quimiosorció implica la formació d'un enllaç covalent, amb entalpies superiors a  $84 \text{ kJ mol}^{-1}$ . En canvi, la fisiosorció es considera una interacció intermolecular energèticament més feble i no comporta la formació d'un enllaç covalent. En els estudis ambientals centrats en la sorció de contaminants orgànics, la fisiosorció es considera el tipus d'interacció més habitual.

Des del punt de vista del sorbent, cal tenir en compte que els sòls naturals, solen presentar una certa càrrega negativa dins l'interval de pH ambiental (4 – 8). Els principals responsables són els grups funcionals de la matèria orgànica –principalment carboxils i fenols– i els grups hidroxils situats a la perifèria de la fracció mineral. En conseqüència, els cations de la solució són atrets electrostàticament cap aquests grups desprotonats per tal de mantenir la neutralitat elèctrica. Per la seva banda, la matèria orgànica hidratada es pot comportar com una fase gel no massa compacta, capaç de permetre la dissolució o “partició” de sorbats [75-76].

Si s'estudia la sorció des del punt de vista del sorbat, l'estructura molecular d'aquest és clau ja que determina el volum que ocupa, la solubilitat en aigua ( $S_w$ ), la hidrofobicitat, etc. Els antimicrobians són molècules orgàniques relativament grans que presenten diversos grups funcionals en la seva estructura que influeixen decisivament en la sorció. Alguns d'aquests grups són ionitzables en l'interval de valors de pH dels sòls naturals i per tant, en funció del pH de la solució es poden trobar en forma catiònica, aniònica, neutra o zwitteriònica, oferint la possibilitat d'establir diferents interaccions. Les espècies carregades del fàrmac es poden bescanviar pels ions nadius del sòl. Sovint es tracta d'un bescanvi catiònic, on el grup funcional carregat positivament sol tractar-se d'un grup amino, imina o un N heterocíclic protonat. Tot i que és menys freqüent, també existeixen processos de bescanvi aniònic, on un grup funcional del sorbat carregat negativament, com un carboxil, pot bescanviar un anió, per exemple un clorur, en la superfície.

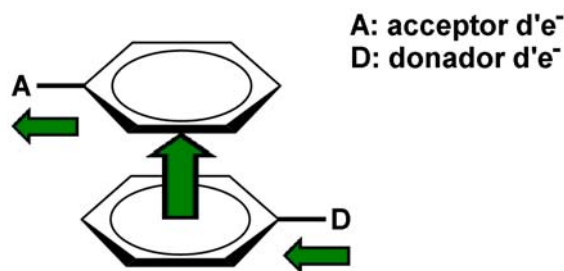
D'altra banda, les espècies no ionitzades (un zwitterió o una molècula sense càrrega) també poden interaccionar amb la matèria orgànica i els minerals del sòl. En el cas dels zwitterions, la separació espacial entre càrregues pot ser suficient perquè cada càrrega pugui interaccionar amb els grups funcionals de la superfície adjacents. En canvi, els fàrmacs no ionitzables, presenten interaccions hidrofòbiques amb regions del sorbent d'aquesta mateixa naturalesa.

Els compostos sense càrrega, també poden interaccionar mitjançant la formació de ponts d'hidrogen, en els que participen generalment grups funcionals com amino, fenol, hidroxil o carboxil. Aquest tipus d'interacció, tot i que no es considera un enllaç covalent, pot presentar unes entalpies de formació amb valors compresos entre  $\sim 6$  -  $\sim 70$  kJ mol<sup>-1</sup>.

Les molècules sense càrrega també poden interaccionar mitjançant les forces de van der Waals (vdW), que tenen lloc entre dipols permanents o induïts per les molècules de les proximitats. N'hi ha de tres tipus: dipolars, d'inducció i de dispersió. Pel que fa als fàrmacs, al tractar-se de molècules relativament grans, les més importants són les de dispersió [77]. Aquestes, anomenades London-vdW, són el resultat de la formació de dipols de vida curta. Aquest dipol momentani induïx dipols de càrrega oposada en altres molècules, i aquests s'atreuen entre si per un temps curt [78]. Tot i que són interaccions més febles que els ponts d'hidrogen, les forces de vdW són additives i poden esdevenir significatives en cas de macromolècules.

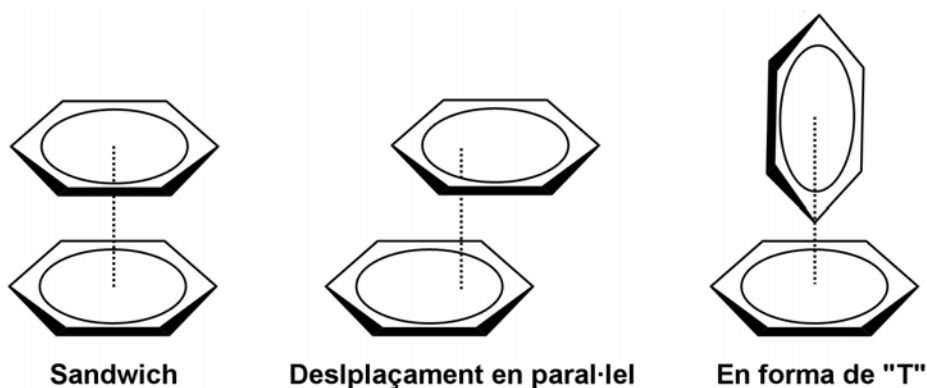
Per acabar, els fàrmacs també poden presentar interaccions de transferència de càrrega, mitjançant la formació d'un complex donador-acceptor d'electrons ( $e^-$ ), que comporta la superposició dels seus orbitals moleculars respectius i un canvi parcial de les densitats electròniques. Aquest tipus d'interaccions són molt freqüents entre sistemes conjugats  $\pi$ . En aquest cas, s'anomenen interaccions  $\pi$ - $\pi$  donador-acceptor d' $e^-$  ( $\pi$ - $\pi$  EDA). Es tracta d'una interacció energèticament semblant a un pont d'hidrogen fort, però aquesta magnitud pot variar considerablement en funció dels substituents dels anells aromàtics. Aquests substituents es divideixen en dues classes: els "rics" en densitat electrònica (ex: -fenil,  $-\text{CH}=\text{CR}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}$ ,  $-\text{O}^-$ , etc.) i els "pobres" en densitat electrònica (ex:  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NR}_3^+$ ,  $\text{C}(=\text{O})\text{R}$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}$ , etc.), els quals donen lloc a anells donadors  $\pi$  o acceptors  $\pi$ , respectivament. En aquests sistemes s'estableix un flux de densitat electrònica que s'origina en l'àtom donador, creua els anells i acaba a l'àtom acceptor (Figura 2.5).





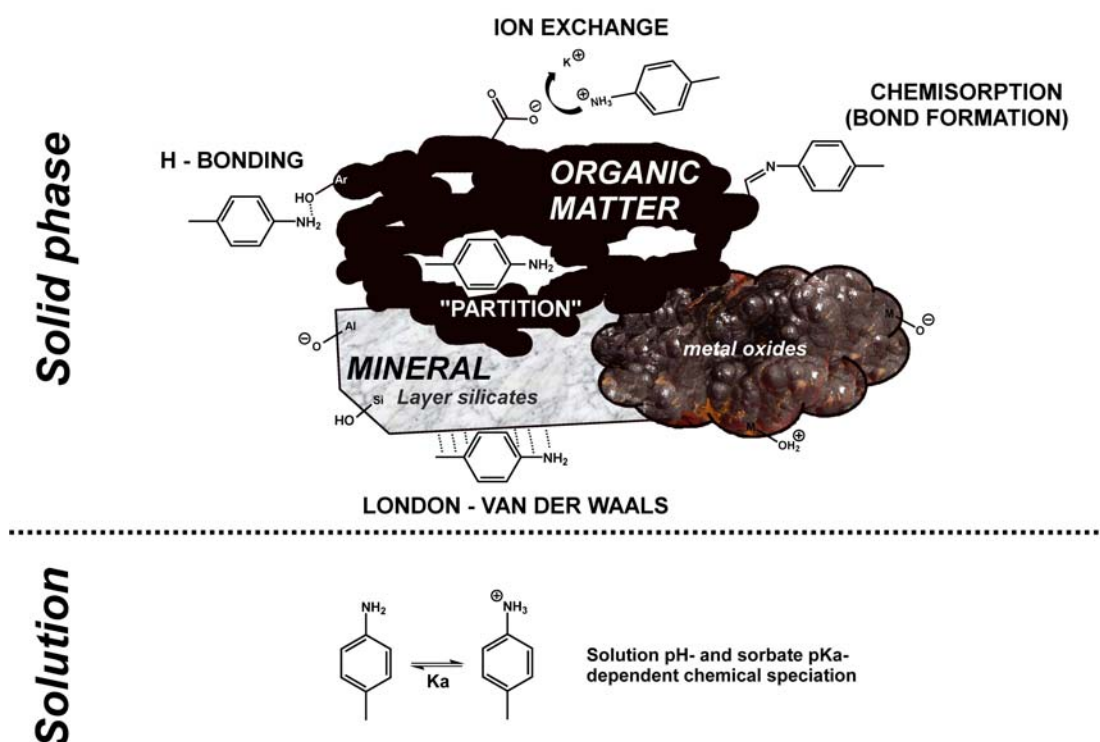
**Figura 2.5.** Flux de densitat electrònica entre dues molècules aromàtiques amb substituents de diferent caràcter.

Les interaccions  $\pi$ - $\pi$  EDA són freqüents en sistemes i processos molt diversos, com ara l'apilament de nucleòtids adjacents d'àcid ribonucleic, plegament i formació d'agregats de proteïnes, reconeixement molecular, funcionalitat dels nanomaterials, etc. També influeixen en les estructures cristal·lines formades per anells aromàtics. En aquestes, les conformacions termodinàmicament més estables quan s'estableix una interacció  $\pi$ - $\pi$  EDA són de tipus *sandwich*, desplaçament en paral·lel i en forma de "T" (Figura 2.6) [79].



**Figura 2.6.** Possibles conformacions quan s'estableix una interacció  $\pi$ - $\pi$  EDA entre dos benzens.

La Figura 2.7 recull totes les interaccions que s'han descrit en el present apartat. El conjunt d'aquestes condicionaran en gran mesura el valor de  $K_d$ .

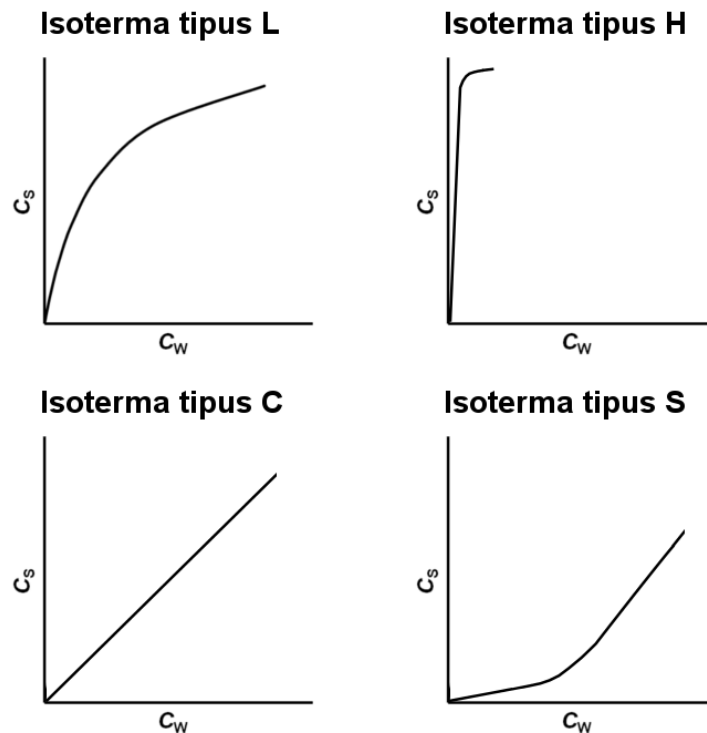


**Figura 2.7.** Diferents interaccions que poden tenir lloc entre una molècula orgànica ionitzable i els diferents components que integren el sòl.

#### 2.4.2. Isotermes i models de sorció

En la major part dels casos, el valor de  $K_d$  varia amb la concentració de sorbat. La construcció d'una isoterma de sorció es considera la manera més comuna de caracteritzar la retenció d'un determinat contaminant en el sòl. Es tracta d'una aproximació experimental que permet avaluar la variació de la sorció en funció de la concentració de sorbat en determinades condicions experimentals (temperatura, pressió, pH, força iònica, etc.). Una isoterma de sorció és la representació gràfica de  $C_s$  en funció de  $C_w$ , on cada punt representa un valor de  $K_d$ . Des d'un punt de vista matemàtic,  $K_d$  correspon al valor del pendent de la isoterma en cada punt.

Giles *et al.* [80-81] van classificar les isotermes en quatre categories diferents en funció de la forma que poden presentar: classe H, L, C i S (Figura 2.8).



**Figura 2.8.** Els quatre tipus d'isotermes segons la classificació de Giles *et al.* [80].

La isoterma de tipus L és la més freqüent en estudis de sorció en sòls. Aquest tipus indica una gran afinitat entre sorbat i el sorbent a baixes  $C_w$ , la qual va disminuint a mesura que augmenta el cobriment de la superfície del sorbent. Un cas extrem d'aquesta isoterma és la de tipus H, anomenada d'alta afinitat, que presenta un pendent inicial molt elevat.

La isoterma de tipus C es caracteritza per un pendent constant en un interval de  $C_w$ . Hi ha dues interpretacions d'aquest fet: l'existència d'un excés de setis a la superfície en una situació lluny de la saturació, o bé que la sorció de sorbat comporta la creació de nous setis capaços de sorbir la mateixa quantitat de sorbat. Sovint, aquest tipus d'isotermes s'anomenen isotermes de partició constant perquè recorden el comportament lineal que presenta la partició d'un compost orgànic hidrofòbic entre dos líquids immiscibles.

Finalment, la isoterma de tipus S es distingeix per presentar un punt d'inflexió que comporta un augment sobtat del pendent. Aquest comportament és generalment atribuït a una cooperació entre les molècules sorbides.

Les isotermes de sorció són eines que ens permeten conèixer d'una manera empírica i macroscòpica la distribució de masses entre dues fases. En general, proporcionen

informació sobre el mecanisme de sorció, però no permeten l'assignació d'un determinat mecanisme de manera conclusiva. La caracterització d'un mecanisme de sorció requereix un estudi més exhaustiu, com per exemple, la mesura de  $C_S$  mentre es varia alguna propietat de la solució (com el pH [82]), o mitjançant la realització d'estudis de competició amb altres sorbats. Aquests últims, sovint serveixen per esbrinar quina part de la molècula es troba involucrada en la sorció.

L'objectiu quan s'estudia una isoterma de sorció és l'obtenció d'una equació matemàtica que permeti descriure de la forma més acurada possible el comportament del sistema. Els models més emprats per descriure les dades obtingudes, són les equacions de Langmuir i Freundlich. No obstant, de vegades s'utilitzen combinacions de les mateixes o equacions més complexes, quan les anteriors no s'ajusten prou adequadament als valors experimentals. Per acabar, cal indicar que quants més paràmetres presenti un model, més difícil esdevindrà adjudicar un significat físic a cada paràmetre obtingut. A continuació, es descriuen més detalladament les equacions de Langmuir i Freundlich.

### Equació de Langmuir

El model de Langmuir és teòric i parteix de les següents suposicions:

- Hi ha un nombre limitat de setis de sorció amb la mateixa energia.
- La sorció és de tipus monocapa.
- No existeix interacció entre les espècies sorbides en la superfície.
- Es pot assolir el màxim recobriment del sorbent.

En els seus orígens, l'equació de Langmuir ha estat molt emprada per descriure la adsorció de molècules de gas sobre una superfície sòlida. Tot i que la sorció en els sistemes sòl-aigua dista molt de complir tots els requisits, l'equació de Langmuir és molt emprada sobretot quan existeix un mecanisme de sorció predominant i la isoterma presenta un perfil de tipus L. La relació entre  $C_S$  i  $C_W$  segons el model de Langmuir s'obté segons l'equació següent:

$$C_S = \frac{b \cdot K_L \cdot C_W}{(1 + K_L \cdot C_W)} \quad (2.2)$$

on  $b$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) i  $K_L$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) són la capacitat de sorció màxima del sòl i la constant de sorció de Langmuir, respectivament. Aquesta última està relacionada amb la intensitat de sorció.

### Equació de Freundlich

El model de Freundlich considera l'existència de diferents tipus de setis, amb les seves corresponents energies de sorció [83]. L'equació de Freundlich s'obté com a resultat de combinar les equacions de Langmuir per a cada tipus de seti, i ve definida per:

$$C_S = K_F \cdot (C_w)^N \quad (2.3)$$

on  $K_F$  ( $\text{mg}^{1-N} \text{L}^N \text{kg}^{-1}$ ) i  $N$  (adimensional) són el coeficient de Freundlich i el paràmetre de linealitat, respectivament.  $K_F$  està relacionat amb la magnitud de la sorció i  $N$  dona una idea de la linealitat de la isoterma.  $N$  també proporciona una mesura sobre la heterogeneïtat dels setis de sorció en la superfície del sorbent. En el cas particular d'una isoterma de tipus C, és a dir lineal ( $N = 1$ ),  $K_F$  equival a  $K_d$ . L'equació de Freundlich presenta una elevada versatilitat perquè permet ajustar isoterms de tipus H, L i C.

## 2.5. Avaluació de risc ambiental

Els agents antimicrobians són dissenyats amb el propòsit de presentar una elevada activitat biològica. Tot i que sovint en el medi ambient es troben a baixes concentracions, els seus efectes perjudicials a mitjà i llarg termini poden esdevenir importants, i per aquesta raó la seva presència és motiu de preocupació.

Els principals organismes afectats per la dispersió d'antimicrobians en el medi són els bacteris, els fongs i les microalgues [84-86]. De fet, un cop introduïts en els sòls, els antimicrobians poden provocar canvis en la diversitat, les funcions bàsiques i les resistències de les comunitats bacterianes que hi habiten [87]. A més a més, també poden inhibir la descomposició de la matèria orgànica del sòl [88].

Els pocs estudis fets sobre els efectes tòxics que produeixen els antimicrobians en els organismes que pertanyen a nivells superiors de la xarxa tròfica (com ara algues, plantes, peixos, crustacis i cucs de terra) indiquen que els efectes són poc rellevants als nivells de

concentració ambientals [89-90]. El que actualment centra l'interès de la comunitat científica són els possibles efectes indirectes que els diferents antimicrobians poden introduir a llarg termini.

Per tal de reduir el risc ambiental que suposa la disseminació d'antimicrobians, alguns països han optat per establir una regulació. Concretament dins el marc europeu, les directives europees 2001/83/EC [91] i 2001/82/EC [92], dictaminen que tots els antimicrobians, tant d'ús humà com veterinari, s'han de sotmetre a estudis d'avaluació de risc ambiental abans de la seva introducció al mercat.

Fins al dia d'avui, en la UE no es consideren els residus d'antimicrobians en sòls o aigües com a contaminants prioritaris (Directives 2000/60/EC i 2008/105/EC)[93-94], per tant, no han estat sotmesos a mesures concretes de control de contaminació ni normes específiques de qualitat ambiental. Es tracta de compostos inclosos dins la categoria de contaminants emergents, és a dir, substàncies de les que encara es desconeix l'efecte en el medi ambient. Malgrat aquesta manca de regulació actual, no es descarta que puguin ser inclosos en la categoria de contaminants prioritaris.

La necessitat d'harmonitzar les diferents normatives existents a nivell internacional, ha comportat que el comitè de la *Veterinary International Cooperation on Harmonization* (VICH) hagi desenvolupat unes guies força específiques amb la intenció d'avaluar el risc ambiental produït pels fàrmacs emprats en veterinària. El VICH és un programa trilateral entre Japó, EUA i UE, tot i que altres països com Austràlia, Canada o Nova Zelanda hi actuen com observadors.

El VICH proposa una guia per a l'avaluació del potencial risc ambiental que pot tenir un fàrmac. Aquesta guia, també és acceptada pel *Committee for Medicinal Products for Veterinary Use* (CVMP) integrat dins la *European Medicines Agency* (EMA) [95-97]. Es consideren dues fases, la primera (Fase I) comprèn l'estimació de l'exposició en el medi, mitjançant la concentració ambiental estimada o PEC (*Predicted Environmental Concentration*). Aquesta es calcula en funció del compartiment sotmès a estudi. Per exemple, el valor de PEC corresponent a aigües superficials ( $PEC_{\text{surfacewater}}$ , en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) depèn de dosi administrada, tipus de tractament, metabolisme animal, factor de dilució, factor de penetració al mercat, quantitat d'aigua residual per habitant, etc. En canvi, per establir la PEC per a sòls ( $PEC_{\text{soil}}$ , en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), és necessari conèixer dosis d'aplicació, profunditat de mescla, densitat del sòl, etc. Segons l'EMA, si els valors de PEC són

inferiors a  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  pel cas d'aigües superficials o a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  pels sòls, es pot assumir que el compost molt probablement no representarà cap risc pel medi ambient. Per contra, si els valors de PEC són superiors als valors límits o d'acció, cal una avaluació ecotoxicològica i s'ha de passar a una segona fase que inclogui una anàlisi del possible destí i efecte ambiental del compost estudiat.

Un estudi realitzat per Hernando *et al.* [98] recull el risc ambiental potencial que presenta una selecció de fàrmacs en aigües superficials, aigües residuals i sediments. L'estudi constata que la majoria dels fàrmacs estudiats presenten risc ambiental ja que superen la Fase I. L'estudi conclou que les famílies que representen un risc més elevat en aigües residuals són els antimicrobians, analgèsics/antiinflamatoris, reguladors lipídics, blocadors  $\beta$  i antiepilèptics. En aigües superficials són els analgèsics/antiinflamatoris i antiepilèptics, i en sediments són els antimicrobians (concretament la flumequina i l'oxitetraciclina).

La segona fase (Fase II), comprèn una avaluació de risc ambiental basada no només en l'exposició, sinó que també inclou l'anàlisi del destí i els efectes que pot presentar un agent antimicrobià en un determinat compartiment ambiental. És a dir, es calcula una PEC que inclou més informació que en l'anterior fase. Aquesta fase es divideix en 2 nivells: nivell A i nivell B. El nivell A (anomenat també *screening*) proporciona una predicció inicial del risc del fàrmac mitjançant la determinació de propietats fisicoquímiques, farmacològiques i toxicològiques. Pel que fa al destí ambiental, la sorció es considera una de les principals propietats fisicoquímiques a determinar dins la Fase II. Amb aquest objectiu, en el nivell A es recomana la realització d'estudis de sorció seguint la directiva 106 OECD [74], que permet avaluar la migració des del sòl fins a les aigües superficials i subterrànies. Per exemple, si un sòl ha estat contaminat amb un fàrmac i aquest presenta un valor de  $K_{OC}$  ( $K_{OC} = 100 \cdot K_d / OC \%$ ), inferior a  $500 \text{ L kg}^{-1}$ , s'ha de prosseguir amb una avaluació de risc que inclogui els organismes aquàtics (dàfnia, algues o peixos) [99].

La segona fase també inclou el càlcul de la concentració estimada de no-efecte o PNEC (*Predicted No Effect Concentration*), que s'obté a partir de les dades de toxicitat que resulten en determinar  $EC_{50}$  (*median Effective Concentration*) i  $LC_{50}$  (*median Lethal Concentration*).  $EC_{50}$  i  $LC_{50}$  corresponen a les concentracions d'un compost a les que s'observa el 50 % del seu efecte i la concentració necessària per provocar la mort a la meitat dels membres d'una població, respectivament. Aquestes es determinen en espècies model com algues, peixos i invertebrats en el cas d'aigües, i cucs de terra i col·lèmbols en el cas dels sòls. Un cop obtinguts la PEC i la PNEC, es calcula el quocient

de risc (RQ) on  $RQ = PEC / PNEC$ . Si RQ és igual o superior a la unitat, es passa al nivell B on es duen a terme estudis de toxicitat crònica i es determinen novament la PEC i PNEC "refinades" (més específiques per cada substància i compartiment estudiat). En aquests estudis es consideren també les dades sobre emissions, el destí i els efectes ambientals. Si en aquest últim nivell el valor RQ continua sent superior a 1, es confirma que el compost presenta risc ambiental. Com apunt interessant, Grung *et al.* [100] emprant les directrius proposades per l'EMA, han conclòs que la ciprofloxacina, el sulfametoxazole i la tetraciclina s'haurien de considerar com a prioritariis ja que presenten valors de RQ superiors a la unitat.

Els estudis corresponents a la Fase II són força laboriosos. Sovint hi ha poca disponibilitat de dades experimentals i a més de vegades aquestes són poc fiables. Els models matemàtics basats en les relacions quantitatives estructura-activitat o QSAR (*quantitative structure-activity relationship*), són una alternativa per tal d'estimar paràmetres necessaris en l'avaluació de risc, com  $K_{OW}$ ,  $S_W$ ,  $K_d$ , biodegradació, bioacumulació, etc., tot i que aquests presenten limitacions [101].

## 2.6. Agents antimicrobians estudiats

### 2.6.1. Tetraciclines

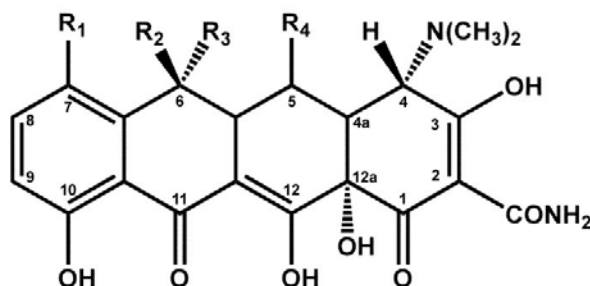
Les tetraciclines són una família d'agents antimicrobians molt emprada, tant en medicina humana com en medicina veterinària, a causa de la seva eficàcia contra un gran nombre d'infeccions bacterianes.

La clortetraciclina va ser descoberta als anys 40 per B. Duggar i va ser comercialitzada amb el nom d'aureomicina. Aquesta es va obtenir a partir d'un bacteri procedent del sòl anomenat *Streptomyces aureofaciens*. Poc després, A.C. Finlay va aïllar l'oxitetraciclina, coneguda amb el nom comercial de terramicina, produïda pel bacteri *Streptomyces rimosus*. D'altra banda, el premi Nobel R. B. Woodward determinà l'estructura de la oxitetraciclina, fet que va permetre l'any 1953 que els químics de l'empresa *Pfizer*, amb LL. H. Conover al capdavant del projecte, poguessin sintetitzar la tetraciclina. Posteriorment, van aparèixer la doxiciclina i la minociclina, durant les dècada dels seixanta i setanta, respectivament. De la mateixa manera que ha passat amb altres



antimicrobians, l'ús de tetraciclines pel tractament d'infeccions bacterianes s'ha vist limitat durant els últims anys a causa de l'aparició de soques de bacteris resistents. Aquest fet ha provocat que en els darrers anys, s'hagi desenvolupat una tercera generació de tetraciclines, les glicilciclines, per tal de minimitzar aquest problema [102].

Les tetraciclines deriven d'una estructura tetracíclica, amb una sèrie de grups funcionals enllaçats a diferents posicions. La Figura 2.9 mostra l'estructura bàsica de les tetraciclines. Totes tenen en comú un grup metilamino i un carboxamido. Així, les diferències entre tetraciclines rauen en la substitució de les posicions 6, 7 i 8. Les glicilciclines, presenten, a més substitucions en la posició 9. Tant el tipus de grups funcionals, com l'estereoquímica dels mateixos, són fonamentals a l'hora de definir l'activitat biològica de les tetraciclines.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
<b>Oxitetraciclina</b>	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH
<b>Tetraciclina</b>	H	CH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Clortetraciclina</b>	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Doxiciclina</b>	H	H	CH <sub>3</sub>	OH
<b>Demeclociclina</b>	Cl	H	OH	H
<b>Minociclina</b>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	H

**Figura 2.9.** Estructura general de les tetraciclines més emprades.

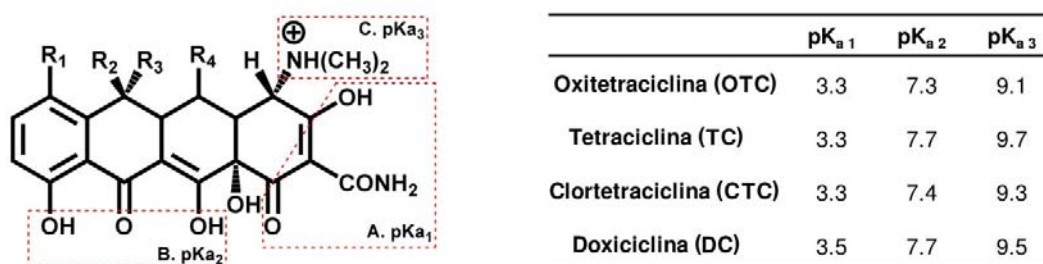
Les tetraciclines presenten un ampli espectre antimicrobià, amb activitat contra bacteris grampositius i gramnegatius. En medicina humana, s'empren en el tractament d'infeccions de vies respiratòries, malalties de transmissió sexual, acne, gastritis, profilaxi de la malària, etc. D'altra banda, en veterinària s'empren en la profilaxi i tractament d'infeccions, i en aquells països en que és una pràctica permesa, com a promotors de creixement.

### 2.6.1.1. Propietats fisicoquímiques

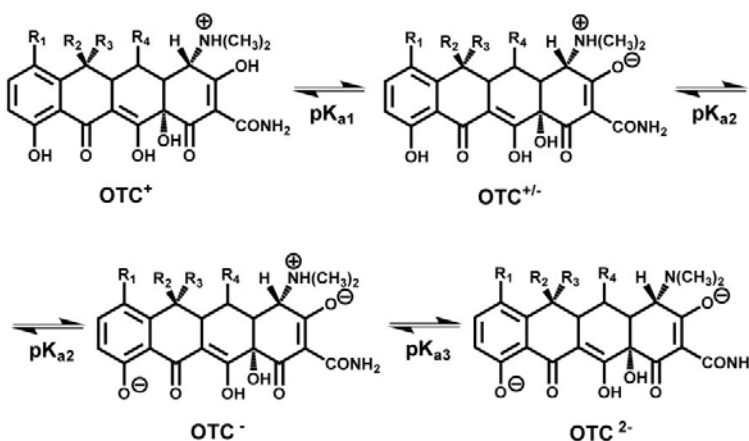
Les tetraciclines presenten diferents formes iòniques en funció del pH del medi. L'existència de les diferents espècies, condiona les interaccions amb els components del sòl, i en conseqüència el seu comportament i destí en el medi ambient.

Les tetraciclines són compostos polars que poden presentar fins a quatre espècies. Tanmateix, dins l'interval de pH en què es troben la majoria dels sòls (entre 4 i 8), només cal considerar-ne tres. Històricament, l'assignació de les constants de dissociació als seus corresponents grups funcionals, ha estat un tema difícil de resoldre. Actualment existeix unanimitat pel que fa a aquesta assignació [103].

La Figura 2.10 mostra els valors de  $pK_a$ , així com els grups funcionals involucrats, de les quatre tetraciclines estudiades en la present tesi. Els equilibris àcid-base, així com les espècies involucrades, es troben recollits en la Figura 2.11.

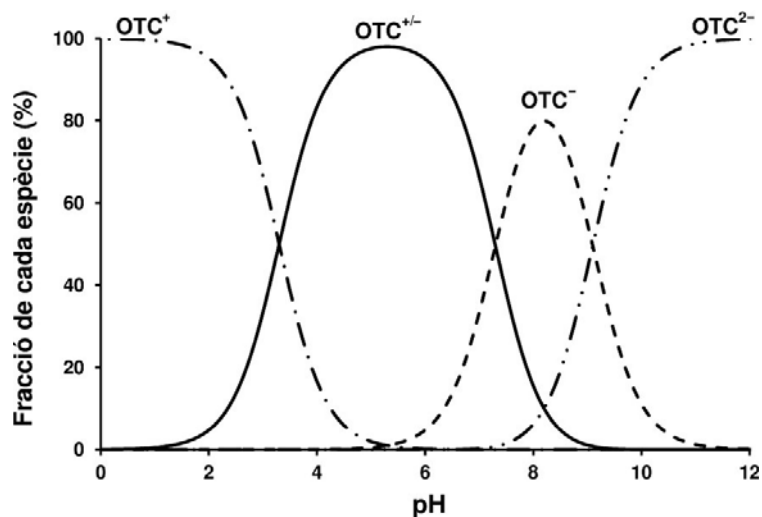


**Figura 2.10.** Grups responsables i valors de les constants d'acidesa de les tetraciclines.



**Figura 2.11.** Equilibris àcid-base de les tetraciclines (TET).

En la Figura 2.12 es mostra a tall d'exemple, el diagrama de distribució d'espècies de l'oxitetraciclina. Les similituds entre les constant d'acidesa fan que les altres tetraciclins presentin un patró similar. En el medi ambient, les espècies majoritàries són la zwitteriònica i la monoaniònica.



**Figura 2.12.** Diagrama de distribució de l'oxitetraciclina en funció del pH [104].

En general, les tetraciclins presenten uns valors de  $S_w$  dins l'interval 230-52000 mg L<sup>-1</sup> i uns valors de log  $K_{ow}$  entre -1.3 i 0.05 amb una forta dependència del pH [105]. Aquests valors indiquen que les tetraciclins presenten, en general, un caràcter força hidròfil.

Les tetraciclins poden formar complexos amb cations metàl·lics presents en solució o integrats dins la xarxa cristal·lina de la fracció mineral dels sòls. Aquests complexos es formen mitjançant el grup  $\beta$ -dicetona (C10-C12) i carboxamido (C2) [106].

Les tetraciclins poden experimentar degradació abiòtica, perdent així bona part de la seva activitat biològica. A més de la possibilitat de fotodegradació [107], també s'ha observat que en funció del pH poden formar-se epi-tetraciclins, iso-tetraciclins i anhidro-tetraciclins [108].

### 2.6.1.2. Presència en el medi ambient

Hi ha molts estudis que confirmen la presència de tetraciclins en els diferents compartiments ambientals. En la Taula 2.2, es recullen una selecció de dades que es troben a la bibliografia. L'entrada d'aquests compostos al medi es deu majoritàriament a la utilització de fems procedents d'animals prèviament medicats per fertilitzar els camps. Winckler *et al.* [109] van confirmar que la família de les tetraciclins pot arribar a presentar unes taxes d'excreció, dos dies després de finalitzar la medicació, del 72 %. D'altra banda, s'han detectat fems amb uns continguts de tetraciclins de l'ordre de centenars de  $\text{mg Kg}^{-1}$  [36, 110]. La vida mitjana de l'oxitetraclina en fems és d'uns 30 dies; tot i així s'han detectat concentracions de fins a  $820 \mu\text{g kg}^{-1}$  després de 5 mesos d'envelliment dels fems [66].

Un cop aquests fems contaminats són introduïts en els sòls destinats a l'agricultura, les tetraciclins queden fortament fixades al sòl. Aquesta elevada retenció anticipa una tendència a la persistència i l'acumulació en el sòl, fins al punt que els sòls agrícoles poden arribar a presentar concentracions de l'ordre de centenars de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Els estudis realitzats per Hamscher *et al.* [111] en un sòl arenós, repetidament fertilitzat amb fems procedents d'animals tractats amb antimicrobians, van evidenciar que la retenció de les tetraciclins era elevada, i no es van detectar en les aigües subterrànies de la zona estudiada. En la mateixa línia, Blackwell *et al.* [112] van posar de manifest l'absència de tetraciclins en els lixiviats d'un sòl regat, malgrat detectar-hi sulfonamides. D'altra banda, es detecten concentracions importants d'oxitetraclina, un dels antimicrobians més emprats en l'aqüicultura, en els sediments que es troben sota les gàbies o a les proximitats de les granges [113].

Tot i disposar d'instal·lacions de tractament d'aigües residuals pròpies, les plantes de producció d'aquests compostos poden esdevenir una font de dispersió de tetraciclins important. Un estudi realitzat en una instal·lació de la Xina, va posar de manifest que l'EDAR de la planta eliminava el 38 % d'oxitetraclina i en els seus efluent es detectaven concentracions de fins a  $19.5 \text{ mg L}^{-1}$ . El mateix estudi va confirmar que les concentracions trobades en les aigües de riu i sediments pròxims eren de fins a  $712 \mu\text{g L}^{-1}$  i  $262 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivament [114].

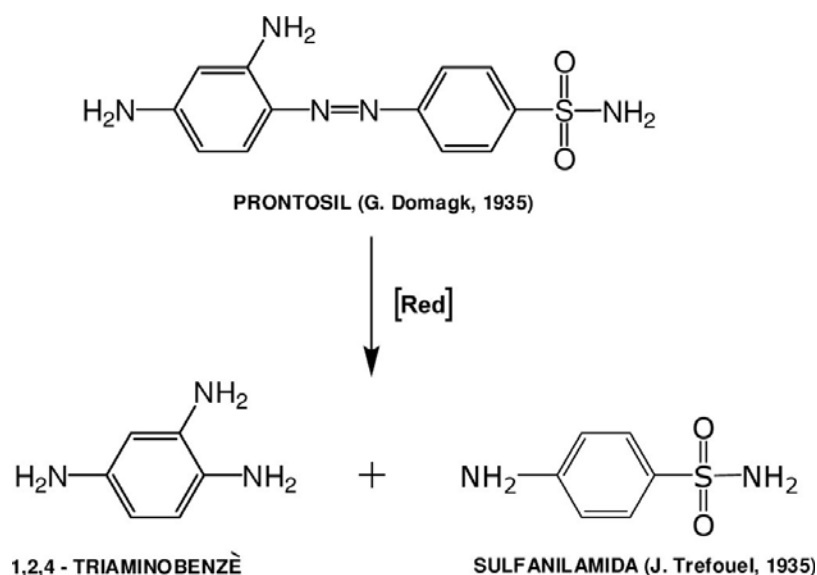
**Taula 2.2.** Concentracions màximes de tetraciclines mesurades en diferents compartiments ambientals.

Tipus de mostra	Tetraciclina	Concentració	Referència
Sòl agrícola	Oxitetraciclina	305 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[115]
	Tetraciclina	900 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[116]
		295 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[111]
		39 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[111]
	Clortetraciclina	30 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[117]
		52 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[118]
Sediment		813 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[115]
	Oxitetraciclina	4.9 $\text{mg kg}^{-1}$	[113]
		10.4 $\text{mg kg}^{-1}$	[119]
	Tetraciclina	0.7 $\text{mg kg}^{-1}$	[119]
	Clortetraciclina	14.7 $\text{mg kg}^{-1}$	[119]
Efluent EDAR	Tetraciclina	1.42 $\mu\text{g L}^{-1}$	[44]
Aigua superficial	Oxitetraciclina	4.49 $\mu\text{g L}^{-1}$	[115]
		0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	[119]
	Tetraciclina	0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$	[119]
		1 $\mu\text{g L}^{-1}$	[119]
	Clortetraciclina	0.69 $\mu\text{g L}^{-1}$	[120]
Aigua subterrània	Tetraciclina	0.13 $\mu\text{g L}^{-1}$	[121]
Llacuna de granja	Clortetraciclina	1000 $\mu\text{g L}^{-1}$	[122]
Aigües residuals granja	Oxitetraciclina	25 $\mu\text{g L}^{-1}$	[123]
	Clortetraciclina	33 $\mu\text{g L}^{-1}$	[123]
Escorrentia procedent de sòl agrícola	Oxitetraciclina	32 $\mu\text{g L}^{-1}$	[124]

## 2.6.2. Sulfonamides

Les sulfonamides van ser els primers agents antimicrobians d'origen sintètic. L'any 1930 el fisiòleg alemany G. Domagk va descobrir el p-((2,4-Diaminofenil)azo)benzèsulfonamida, que es comercialitzà inicialment amb el nom de prontosil i que era altament eficaç en el tractament d'infeccions per estreptococs.

Uns anys després, J. Trefouel *et al.* [125] de l'Institut Pasteur de París van suggerir que la sulfanilamida, un metabòlit del prontosil, era el component actiu contra els estreptococs. D'ençà, el prontosil ha estat considerat un profàrmac, és a dir, una molècula inactiva, que allibera la sulfonamida a través d'una reacció de metabolització. Aquesta consisteix en una escissió reductora de l'enllaç diazil, tal com es representa en la Figura 2.13. El resultat d'aquesta reducció són la sulfanilamida i el 1,2,4-triaminobenzè.

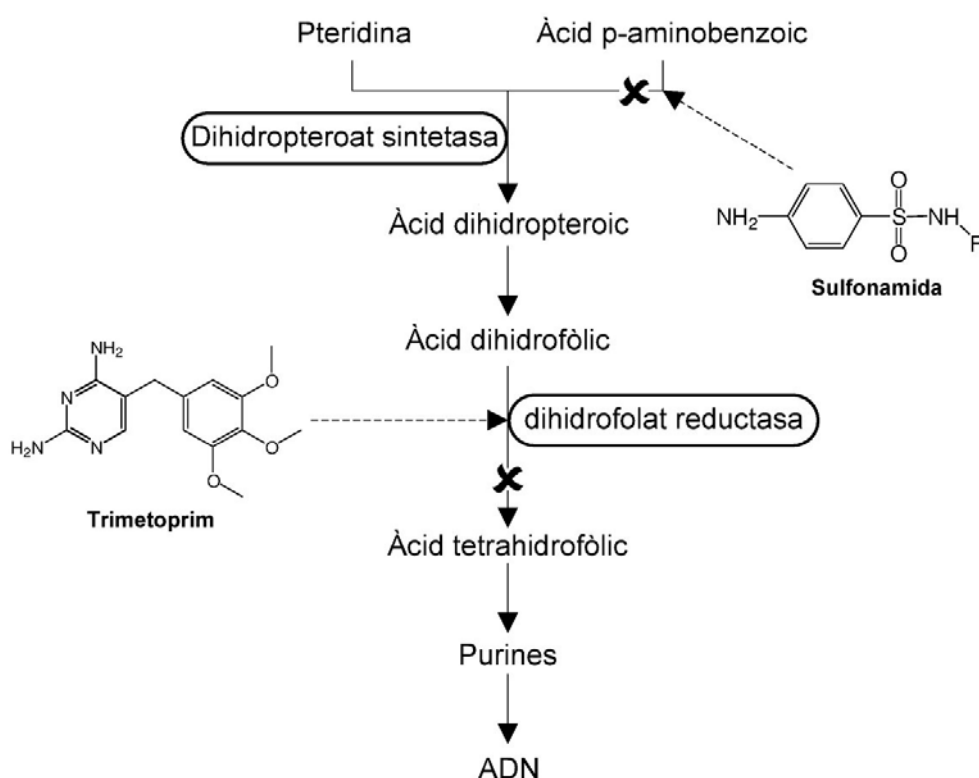


**Figura 2.13.** Metabolisme reductor del profàrmac prontosil.

L'any 1940, J. Woods va descobrir el mecanisme d'acció de les sulfonamides. La seva activitat està relacionada amb el seu anàleg estructural, l'àcid p-aminobenzoic (PABA), que és clau en la ruta de síntesi de l'àcid fòlic o vitamina B9 (Figura 2.14) [126]. Les sulfonamides competeixen amb el PABA per unir-se a l'enzim dihidropteroat sintetasa (DHPS) i inhibir així la síntesi del dihidropteroat (DHP), el que impedeix la formació final d'àcid fòlic. La manca d'àcid fòlic trunca la síntesi de DNA de les cèl·lules, inhibint així el creixement cel·lular i la reproducció dels bacteris. Cal tenir present que l'àcid fòlic no pot

travessar les parets de les cèl·lules bacterianes, i per tant cal que sigui sintetitzat pel bacteri. D'altra banda, la presència de sulfonamides no representa cap problema per les cèl·lules comuns d'animals o humans, ja que aquestes no sintetitzen àcid fòlic, sinó que l'adquireixen a partir de la dieta.

Avui en dia, les sulfonamides s'administren conjuntament amb el trimetoprim, un potenciador que s'uneix a l'enzim dihidrofolat reductasa inhibint la síntesi d'àcid tetrahidrofòlic (Figura 2.14).



**Figura 2.14.** Diagrama esquemàtic que representa l'acció sinèrgica de la sulfonamida i el trimetoprim.

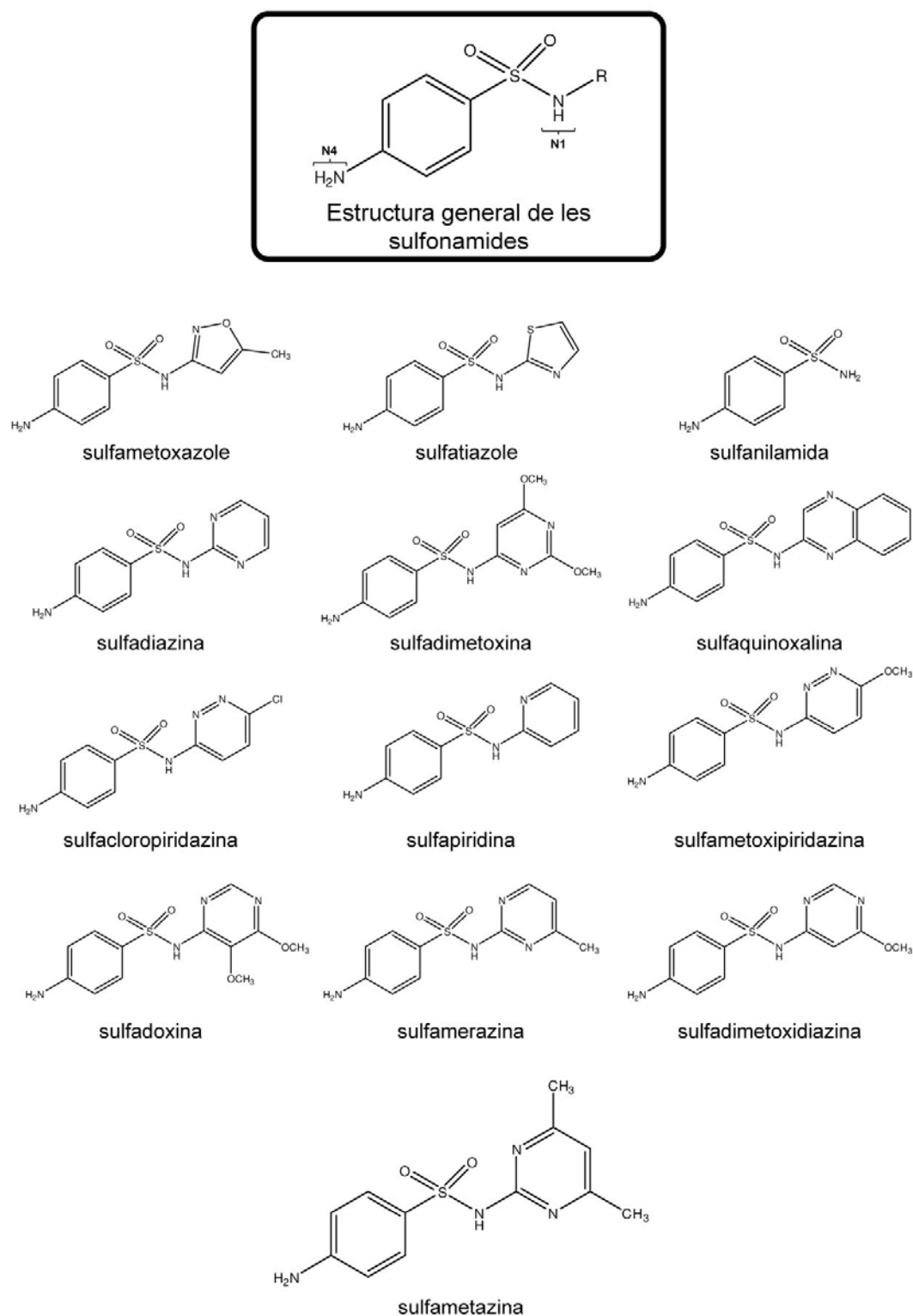
Durant els últims 50 anys, tots els esforços en investigació de sulfonamides s'han centrat en modificar la base de la seva estructura química per tal de potenciar la seva activitat contra el màxim nombre d'agents patògens. Malgrat algunes excepcions, com la sulfasuxidina o l'hidroclorotiazida, la majoria de les sulfonamides comparteixen la mateixa estructura general, és a dir, un grup de sulfanilamido amb el seu nitrogen N4 substituït. L'estructura general i les sulfonamides més àmpliament utilitzades en medicina humana i

veterinària es mostren en la Figura 2.15. La majoria de sulfonamides s'empren en el camp de la veterinària, a causa del seu baix cost i l'alta eficàcia. Però el sulfametoxazole, el sulfatiazole i la sulfanilamida es prescriuen principalment en medicina humana [127].

Les sulfonamides són metabolitzades principalment pel fetge i s'excreten pels ronyons. Els efectes secundaris més habituals en éssers humans i animals són reaccions d'hipersensibilitat i problemes renals associats a una certa nefrotoxicitat [128].

Tot i que la resistència a les sulfonamides va aparèixer poc després del seu descobriment, el seu espectre d'activitat encara segueix sent ampli, i són particularment actives contra bacteris grampositius i gramnegatius, i protozous [129].

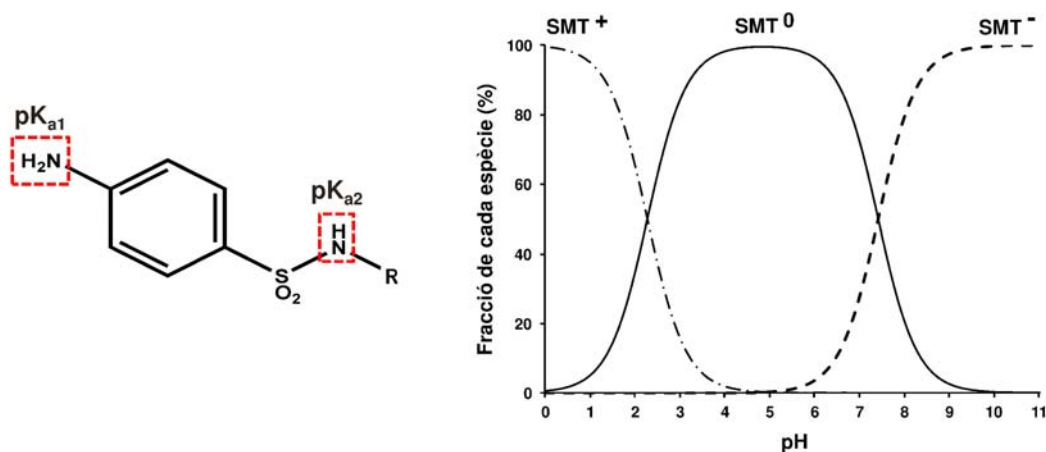




**Figura 2.15.** Estructura general de les sulfonamides i principals sulfonamides emprades en medicina humana i veterinària. La sulfametazina és l'objecte dels nostres estudis.

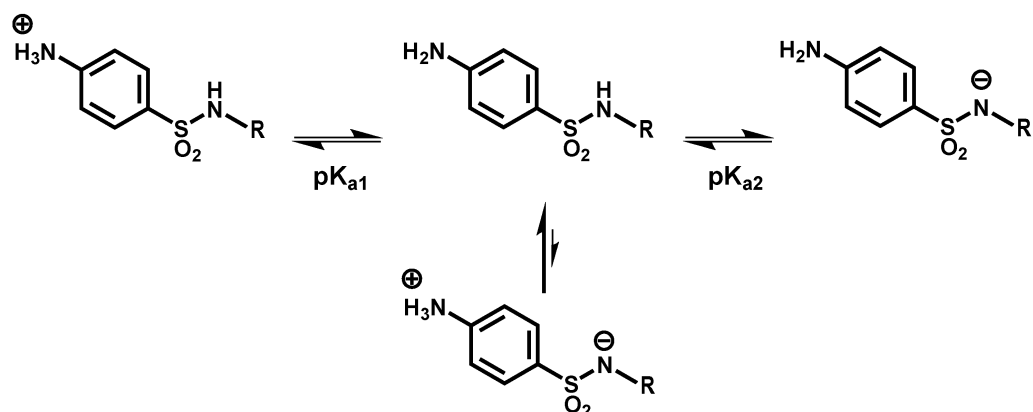
### 2.6.2.1. Propietats fisicoquímiques

Les sulfonamides presenten dos grups funcionals comuns, un grup sulfonamido (N1) i un grup amino (N4), que presenten característiques àcid-base. En medi fortament àcid, l'espècie catiònica predomina (N4 protonat), mentre que a valors de pH bàsic predomina l'espècie aniònica (N1 desprotonat). A valors de pH intermedis preval l'espècie neutra (Figura 2.16). El  $pK_{a1}$ , corresponent al grup amino, presenta valors dins l'interval de 2-3. El  $pK_{a2}$ , corresponent al grup sulfonamida, presenta un valor dins l'interval de 4.5-10.6 [105]. Per tant, en funció del pH del medi, les sulfonamides es poden trobar en una forma catiònica, neutra o aniònica (tal com mostra la Figura 2.16 pel cas de la sulfametazina, SMT).



**Figura 2.16.** Grups funcionals ionitzables de les sulfonamides i fraccions de sulfametazina catiònica (SMT<sup>+</sup>), neutra (SMT<sup>0</sup>) i aniònica (SMT<sup>-</sup>) en funció del pH en solució ( $pK_{a1} = 2.28$  i  $pK_{a2} = 7.42$ ) [130].

Els equilibris àcid-base de les sulfonamides, així com les espècies existents en solució es troben recollides en la Figura 2.17. Tal com mostra aquesta figura, cal remarcar l'existència molt poc significativa de l'espècie zwitteriònica [131].



**Figura 2.17.** Esquema dels diferents equilibri àcid-base de les sulfonamides en solució.

Ja que el  $\text{pK}_{a1}$  és inferior a 3, en condicions ambientals les sulfonamides es troben majoritàriament entre la forma neutra i aniónica. Com ja s'ha mencionat, l'especiació és un contribuent molt important en el destí ambiental d'aquests compostos ja que exerceix un paper clau en les interaccions que tenen lloc entre sulfonamides, sòls i aigua.

En general, les sulfonamides poden ser considerades compostos relativament hidròfils a valors de pH ambientals (4 – 8). En funció del pH i de la sulfonamida, els coeficients de partició octanol-aigua ( $\log K_{OW}$ ) van des de -2.5 a 1.7, i la  $S_w$  oscil·la entre 7.5 i 1500 mg  $\text{L}^{-1}$  [105, 132].

Pel que fa a l'estabilitat química de les sulfonamides, aquestes són estables i no es descomponen mitjançant processos de fotodegradació [133].

### 2.6.2.2. Presència en el medi ambient

Les taxes d'excreció de les sulfonamides són força elevades. Halling-Sørensen *et al.* [134] van observar que fins al 90 % de la dosi administrada a l'animal es pot excretar en la forma original o com a metabòlits. El metabòlit més important és el conjugat de l'àcid acètic que resulta de l'acetilació del N4 [135]. Aquest metabòlit és inactiu però pot tornar a la forma activa en els fems [36]. A més a més, les sulfonamides es poden conjuguar pel grup sulfonamido (N1) amb els sucres del fetge. Aquests conjugats també poden ser fàcilment degradats per microorganismes residents en els fems i transformar-se de nou en el compost actiu original [136]. Això explica que s'hagin trobat concentracions força elevades de sulfonamides (sulfametazina), de fins a uns 10 mg kg<sup>-1</sup>, en fems d'animals medicats [118].

L'entrada de sulfonamides al medi ambient es produeix majoritàriament en utilitzar els fems com a fertilitzants pels camps agrícoles, ja que les sulfonamides són compostos relativament hidròfils a valors típics de pH ambientals. Així, es tracta de fàrmacs que poden lixiviar i anar a parar a altres compartiments ambientals, com aigües subterrànies o superficials. La Taula 2.3 recull una sèrie d'exemples de concentracions màximes mesurades en compartiments ambientals diferents.

**Taula 2.3.** Exemples de concentracions màximes de sulfonamides mesurades en el medi ambient.

Tipus de mostra	Sulfonamida	Concentració	Referència
Sòl agrícola	Sulfametazina	11 µg kg <sup>-1</sup>	[137]
	Sulfametazina	2 µg kg <sup>-1</sup>	[111]
	Sulfametazina	72 µg kg <sup>-1</sup>	[118]
	Sulfametoxidiazina	51 µg kg <sup>-1</sup>	[138]
Sediment de llacuna	Sulfametazina	36 µg kg <sup>-1</sup>	[139]
Efluent EDAR	Sulfametoxazole	2 µg L <sup>-1</sup>	[140]
		2.2 µg L <sup>-1</sup>	[141]
Aigua superficial	Sulfametoxazole	0.48 µg L <sup>-1</sup>	[141]
	Sulfadiazina	4.1 µg L <sup>-1</sup>	[115]
	Sulfametoxazole	2 µg L <sup>-1</sup>	[120]
Aigua subterrània	Sulfametoxazole	0.47 µg L <sup>-1</sup>	[140]
	Sulfametazina	0.16 µg L <sup>-1</sup>	[140]
Aigua de pou	Sulfametazina	0.22 µg L <sup>-1</sup>	[142]
	Sulfadimetoxina	0.068 µg L <sup>-1</sup>	[142]
Llacuna de granja	Sulfametazina	400 µg L <sup>-1</sup>	[122]
Aigües residuals granja	Sulfametazina	10 µg L <sup>-1</sup>	[123]
Escorrentia procedent de sòl agrícola	Sulfacloropiridazina	416 µg L <sup>-1</sup>	[124]

## 2.7. Sòls

Un sòl es pot definir com un sistema obert, heterogeni, porós i dinàmic que recobreix l'escorça terrestre. Els sòls constitueixen l'hàbitat natural de plantes i organismes vius ja que són una font d'aigua, oxigen i nutrients. Els principals tipus d'organismes que hi habiten van des de microorganismes unicel·lulars (protozous, bacteris, etc.) fins a macrofauna (talps, cucs, etc.) [143]. Pel que fa als bacteris se'n poden trobar entre  $10^6$  i  $10^9$  per gram, en funció del sòl. Aquests microorganismes juguen un paper clau en la degradació de la matèria orgànica. D'altra banda, els sòls proporcionen un suport físic i matèries primeres necessàries per al desenvolupament de l'activitat humana. No obstant, a causa d'aquesta activitat humana, els sòls són freqüentment els primers receptacles ambientals de l'entrada de contaminants.

Els sòls estan constituïts per tres fases: sòlida, líquida i gasosa. La fase sòlida està formada per una fracció inorgànica, o mineral, i una d'orgànica. Generalment, la fracció mineral predomina clarament sobre l'orgànica, si exceptuem els histosòls. I és que els sòls solen estar constituïts per matèria mineral (50-60 %), aigua (25-35 %), aire (15-25 %) i una quantitat variable de matèria orgànica, sovint per sota del 10 % [144]. De totes formes, aquests percentatges són del tot orientatius i poden variar considerablement; per exemple, una torba pot contenir continguts de matèria orgànica per sobre del 50 %.

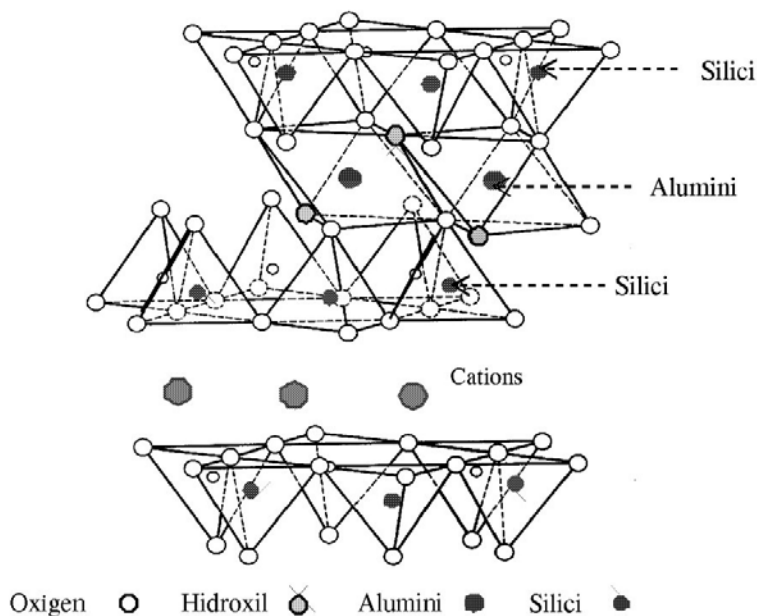
L'aigua i l'aire presents en el sòl constitueixen la fase fluïda. En comparació amb l'aire de l'atmosfera, l'aire del sòl presenta quantitats de diòxid de carboni superiors i força inferiors d'oxigen. A més a més, també hi poden ser presents en quantitats superiors altres gasos produïts per l'activitat microbiana anaeròbica ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$  i  $\text{H}_2\text{S}$ ) [82]. D'altra banda, l'aigua dels sòls es troba generalment en fase condensada i conté una gran varietat d'electròlits.

El coneixement del comportament del sòl, així com de la seva estructura i composició, són aspectes fonamentals per desenvolupar models que permetin entendre la dispersió d'un contaminant en el medi ambient. Aquests són de gran utilitat per tal d'avaluar i predir el destí d'un contaminant en el si d'un sòl amb unes característiques fisicoquímiques definides.

### 2.7.1. Fracció mineral

La fracció mineral està formada majoritàriament per oxigen, silici, alumini i altres metalls en menor proporció com ferro, calci i potassi. Aquesta fracció es troba classificada en dos grans grups, anomenats minerals primaris i minerals secundaris. Els minerals primaris (quars, feldspat, mica, etc.), es formen durant el refredament del magma. En canvi, els minerals secundaris (minerals d'argiles, gibbsita, calcita, etc.) es formen pel desgast de minerals primaris o altres minerals secundaris.

En tots aquests minerals, silici i oxigen són els dos elements majoritaris. Aquests es troben formant silicats que presenten una estructura repetitiva on cada àtom de silici es troba enllaçat amb quatre àtoms d'oxigen en disposició tetraèdrica. També són freqüents les làmines octaèdriques d'àtoms d'alumini envoltats de sis àtoms d'oxigen. Aquests dos tipus d'estructures repetitives es poden trobar en diferents relacions, donant lloc a diferents tipus d'argiles. La caolinita, per exemple, presenta una relació 1:1, és a dir, una estructura formada per una làmina tetraèdrica i una làmina octaèdrica. En canvi, l'esmeclita és un exemple d'argila amb una estructura tipus 2:1. La Figura 2.18 mostra l'estructura de l'esmeclita on una làmina octaèdrica es troba entre dues de tetraèdriques.



**Figura 2.18.** Estructura de l'esmeclita, un exemple de mineral d'argila tipus 2:1 (Figura adaptada de J. Rodríguez *et al.* [145]).

Aquesta disposició per làmines és la que confereix a la part mineral del sòl una determinada superfície específica i grups funcionals que poden interaccionar amb altres molècules presents en la solució. Per acabar, la part mineral també està formada per òxids metàl·lics. Els òxids de ferro, manganès i alumini presenten elevada ubiqüitat, ja que són molt poc solubles als pH mediambientals.

### 2.7.2. Carboni orgànic

En els sòls naturals podem trobar diferents tipus de carboni orgànic (OC, *organic carbon*) provinent de: organismes vius, residus orgànics (restes de fulles, plantes, etc.) i humus [146].

L'humus del sòl, també anomenat matèria orgànica, es troba íntimament agregat a la fracció mineral (Figura 2.7, pàgina 21) i regula les propietats fisicoquímiques del sòl. L'estructura de la matèria orgànica presenta una elevada complexitat, no està completament determinada i actualment es troba en estudi. Aquesta comprèn dos grans grups de naturalesa polimèrica: substàncies no-húmiques i húmiques. Les substàncies no-húmiques són un grup força ampli, de ràpida degradació, de masses moleculars inferiors als 2000 Da i que inclou àcids orgànics de baix pes molecular, carbohidrats, polisacàrids, aminoàcids, pèptids, proteïnes, lípids, etc. En canvi, les substàncies húmiques són força més estables, presenten alts continguts en lignina i/o cel·lulosa, i masses moleculars superiors als 2000 Da. Aquestes, alhora, es diferencien en tres subgrups: els àcids húmics, els àcids fúlvics i l'humina. Aquests subgrups presenten solubilitats diferents, la qual cosa és la base pels seus esquemes de fraccionament. Els àcids húmics presenten un color marró fosc, són solubles en medi alcalí i insolubles en medi àcid. Els àcids fúlvics tenen un color groc-marronós i són solubles en medis alcalins i àcids. En darrer terme, l'humina presenta un color negre i és insoluble tant en medi bàsic com àcid. En general, els sòls de bosc posseeixen un contingut més elevat d'àcids fúlvics que d'húmics, mentre que en el cas de les deveses o prades, és a l'inrevés.

La matèria orgànica del sòl presenta un espectre ampli de grups funcionals on predomina l'oxigen. En ordre decreixent de continguts més freqüents, trobem els grups carboxil, hidroxil (fenòlic i alcohòlic), carbonil, amino i tiol. Així, una fracció important de la matèria orgànica sol presentar caràcter hidròfil i càrrega negativa global a valors de pH ambientals (4 i 8), a causa de l'elevada quantitat de grups carboxils i hidroxils [144].



L'estructura i els grups funcionals presents en la matèria orgànica són determinants a l'hora de configurar la seva conformació, augmentar la retenció d'aigua, regular el pH del voltant, proporcionar setis pel bescanvi catiònic i retenir contaminants.

### 2.7.3. Càrrega superficial

Tal com s'ha comentat anteriorment, la fracció orgànica del sòl proporciona una càrrega negativa, de tipus variable, ja que depèn del pH del medi. D'altra banda, la fracció mineral també pot contribuir a la càrrega global del sòl. Aquesta contribució pot ser permanent o variable. La càrrega superficial permanent és la que resulta d'un procés anomenat substitució isomorfa, i que resulta de substituir un catió coordinat que es troba en la xarxa cristal·lina per un altre de valència inferior. Un exemple freqüent en les argiles és la substitució d'un ió de Si(IV) per un de Al(III) en la capa tetraèdrica. Aquest intercanvi és possible perquè es tracta d'ions de mida semblant (Si i Al tenen un radi iònic de 0.40 i 0.53 Å, respectivament). En la capa octaèdrica es poden donar altres substitucions isomorfes, per exemple quan el Al(III) pot ser substituït pel Fe(II) o Mg(II). Com a resultat de totes aquestes substitucions es produeix una deficiència de càrrega positiva, o el que és equivalent, una càrrega negativa neta, permanent en la superfície mineral i independent del pH del medi.

La càrrega variable deguda a la fracció mineral és atribuïble a grups funcionals en la superfície d'òxids metàl·lics, silicats, carbonats, fosfats, etc. Aquesta càrrega és funció del pH del medi, i pot originar una densitat de càrrega superficial positiva o negativa. La protonació o desprotonació d'oxigen i de grups hidroxil situats en la superfície externa és determinant en la variabilitat de la càrrega [146]. En medi àcid, la protonació d'oxigen i OH perifèric enllaçat a un metall, com Fe o Al, resulta en una càrrega positiva neta. En canvi, en medi bàsic, la desprotonació del grup OH proporciona càrrega negativa neta. L'anomenat punt isoelèctric correspon al pH on la densitat de càrrega elèctrica en la superfície és zero, és a dir, és el pH on hi ha una transició entre una càrrega positiva neta i una negativa neta en la superfície. Particularment, en el cas d'òxids d'Al i Fe aquesta es produeix entre pH 6 i 9 [144].

Finalment, la complexació d'ions de la solució amb lligands presents en la superfície també pot contribuir a la càrrega variable d'un sòl.

#### 2.7.4. Capacitat de bescanvi catiònic

En els sòls naturals la càrrega neta és negativa. Per compensar aquesta càrrega negativa superficial, els cations de la solució són atrets cap a la superfície mitjançant forces electrostàtiques. D'altra banda, aquests cations no resten totalment immobilitzats, sinó que són potencialment bescanviables per altres ions presents.

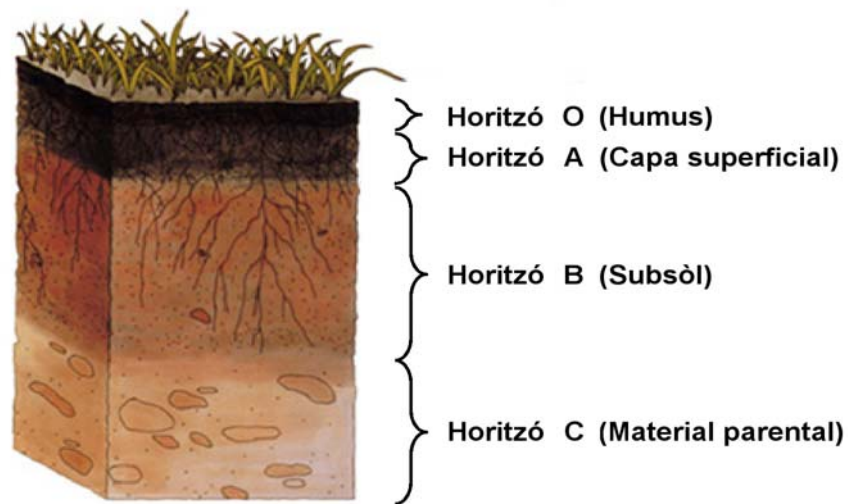
El nombre de mols de cations adsorbits susceptibles de ser bescanviats per unitat de massa de sòl, en condicions determinades, es defineixen com la capacitat de bescanvi catiònic o CEC (*cation exchange capacity*) d'un sòl. Els principals cations bescanviables són  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Na}^+$ .

La CEC s'empra com a mesura de la capacitat de retenció de nutrients ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{NH}_4^+$ ) i la fertilitat d'un sòl. En general, aquest paràmetre està relacionat amb pH, contingut d'argila i contingut de matèria orgànica del sòl. Val a dir que la matèria orgànica és sovint la principal contribuent a la CEC d'un sòl perquè presenta en la seva superfície una gran quantitat de grups funcionals desprotonats capaços de retenir cations [144].

#### 2.7.5. Perfils i classificació

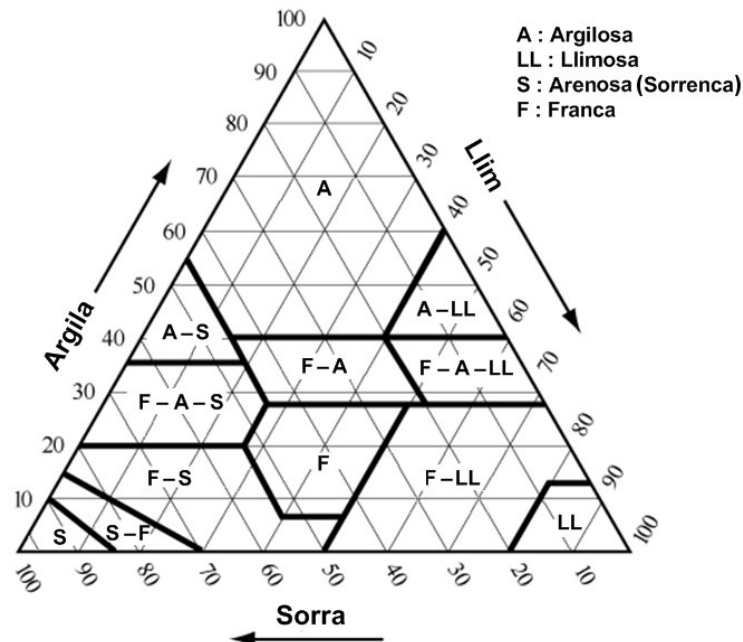
Els sòls posseeixen una estructura i composició complexa que resulta de llargs processos de desgast biològic, geològic i hidrològic [146]. En conseqüència, quan s'estudia el perfil d'un sòl, s'observen diferents estrats que s'anomenen horitzons (Figura 2.19). Avui dia, hi ha diverses nomenclatures per a la descripció dels sòls en funció d'aquests horitzons. En la Figura 2.19, es mostra la proposada per la USDA (United States Department of Agriculture).

Els sòls naturals estan formats per una distribució de partícules de grandàries diferents. És a dir, existeix la possibilitat de separar i fraccionar els sòls segons la grandària de les partícules i establir una altra classificació basada en la distribució de la mida de partícula.



**Figura 2.19.** Diferents horitzons que es poden trobar segons la profunditat i el procés de formació predominant d'acord amb la nomenclatura proposada per la USDA (Figura adaptada de la pàgina web de la USDA [147]).

La textura és una de les característiques físiques més importants del sòl. Aquesta ve determinada per la grandària de les partícules que el constitueixen. Tot i que un sòl pot presentar partícules força grans, es considera que el sòl està format per partícules amb una grandària màxima de 2 mm. Hi ha diversos esquemes de divisió en fraccions i de classificació de sòls en base a la proporció de les partícules de diferent grandària. En aquesta tesi s'ha emprat la classificació proposada per la USDA, que defineix tres fraccions: sorra ( $50 < \varnothing < 2000 \mu\text{m}$ ), llim ( $2 < \varnothing < 50 \mu\text{m}$ ) i argila ( $\varnothing < 2 \mu\text{m}$ ). Segons el contingut de cadascuna de les tres fraccions es pot definir la textura mitjançant els anomenats diagrames de textura (Figura 2.20).



**Figura 2.20.** Classificació dels sòls basada en les classes texturals segons la USDA.

La fracció sorra està formada per partícules grolleres que presenten una superfície específica més baixa, la qual limita la seva capacitat de retenció d'aigua, nutrients i contaminants. Aquesta fracció, com la fracció llim, té un contingut abundant en minerals primaris (quars i feldespat). D'altra banda, la fracció argila representa les propietats contràries: és la més fina, presenta una superfície específica elevada, una carga superficial considerable i una bona capacitat de retenció d'aigua, nutrients i contaminants. Els minerals secundaris predominen en la fracció argila junt amb traces d'òxids de ferro i alumini, i matèria orgànica. Concretament, aquesta fracció està majoritàriament composta per fil·losilicats, com la caolinita, l'il·lita, etc.

### 2.7.6. Sorció d'agents antimicrobians

Històricament, l'estudi de la sorció de contaminants orgànics en els sòls s'ha centrat bàsicament en pesticides i hidrocarburs aromàtics policíclics o PAH (*polycyclic aromatic hydrocarbons*). Generalment, en aquests sistemes la sorció es pot explicar mitjançant un model simple de partició hidrofòbica.

Durant els darrers anys, s'han publicat diversos estudis sobre la sorció de fàrmacs en sòls. En el cas d'antimicrobians s'ha constatat que la sorció no es pot explicar únicament

mitjançant models de partició [148-151], i cal tenir en compte altres tipus d'interaccions amb el sòl (Figura 2.7, pàgina 21). Aquestes venen determinades per les propietats fisicoquímiques del sòl (com textura, CEC, pH, contingut de matèria orgànica, etc.) i del fàrmac ( $pK_a$ ,  $S_W$ ,  $K_{OW}$ , etc.).

Tot seguit, s'indiquen els resultats dels principals estudis realitzats sobre la sorció de tetraciclins i sulfonamides en sòls.

### **Tetraciclins**

Es considera que les tetraciclins són un dels grups de fàrmacs més retinguts en els sòls. Generalment, presenten valors de  $K_d$  entre  $10^2$ - $10^4$  ( $L\ kg^{-1}$ ).

A causa de la complexitat que presenten els sòls naturals, nombrosos estudis s'han centrat en investigar la sorció de tetraciclins en diferents components per separat, com ara substàncies húmiques, argiles de referència i òxids metàl·lics.

Els estudis sobre la sorció de tetraciclins en àcids húmics han posat de manifest que la magnitud de la retenció és força elevada i que depèn de l'especiació dels antimicrobians, la força iònica i el tipus de cations presents [152-155]. La majoria d'estudis destaquen que l'augment de pH i força iònica redueixen significativament la sorció d'aquests compostos. Pel que fa als mecanismes implicats en la sorció en la matèria orgànica destaquen el bescanvi iònic, formació de ponts d'hidrogen i formació de complexos ternaris tetraciclina-catió polivalent-àcid húmich (també anomenat *cation bridging*). El bescanvi catiònic té lloc a través del grup dimetilamino de la tetraciclina. Els ponts d'hidrogen s'estableixen entre els grups funcionals polars presents en les tetraciclins i del sorbent orgànic. La complexació té lloc mitjançant el grup  $\beta$ -dicetona (Figura 2.10), sent els complexos més estables els que donen lloc a sorcions més intenses ( $Fe(III) > Al(III) > Ca(II)$  [155]).

La sorció de tetraciclins en minerals d'argila segueix el mateix patró que l'observat en la matèria orgànica, és a dir, ve determinada pel pH de la solució, força iònica i tipus d'ions presents en la solució [156-163].

Pel que fa a la sorció de tetraciclins en òxids de ferro i alumini, s'ha observat que és elevada, depèn del pH i la interacció es regeix per una formació de complexos en

superfície (tipus metall-ligand 2:1) on els grups carbonils presents en les tetraciclines semblen jugar un paper clau [164-165].

Hi ha diversos estudis sobre la sorció de tetraciclines en mesclades formades per argiles i substàncies húmiques. Alguns autors han observat una disminució de la sorció de tetraciclines en presència de substàncies húmiques. Aquest comportament s'ha justificat mitjançant la creació d'una capa que recobreix i inhabilita els setis presents en la superfície de les argiles, o bé que bloqueja la difusió de les tetraciclines entre les làmines de les argiles [158, 166]. Altres autors indiquen que a valors pH inferiors 6, la presència de substàncies húmiques condueix a un augment de la sorció [156, 161].

Finalment, els estudis sobre la sorció en sòls naturals han posat de manifest que la sorció de tetraciclines és superior a la d'altres antimicrobians [167-169], i depèn de pH, força iònica, CEC, textura, matèria orgànica i contingut d'òxids metàl·lics [168, 170-174]. Val a dir que alguns treballs han subratllat la poca influència de la matèria orgànica del sòl en la sorció [170, 172]. La Taula 2.4 mostra un recull dels valors de  $K_d$  de tetraciclines en sòls trobats en la bibliografia.

**Taula 2.4.** Valors bibliogràfics de coeficients de distribució ( $K_d$ ) de tetraciclines en sòls.

Propietats sòl Textura <sup>a</sup> / pH <sup>b</sup> / OC % / CEC <sup>c</sup>	Log $K_d$ (L kg <sup>-1</sup> )			Referència
	OTC	TC	CTC	
Arenofranca / 6.1 / 1.6 / 10.0	2.83			[167]
Arenosa / 5.6 / 1.4 / 6.7	2.83			
Franco-arenosa / 5.6 / 1.1 / 13.1	3.01			
Arenosa / 6.3 / 1.5 / 35.3	2.62			
Arenosa / 6.1 / 2.2 / 8.9	3.59			[171]
Argilosa / 5.6 / 2.2 / 24.8	3.72			
Argilosa / 7.2 / 3.2 / 13.1	3.05			
Argilosa / 7.4 / 3.9 / 20.5	2.98			
Arenosa / 3.4 / 2.5 / 1.6	3.43			
Argilosa / 7.4 / 5.9 / 39.3	3.67			
Arenosa / 3.6 / 7.0 / 2.7	3.86			
Arenosa / 6.3 / 3.1 / 4.2	2.98			
Argilosa / 7.4 / 2.6 / 12.5	3.21			
Argilosa / 4.9 / 12.2 / 39.0	3.52			
Arenosa / 4.6 / 4.5 / 2.4	3.42			
Argila (21 %) <sup>d</sup> / 7.5 / 2.9 / 26.5	3.09	3.49	3.76	[173]
Franco-llimosa / 6.0 / 1.4 / 14.6	3.82	3.63	3.93	
Franco-llimosa / 4.2 / 1.3 / 11.3	4.92	5.02	4.96	
Argila (64 %) <sup>d</sup> / 3.8 / 0.5 / 18.6	5.43	5.49	5.22	
Argila (2 %) <sup>d</sup> / 5.4 / 0.5 / 0.8	3.39	3.40	3.29	
Franco-arenosa / 5.3 / 7.5 / 18.9			3.59	
Argila (41 %) <sup>d</sup> / 5.5 / 1.4 / 1.3			4.12	
Argila (82 %) <sup>d</sup> / 4.9 / 0.7 / 3.4			4.21	
Franco-argilosa / 6.8 / 3.1 / 22.4	3.26			[168]
Arenofranca / 6.6 / 2.2 / 11.4	2.82			
- / 6.9 / 0.7 / 35.2	2.52	2.64	2.76	[175]
- / 4.6 / 1.6 / 60.0	3.03	3.26	3.10	
Argila (78 %) <sup>d</sup> / 5.0 / 25.6 / 20.2	3.14			[176]
Argila (48 %) <sup>d</sup> / 4.0 / 15.7 / 18.8	3.34			
Argila (32 %) <sup>d</sup> / 5.2 / 9.8 / 16.9	2.81			
Argila (46 %) <sup>d</sup> / 4.5 / 10.2 / 18.2	2.95			
Franco-arenosa / 7.5 / 1.3 / 20.2	3.03			[177]
Franco-argilosa / 7.7 / 0.6 / 27.3	2.93			
Arenosa / 7.4 / 0.3 / 9.0	2.96			
Argilosa / 7.7 / 1.1 / 21.3	2.74			
Franco-argilosa / 7.8 / 0.8 / 38.9	3.02			
Argilosa / 7.3 / 0.4 / 12.1	3.08			
Franco-arenosa / 7.3 / 2.4 / 23.4	3.43			
Argilosa / 5.7 / 4.8 / 26.8	3.71			

Argilosa / 5.1 / 0.5 / 7.0	3.70			
Franco-arenosa / 4.7 / 0.5 / 17.5	4.05			
Franco-argilosa / 7.2 / 0.8 / 29.3	3.63			
Arenofranca / 7.7 / 1.4 / 6.4	2.58			
Franca / 7.4 / 0.8 / 15.8	3.24			
Arenofranca / 6.7 / 0.2 / 2.5	2.83			
Franca / 5.5 / 2.9 / 20.6	3.60			
Franco-argil·lollimosa / 4.9 / 39.9 / 31.3	4.20			
Franco-argil·lollimosa / 5.4 / 41.3 / 40.9	4.15			
Franco-arenosa / 5.7 / 1.2 / 16.9	3.39			
Franca / 5.5 / 1.5 / 27.8	3.61			
Franco-arenosa / 7.7 / 1.8 / 20.3	3.08			
Franco-arenosa / 6.7 / 0.7 / 16.0	2.84			
Franco-arenosa / 7.7 / 0.2 / 22.1	2.77			
Franco-arenosa / 6.6 / 0.5 / 6.3	3.56			
Arenofranca / 5.5 / 2.5 / 2.4	3.59	3.79	3.71	[172]
Arenosa / 5.5 / 1.7 / 4.3	1.61	1.61	1.75	
Franca / 5.5 / 8.9 / 17	3.88	3.92	3.76	
Franco-argil·loarenosa / 5.5 / 0.3 / 3.1	2.20	2.15	2.28	
Argilosa / 5.5 / 3.9 / 15	2.90	3.08	3.11	
Argilosa / 5.5 / 0.46 / 25	3.10	3.34	3.38	
Franco·l·limosa / 5.5 / 1.9 / 72	2.58	2.43	2.57	

<sup>a</sup> Textura USDA.

<sup>b</sup> Determinat en  $\text{CaCl}_2$  10 mM.

<sup>c</sup> Unitats: meq/100 g o cmol  $\text{kg}^{-1}$ .

<sup>d</sup> La publicació només reporta el percentatge d'argila.

## Sulfonamides

Les interaccions entre sòl i sulfonamides que tenen lloc en el sistema sòl-aigua es caracteritzen per no ser massa fortes. Així, generalment presenten uns valors baixos de  $K_d$ , entre  $<1 - 70 \text{ L kg}^{-1}$  [178-180]. Malgrat això, un cop entren en el sòl poden persistir-hi durant períodes de temps relativament llargs (superiors a tres mesos), a concentracions que excedeixen els  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  establerts com a límit en els estudis d'avaluació de risc ambiental [181]. En aquest context, Förster *et al.* [182] han observat que la sulfadiazina i el seu metabòlit hidroxilat poden experimentar un procés en el sòl anomenat "segrest", i quedar fortament retingudes durant un llarg període de temps, minimitzant la seva disponibilitat respecte dels processos típics de degradació biòtica i/o abiòtica. D'altra banda, alguns autors han alertat que la presència de fems en els sòls produeix una disminució en la sorció de sulfonamides, augmentant la seva mobilitat [135, 179].



Nombrosos treballs sobre la sorció de sulfonamides s'han centrat en els diferents components del sòl, per tal de simplificar l'escenari i poder caracteritzar els diferents mecanismes involucrats. Tal com s'ha fet per les tetraciclins, tot seguit es detallen els principals resultats.

La sorció de sulfonamides en materials de naturalesa orgànica (àcids húmics, compost, fem, etc.) depèn de pH, temps de contacte i composició de la matèria orgànica [183-184]. Concretament, la sorció augmenta amb el temps de contacte i la disminució del pH. D'altra banda, s'han identificat tres interaccions possibles entre sulfonamides i matèria orgànica. En primer lloc, sovint apareix una forta interacció de caràcter iònic entre el grup amino (N4) carregat positivament, present en l'espècie catiònica, i els grups aniònics presents en la matèria orgànica del sòl (principalment grups carboxilat i fenolat). Aquest tipus d'interacció també és coneguda com enllaç catiònic o *cation binding*. En segon lloc, pot tenir lloc la partició de l'espècie neutra. En darrer terme, es pot formar un enllaç covalent mitjançant una reacció d'acoblament creuat. Aquesta reacció, catalitzada per la presència de MnO<sub>2</sub> o algun enzim oxidasa del sòl, es produeix a causa de l'atac nucleòfil del grup N4 a un grup electròfil present en la matèria orgànica [185-186].

La sorció de sulfonamides en argiles de referència és més feble que en substàncies húmiques i disminueix en augmentar el pH del medi [187-189]. Gao i Pedersen [188] van observar que la sorció era més important en montmorillonita que caolinita, fet que van atribuir a la densitat de càrrega superficial d'aquestes argiles (montmorillonita > caolinita). D'altra banda, aquest treball també va proposar el bescanvi iònic com el principal mecanisme de sorció de l'espècie carregada positivament.

Els estudis de sorció de sulfonamides en sòls naturals han corroborat que la matèria orgànica i el pH són els dos factors clau [180, 187, 190-191]. L'estudi de Figueroa-Diva *et al.* [172] confirma que la CEC i el contingut d'òxids tenen poca influència sobre la sorció de sulfonamides, la qual es produeix majoritàriament a través de la matèria orgànica. En la Taula 2.5 es recullen alguns valors bibliogràfics de  $K_d$  de sulfonamides en sòls. Es pot observar que són força més baixos que els reportats per a les tetraciclins.

**Taula 2.5.** Coeficients de distribució ( $K_d$ ) de sulfonamides trobats en la bibliografia.

<b>Sulfonamida</b>	<b>Propietats sòl Textura<sup>a</sup> / pH<sup>b</sup> / OC % / CEC<sup>c</sup></b>	<b><math>K_d</math> (L kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referència</b>
Sulfametazina	Franco-arenosa / 8.2 / 0.1 / 12.1	0.32	[190]
	Franco-arenosa / 7.8 / 1.4 / 10.7	0.55	
	Franca / 5.4 / 2.2 / 15.7	2.52	
	Franca / 5.5 / 2.7 / 20.0	3.77	
	Franca / 8.2 / 3.8 / 23.3	1.70	
	Arenofranca / 5.3 / 1.0 / 6.8	4.6	[180]
	Franco-arenosa / 7.7 / 2.1 / 24	9.8	
	Franca / 5.6 / 1.1 / 13	4.5	
	Franco-argil·loarenosa / 7.9 / 1.1 / 24	2.0	[192]
	Franco·l·limosa / 7.5 / 1.61 / -	0.79	[179]
	Franco·l·limosa / 7.0 / 1.61 / 24.4	2.4	[187]
	Arenosa / 5.2 / 0.9 / -	1.2	[193]
	Arenofranca / 5.6 / 2.3 / -	3.1	
	Franco-arenosa / 6.3 / 1.2 / -	2.0	
	Argil·l·limosa / 6.9 / 1.1 / -	1.0	
Sulfatiazole	Arenofranca / 5.3 / 1.0 / 6.8	9.1	[180]
	Franco-arenosa / 8.0 / 2.1 / 24	11	
	Franca / 5.7 / 1.1 / 13	7.7	
	Franco-argilosa / 6.2 / 3.1 / -	3.0	[105]
Sulfacloropiridazina	Franco-argilosa / 6.5 / - / -	1.8	[135]
	Franco-arenosa / 6.8 / - / -	0.9	
Sulfametoxazole	Argilosa / 6.8 / 0.37 / -	0.23	[194]
	Franco-arenosa / 4.3 / 7.1 / -	37.6	
Sulfadiazina	Franco·l·limosa / 7.5 / 1.61 / -	2.0	[179]
	Franco·l·limosa / 7.0 / 1.61 / 24.4	2.0	[187]

<sup>a</sup> Textura USDA.

<sup>b</sup> Determinat en CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

<sup>c</sup> Unitats: meq (100 g)<sup>-1</sup> o cmol kg<sup>-1</sup>.

## 2.8. Biochar

### 2.8.1. Biochar, un tipus de negre de carboni

El negre de carboni, també anomenat freqüentment *black carbon* o *black C* segons la terminologia anglosaxona, engloba molts tipus de matèria orgànica procedent d'una combustió incompleta de combustibles i vegetació [195]. De fet, el terme és tan ampli en significat que comprèn des de biomassa parcialment carbonitzada fins a grafit. El nom negre de carboni neix de la voluntat de proporcionar una única definició sense ambigüitats que abasti tots aquests materials de carboni amb diferents propietats en funció de les condicions de piròlisi, materials de partida, desgast mediambiental sofert, etc. En el present context, el biochar, també anomenat carbó biològic, és un subconjunt del negre de carboni. En aquesta tesi, el biochar es defineix, tal com recomana la *International Biochar Initiative* (IBI), com un material carbonitzat procedent de biomassa que s'aplica als sòls, com condicionador o esmena, per tal d'aconseguir una millora de tipus agrícola i mediambiental [196]. Es tracta doncs d'un material sòlid d'aspecte ennegrit, amb un alt contingut de carboni, produït durant la piròlisi de residus de biomassa (fusta, fullaraca, fems i altres restes orgàniques) en absència d'oxigen i a temperatures relativament baixes (350-600 °C) [197]. El biochar pot produir-se a diferents escales, des d'una producció local per part de petits agricultors, fins a una producció industrial a gran escala [198]. Actualment, atès que la tecnologia bioenergètica es troba en plena fase d'expansió, el biochar és majoritàriament d'origen industrial. Aquest es considera un residu carbonitzat que s'obté en el mateix procés de producció que el gas de síntesi (*syngas*) i l'oli de piròlisi (*bio-oil*). La venda d'aquests combustibles renovables, els quals permeten obtenir energia (electricitat o calor), permeten abaratir substancialment els costos de producció del biochar (fins a 42 € per tona) [199].

El procés de piròlisi pot ser ràpid (minuts) o lent (hores o dies), depenent de la proporció final desitjada de *syngas*, *bio-oil* i biochar [200]. Una piròlisi lenta generalment produeix una fracció més elevada de biochar (~35 %) que una de ràpida (~12 %) [200]. Recentment, també s'ha proposat l'ús de microones en la producció de biochar a escala industrial. Les perspectives d'aquesta nova tecnologia són prometedores perquè pot presentar un rendiment superior, de fins al 50 % de biochar [201].

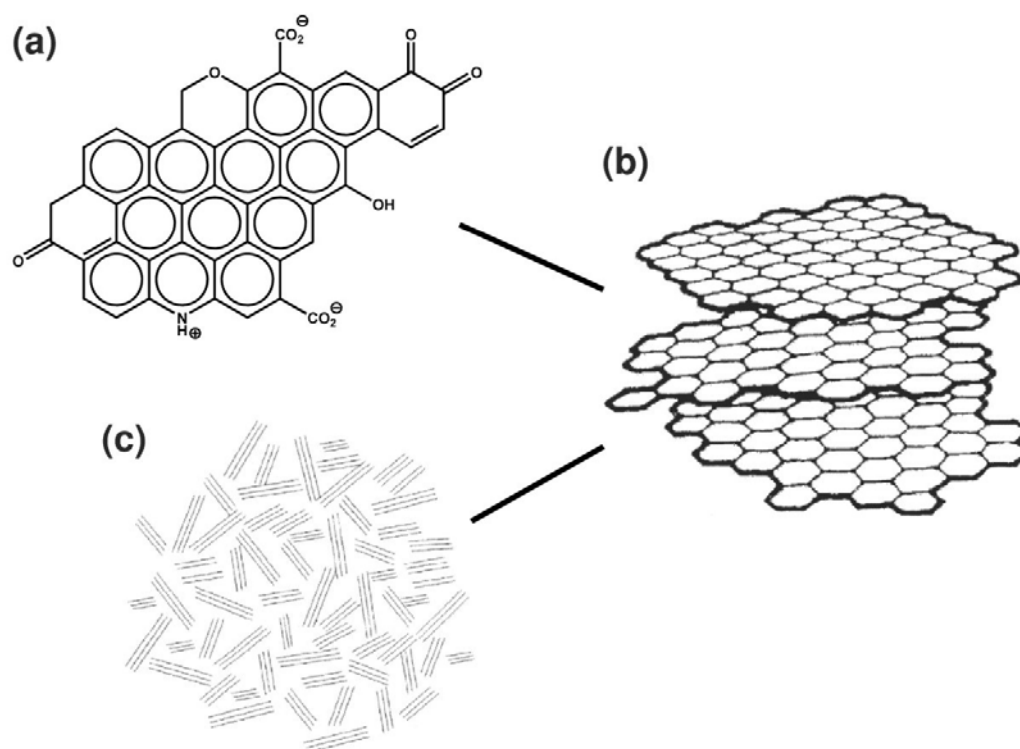
D'altra banda, val a dir que no s'ha de confondre el carbó actiu amb el biochar. Tot i que es tracta de materials similars, es diferencien en el procés de producció i les aplicacions

resultants. El carbó actiu s'obté a altes temperatures (500-900 °C) i s'activa mitjançant una atmosfera oxidant a altes temperatures o per activació química [202]. El material resultant és altament porós, amb superfícies específiques entre 500-1500 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. A causa d'aquestes propietats, l'ús del carbó actiu en el camp mediambiental es centra en els processos de filtració d'aigua, on es capaç de retenir contaminants en fase gas, líquida o sòlida [203]. Els seus elevats costos de producció (fins a 6000-10000 € per tona) en restringeixen dràsticament el seu ús.

### **2.8.2. Característiques del biochar: estructura i propietats fisicoquímiques**

Les propietats fisicoquímiques del biochar depenen del material de partida (tipus de biomassa) i de les condicions emprades en la seva producció (temperatura, temps de piròlisi, tipus de reactor, pressió, etc.) [200, 204]. Per exemple, els biochars produïts a temperatures de piròlisi elevades (500-700 °C) són sensiblement més carbonitzats i solen presentar superfícies específiques superiors a 300 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. En canvi, si el procés de piròlisi es duu a terme a temperatures de piròlisi baixes (300-400 °C), s'obtenen biochars parcialment carbonitzats i superfícies específiques inferiors a 200 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> [205].

Durant la piròlisi del biochar, com en la formació de qualsevol carbó, la matèria orgànica de partida experimenta una descomposició tèrmica i una posterior reducció de volum. A part de la pèrdua d'aigua i altres molècules volàtils, l'estructura biopolimèrica original –freqüentment arquitectures de tipus lignina, cel·lulosa i hemicel·lulosa vegetal– canvia a una estructura amorfa on coexisteixen una mescla d'estructures poliaromàtiques i restes de biopolímers alterats [206]. L'estructura del biochar és altament aromàtica, on una sèrie d'anells aromàtics de sis baules condensats adopten estructures planes (plaquetes) de tipus grafit (Figura 2.21, a) [207]. Aquestes estructures aromàtiques repetitives, que recorden a l'estructura del grafè, s'agrupen formant piles d'un nombre reduït de plaquetes que formen petits reductes d'estructures cristal·lines dins el carbó (Figura 2.21, b) [208]. S'ha confirmat mitjançant difracció de raigs X (XRD) que els biochars poden arribar a contenir fins al 71 % de grafit microcristal·lí format per agregats de tres plaquetes. Aquestes es troben en disposició turbostràtica (és a dir, plaquetes no alineades) i es disposen en l'espai de forma aleatòria (Figura 2.21, c) [207, 209].



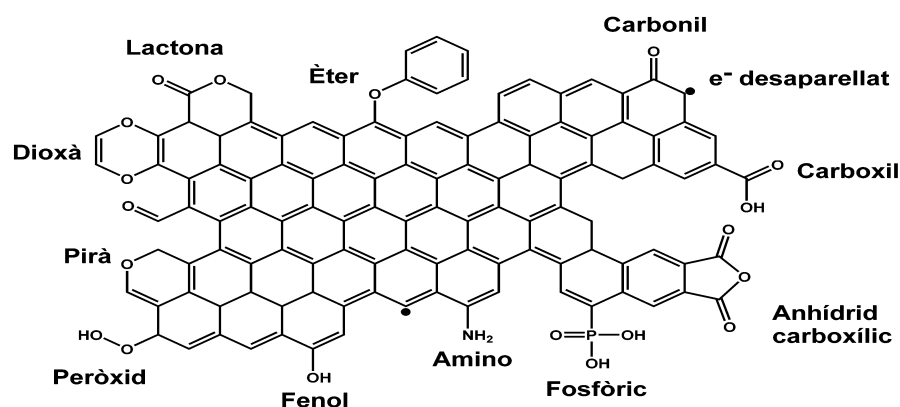
**Figura 2.21.** Estructura del biochar. (a) Representació d'una plaqueta (capa de tipus grafè) on s'observa el sistema  $\pi$  conjugat central i els grups funcionals a les vores. (b) Unitats estructurals bàsiques apilades en un màxim de tres capes. (c) Distribució aleatòria dels agregats microcristal·lins. Figura adaptada de Schmidt *et al.* [207].

El biochar, a més de carboni, conté oxigen, hidrogen, nitrogen, fòsfor i sofre en menor proporció [210-211]. Com ja s'ha comentat anteriorment, el contingut de cada un d'aquests elements dependrà de la naturalesa de la biomassa de partida i de les condicions de piròlisi.

Els biochars més carbonitzats, produïts entre 500 i 700 °C, tenen percentatges més alts de carboni ( $\geq 90\%$ ) i més baixos en oxigen ( $\leq 20\%$ ) i hidrogen ( $\leq 2\%$ ) [204]. Per contra, els biochars parcialment carbonitzats contenen menys carboni (40-50 %) i uns continguts superiors d'oxigen ( $> 20\%$ ) i d'hidrogen (2-10 %) [205]. És per això que la relació H/C sovint s'empra per indicar el grau de carbonització del biochar, perquè la presència d'hidrogen és un indicatiu de residus de matèria orgànica original poc carbonitzada [212].

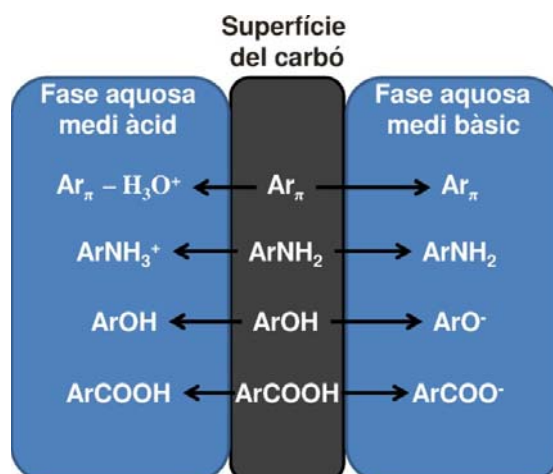
Oxigen, nitrogen i sofre són elements que es poden trobar integrats dins les plaquetes del biochar en forma d'heteroàtoms en els anells aromàtics (p. ex. pirans, cromens, dioxans o

lactones), així com formant part dels diferents grups funcionals situats a les vores. Els principals grups funcionals que es poden trobar a les vores de les plaquetes del biochar són fenol, carboxil, carbonil, ester, amino, etc. (Figura 2.22) [213]. Finalment, també hi ha electrons  $\sigma$  desaparellats a les vores de les plaquetes, que són el resultat de trencaments homolítics d'enllaços durant la piròlisi [213-215].



**Figura 2.22.** Representació dels diferents grups funcionals i heteroàtoms més comuns en biochars.

A part d'oferir la possibilitat d'interaccionar amb possibles adsorbats, la presència d'aquests grups funcionals confereix un caràcter àcid-base i hidròfob-hidròfil a la superfície del biochar. Per tant, en funció del pH de la solució en contacte amb la superfície, aquesta exhibirà una càrrega superficial diferent, la qual es traduirà en canvis de polaritat i hidrofobicitat. De fet, la ionització dels grups funcionals de la superfície pot reduir significativament la hidrofobicitat tan característica d'aquests materials. La Figura 2.23 presenta un recull dels principals grups funcionals i el seu comportament àcid-base.



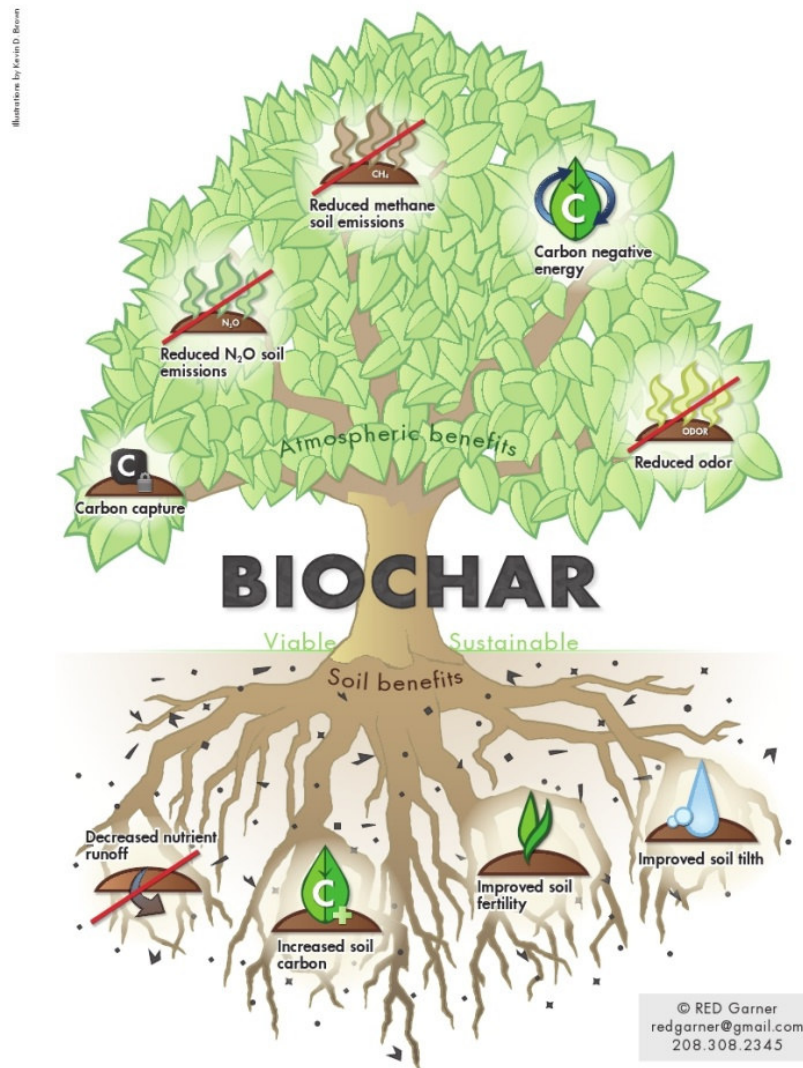
**Figura 2.23.** Principals grups funcionals de la superfície del biochar involucrats en les característiques àcid-base. “Ar” significa enllaçat a un anell aromàtic (Figura adaptada de Radovic *et al.* [216]).

La càrrega positiva en la superfície del biochar sol ser deguda a grups funcionals amb caràcter bàsic que contenen oxigen (p. ex. pirans i cromens), nitrogen (amines) i als plans basals de les plaquetes que presenten un sistema d'electrons  $\pi$  deslocalitzat que pot interaccionar amb l'ió hidròni mitjançant mecanismes tipus EDA [216]. En canvi, la càrrega negativa és deguda principalment a grups funcionals àcids que contenen oxigen, com els carboxils i en menor extensió fenols i carbonils. Sovint, la presència d'una gran quantitat de grups funcionals diferents, fa que a pocs  $\mu\text{m}$  de distància coexisteixin grups funcionals amb caràcter àcid-base diferent. Aquest fet dificulta molt la caracterització de les interaccions que poden tenir lloc en la superfície del biochar.

Finalment, la superfície del biochar també es pot considerar amfòtera respecte a les interaccions  $\pi$ . Gràcies a l'extensa regió central poliaromàtica i polaritzable, les plaquetes de biochar presenten un caràcter marcadament donador d'electrons. Però no es pot descartar que als límits de les plaquetes puguin existir regions amb caràcter donador o acceptor d'electrons a causa de la presència de determinats grups funcionals. Els grups hidroxil, amino, èter i èster són donadors de densitat electrònica perquè presenten electrons  $\sigma$  o  $\pi$ . En canvi els grups carboxil, carbonil i nitro són acceptors de densitat electrònica, a causa de la presència d'orbitals buits en les seves configuracions electròniques [213, 217].

### 2.8.3. Aplicacions ambientals i agrícoles

El biochar proporciona una sèrie de beneficis que es resumeixen en la Figura 2.24. En destaquen dos: la possibilitat eficient de segrestar carboni atmosfèric ( $\text{CO}_2$ ), mitgant així els efectes produïts pel canvi climàtic, i la millora de la qualitat del sòl i l'aigua que percola [197].



**Figura 2.24.** Representació dels principals beneficis que pot aportar l'ús de biochar al medi ambient (Figura reproduïda amb permís de l'autor).

Per tal d'aprofundir en el tema de la captura i emmagatzematge de carboni, és necessari introduir la problemàtica ambiental que deriva d'un excés de  $\text{CO}_2$  a l'atmosfera.



El CO<sub>2</sub> es troba a l'atmosfera de manera natural, dins el cicle de carboni de la terra. Però des de que l'activitat humana ha començat a cremar combustibles fòssils a gran escala, aquest cicle en equilibri s'ha vist fortament pertorbat. Així, s'estima que aproximadament uns 8000-10000 milions de tones són d'origen antròpic, dels quals només uns 6000 milions són absorbits pel mar i la terra, i la resta es van acumulant a l'atmosfera any rere any [218-219]. El problema rau en que el CO<sub>2</sub> és un dels principals gasos que contribueixen a l'efecte hivernacle. És a dir, la seva presència a l'atmosfera provoca un alteració del balanç de radiació, que s'acaba traduint en una variació de la temperatura del planeta. Aquest fet provoca un sobreescalfament que posa en perill els ecosistemes existents i es tem que estigui produint canvis irreversibles [220]. Cal doncs una reducció de les emissions antropogèniques, a més d'estratègies de mitigació complementàries que permetin disminuir la quantitat excendent de CO<sub>2</sub> en l'atmosfera.

La combustió tradicional de biomassa allibera fins al 84 % del carboni a l'atmosfera aconseguint només un 3 % de residu sòlid carboni estable [221-222]. En canvi, si la biomassa és carbonitzada mitjançant processos de piròlisi, s'aconsegueix que un 50 % d'aquest carboni quedi en una forma de residu altament estable, el que es coneix com a segrest de carboni, mentre que l'altre 50 % s'allibera a l'atmosfera [223]. El carboni segrestat és introduït dins un altre cicle molt més lent i evita temporalment el seu pas a l'atmosfera. S'ha estimat que amb un ús de biochar a gran escala es podria arribar a compensar fins al 12 % de les emissions antropogèniques anuals de CO<sub>2</sub> [219].

La millora de la qualitat del sòl en afegir biochar és una tècnica ancestral ja practicada pel indígenes precolombins que habitaven la conca del riu Amazones [224-225]. L'any 1452, quan el conqueridor espanyol Francisco de Orellana explorava el riu *Negro* (afluent de l'Amazones) en busca de *El Dorado*, va observar unes societats precolombines sorprenentment molt desenvolupades, complexes i que practicaven algun tipus d'agricultura intensiva [226]. Però, contràriament al que s'ha cregut fins fa poc, les grans extensions de sòl prop del riu Amazones són poc fèrtils fins i tot emprant les tècniques més modernes d'agricultura. Cinc-cents anys més tard, concretament l'any 1960, W. Sombroek va descobrir la presència de bancals amb uns horitzons particularment ennegrits, que podien arribar a tenir fins a 7000 anys d'antiguitat [227]. Aquestes terres tan fèrtils, anomenades *terra preta de Índio* o terres negres de l'Amazones, contenen grans quantitats de carbó (fins al 9 % de contingut, molt allunyat del 0.5 % que presenten els sòls ordinaris dels voltants) i es consideren antropogèniques [227]. Per tant, el carbó

no solament proporciona el color característic a aquests sòls, sinó que també els proporciona una elevada fertilitat que ha perdurat fins al dia d'avui, 500 anys després de la desaparició dels indígenes [228-230].

Actualment, les raons subjacents a aquesta millora substancial de la qualitat dels sòls en afegir biochar han suscitat l'interès de nombrosos estudis [222-223, 231-234]. I és que, la seva aplicació provoca canvis en l'estructura del sòl (textura, porositat, distribució de mida de partícules i densitat) que repercuteixen en el seu comportament. D'altra banda, el biochar també és més estable que qualsevol altre tipus d'esmena aplicat al sòl. Es creu que l'estabilitat dels biochars dins el sòl pot arribar a ser de milers d'anys, tot i això, aquesta estimació es troba en constant debat [235-236]. La incorporació de biochar al sòl agrícola proporciona una sèrie de beneficis:

- Un augment de la fertilitat del sòl, que es tradueix en un increment del creixement de les plantes.
- Un augment de la CEC i de la conductivitat elèctrica. En conseqüència, presenten una elevada retenció de nutrients perquè n'impedeixen la lixiviació, superior a la que proporciona la matèria orgànica dels sòls, fems o adobs.
- Un augment de la capacitat de retenció d'aigua.
- La disposició d'un refugi per a microorganismes que són beneficiosos per als sòls, com els bacteris o els fongs.
- Un augment de la sorció de certs contaminants com metalls pesants, contaminants orgànics, etc. D'aquesta manera, s'espera que els contaminants quedin retinguts en el biochar i no es dispersin en altres compartiments ambientals (aquífers, aigües superficials, etc.).

Finalment, cal destacar que el biochar, apart d'emmagatzemar carboni, també és capaç de reduir les emissions de metà ( $\text{CH}_4$ ) i òxids de nitrogen ( $\text{NO}_x$ ) procedents del sòl [237]. Aquest fet és rellevant atès que la contribució d'aquests gasos a l'efecte hivernacle és superior a la del  $\text{CO}_2$  [238-239].

D'altra banda, cal tenir en compte que l'esmena de sòls amb biochar pot tenir alguns inconvenients. Així, alguns autors han descrit que l'addició de biochar al sòl pot promoure la proliferació de determinades espècies de microorganismes, produint una alteració en la composició de les colònies natives que habiten el sòl [197, 231]. A més, altres autors han observat que s'ha de tenir en compte la biomassa de partida del biochar, perquè podria

comportar la introducció al sòl de traces de contaminants com PAH, dioxines i furans [240-241]. En darrer terme, cal recordar que els efectes a llarg termini produïts per l'addició de biochar en els sòls encara no s'han esbrinat i caldran més estudis en aquesta línia els propers anys.

#### **2.8.4. Sorció de contaminants**

La presència de macroporus (>50 nm) en el biochar juga un paper clau en la retenció d'aigua i aire, facilita el moviment de les arrels a través del sòl i proporciona un habitat adequat per a diferents microorganismes. En canvi, la xarxa de microporus (<2 nm) i mesoporus (2-50 nm) existent, proporciona al material la possibilitat d'adsorbir contaminants de manera eficaç [242]. Així els darrers anys s'han dut a terme estudis centrats en avaluar les possibilitats que ofereix el biochar a l'hora de reduir la mobilitat de contaminants orgànics i inorgànics presents en el sòl.

Els primers treballs realitzats han demostrat que l'addició de biochar augmenta la retenció de pesticides i hidrocarburs aromàtics policíclics per part del sòls, disminuint així la seva biodisponibilitat, i reduint la transferència a plantes i altres organismes presents en el sòl [243-247]. Yu *et al.* [248] van observar que la sorció de l'herbicida Diuron d'un sòl esmenat amb biochar augmentava unes 125 vegades. Pel que fa als mecanismes de sorció involucrats, la sorció pot mostrar un comportament lineal o no lineal en funció de si té lloc en setis situats a la fracció no carbonitzada o carbonitzada, respectivament [205, 249].

En l'àmbit de la contaminació per metalls, Hua i Cao han posat de manifest la capacitat del biochar per tal de reduir la mobilitat de Cu(II), Zn(II), Cd(II), Pb(II) [250-252]. Malgrat això, altres resultats han demostrat la poca eficàcia que pot presentar la utilització de biochar en la remeiació de sòls contaminats amb As(III) o As (V) [253-254].

## Referències

1. Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ. Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. *Am J Phys Anthropol* **2010**, 143(1), 151-4.
2. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* **2010**, 1, 134.
3. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *J Invest Surg* **2012**, 25(2), 67-77.
4. García Sánchez JE, López R, Prieto J. *Antimicrobianos en medicina*. Barcelona: Sociedad Española de Quimioterapia; **1999**.
5. Food and Agriculture Organization (FAO). *Uso de Antimicrobianos en animales de consumo*, Errecalde, J.O., ed., <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5468s/y5468s00.pdf> (consulta: 1 febrer 2013); **2004**.
6. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* **2001**, 17(6), 431-7.
7. Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* **2001**, 32(3-4), 201-25.
8. Kools SA, Moltmann JF, Knacker T. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regul Toxicol Pharmacol* **2008**, 50(1), 59-65.
9. Harrison PF, Lederberg J. *Antimicrobial resistance: issues and options: workshop report (Antibiotic in use, M. Cohen)*. Washington, D.C.: National Academy Press; **1998**.
10. Stokstad ELR, Jukes TH, Pierce J, Page AC, Franklin AL. The multiple nature of the animal protein factor. *J Biol Chem* **1949**, 180(2), 647-54.
11. Stokstad ELR, Jukes TH. Further observations on the animal protein factor. *Proc Soc Exp Biol Med* **1950**, 73(3), 523-8.
12. Regulation (EC) No 1831/2003 on additives for use in animal nutrition, L 268; **2003**.
13. Jensen BB. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* **1998**, 7, 45-64.

14. Wise R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *J Antimicrob Chemother* **2002**, 49(4), 585-6.
15. Hamad B. The antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9(9), 675-6.
16. Animal Health Institute (AHI). Antibiotics in Livestock: Frequently Asked Questions, <<http://www.ahi.org/issues-advocacy/animal-antibiotics/antibiotics-in-livestock-frequently-asked-questions/>> (consulta: 1 febrer 2013); **2002**.
17. European Federation of Animal Health (FEDESA) - Antibiotic Use in Farm Animals does not threaten Human Health. FEDESA/FEFANA Press release. 13 July. Brussels, Belgium. **2001**.
18. Follet G. Antibiotic resistance in the EU - science, politics, and policy. *AgBioForum* **2000**, 3(2/3), 148-55.
19. Union of Concerned Scientists (UCS). European Union Bans Antibiotics for Growth Promotion. <[http://.ucsusa.org/food\\_and\\_agriculture/solutions/wise\\_antibiotics/european-union-bans.html](http://.ucsusa.org/food_and_agriculture/solutions/wise_antibiotics/european-union-bans.html)> (consulta: 1 febrer 2013); **2006**.
20. European Medicines Agency (EMA). "Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries (2005-2009)". <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2011/09/WC500112309.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2011/09/WC500112309.pdf)> (consulta: 1 febrer 2013); **2011**.
21. Food and Drug Administration (FDA). Department of Health and Human Services Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. <<http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM277657.pdf>> (consulta: 1 febrer 2013); **2010**.
22. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). "Datos de Ventas de Antimicrobianos en España en el año 2009" <[http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios/2011/docs/ventas-antimicrobianos\\_Espana-2009.pdf](http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios/2011/docs/ventas-antimicrobianos_Espana-2009.pdf)> (consulta: 1 febrer 2013); **2010**.
23. Food and Agriculture Organization (FAO). Fisheries Technical Paper 469: Responsible use of antibiotics, by Serrano, P.H., in Food and Agriculture Organization of the United Nations <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0282e/a0282e00.pdf>> (consulta: 1 febrer 2013); **2005**.
24. Daughton CG, Ternes TA. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* **1999**, 107 Suppl 6, 907-38.

25. Boxall AB, Kolpin DW, Halling-Sorensen B, Tolls J. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ Sci Technol* **2003**, 37(15), 286A-94A.
26. Crathorne B, Fielding M, Steel CP, Watts CD. Organic-compounds in water - analysis using coupled-column high-performance liquid-chromatography and soft-ionization mass-spectrometry. *Environ Sci Technol* **1984**, 18(10), 797-802.
27. Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, Jorgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere* **1998**, 36(2), 357-93.
28. Boxall AB, Fogg LA, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ, Croxford A. Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* **2004**, 180, 1-91.
29. Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indicators* **2008**, 8(1), 1-13.
30. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment -a review- part I. *Chemosphere* **2009**, 75(4), 417-34.
31. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment -a review- part II. *Chemosphere* **2009**, 75(4), 435-41.
32. Kim SC, Carlson K. Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environ Sci Technol* **2007**, 41(1), 50-7.
33. Baguer AJ, Jensen J, Krogh PH. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna. *Chemosphere* **2000**, 40(7), 751-7.
34. Alcock RE, Sweetman A, Jones KC. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: Selected compounds and physicochemical properties. *Chemosphere* **1999**, 38(10), 2247-62.
35. Elmund GK, Morrison SM, Grant DW, Nevins SM. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste. *Bul Environ Contam Toxicol* **1971**, 6(2), 129-32.
36. Berger K, Petersen B, Buningpfaue H. Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food-chain. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* **1986**, 37(4), 99-102.
37. Hektoen H, Berge JA, Hormazabal V, Yndestad M. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* **1995**, 133(3-4), 175-84.

38. Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology* **2002**, 266(3-4), 175-89.
39. Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* **2002**, 131(1-2), 5-17.
40. Stumpf M, Ternes TA, Wilken RD, Rodrigues SV, Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* **1999**, 225(1-2), 135-41.
41. Alexy R, Kummerer K. Antibiotics for Human Use, in *Organic pollutants in the water cycle: properties, occurrence, analysis and environmental relevance of polar compounds*. Thorsten Reemtsma MJ, editor. Weinheim, Chichester: Wiley-VCH; **2006**.
42. Golet EM, Alder AC, Giger W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* **2002**, 36(17), 3645-51.
43. Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci Total Environ* **2009**, 407(8), 2711-23.
44. Minh TB, Leung HW, Loi IH, Chan WH, So MK, Mao JQ, et al. Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Mar Pollut Bull* **2009**, 58(7), 1052-62.
45. Lindberg RH, Wennberg P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(10), 3421-9.
46. Kummerer K. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother* **2003**, 52(1), 5-7.
47. Ye ZQ, Weinberg HS, Meyer MT. Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **2007**, 79(3), 1135-44.
48. Velagaleti R, Burns PK, Gill M, Prothro J. Impact of current good manufacturing practices and emission regulations and guidances on the discharge of pharmaceutical chemicals into the environment from manufacturing, use, and disposal. *Environ Health Perspect* **2002**, 110(3), 213-20.

49. Thiele-Bruhn S, Beck IC. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* **2005**, 59(4), 457-65.
50. Schmitt H, van Beelen P, Tolls J, van Leeuwen CL. Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(4), 1148-53.
51. Martinez JL, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44(7), 1771-7.
52. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **1994**, 264(5157), 375-82.
53. Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci* **2009**, 276(1667), 2521-30.
54. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* **2011**, 14(3), 236-43.
55. Heuer H, Smalla K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ Microbiol* **2007**, 9(3), 657-66.
56. Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* **2001**, 3(1), 1-9.
57. Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ Int* **2003**, 28(7), 587-95.
58. Levy SB. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clin Infect Dis* **2001**, 33 Suppl 3, S124-9.
59. Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P, et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66(9), 3883-90.
60. Aarestrup FM, Wegener HC. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microb Infect* **1999**, 1(8), 639-44.
61. Isturiz RE, Carbon C. Antibiotic use in developing countries. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2000**, 21(6), 394-7.



62. Levy SB. The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **2002**, 49(1), 25-30.
63. WHO. " World Health Organization global strategy for containment of antimicrobial resistance". **2001**.
64. McArdell CS, Molnar E, Suter MJ, Giger W. Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ Sci Technol* **2003**, 37(24), 5479-86.
65. Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Cozzolino S, Casoria P, Gaudio L. Effects of sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L. and *Rumex acetosella* L.). *Agriculture Ecosystems & Environment* **1997**, 65(2), 163-8.
66. De Liguoro M, Cibir V, Capolongo F, Halling-Sorensen B, Montesissa C. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere* **2003**, 52(1), 203-12.
67. Giger W, Alder AC, Golet EM, Kohler HPE, McArdell CS, Molnar E, et al. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia* **2003**, 57(9), 485-91.
68. De Liguoro M, Poltronieri C, Capolongo F, Montesissa C. Use of sulfadimethoxine in intensive calf farming: evaluation of transfer to stable manure and soil. *Chemosphere* **2007**, 68(4), 671-6.
69. Boxall ABA. Fate of veterinary medicines applied to soils. *Pharmaceuticals in the environment: Sources, fate, effects and risk*. 3rd ed. Kummerer K, editor. Berlin: Springer; **2008**.
70. Kumar K, Gupta SC, Baidoo SK, Chander Y, Rosen CJ. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure. *J Environ Qual* **2005**, 34(6), 2082-5.
71. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. *Environmental organic chemistry*. New York: J. Wiley; **1993**.
72. Allen-King RM, Grathwohl P, Ball WP. New modeling paradigms for the sorption of hydrophobic organic chemicals to heterogeneous carbonaceous matter in soils, sediments, and rocks. *Advances in Water Resources* **2002**, 25(8-12), 985-1016.

73. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guideline for testing of chemicals - leaching in soil columns; Organization for Economic Cooperation and Development. **1999**.
74. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guideline for testing of chemicals. Test No. 106: Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method, France. **2000**.
75. Chiou CT. Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; **2002**.
76. Chiou CT, McGroddy SE, Kile DE. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ Sci Technol* **1998**, 32(2), 264-9.
77. Hunter CA. Quantifying intermolecular interactions: guidelines for the molecular recognition toolbox. *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, 43(40), 5310-24.
78. Vonoepen B, Kordel W, Klein W. Sorption of nonpolar and polar compounds to soils - processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD-guideline-106 *Chemosphere* **1991**, 22(3-4), 285-304.
79. McGaughey GB, Gagne M, Rappe AK. pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J Biol Chem* **1998**, 273(25), 15458-63.
80. Giles CH, Smith D, Huitson A. General treatment and classification of solute adsorption-isotherm. 1. Theoretical *J Colloid Interface Sci* **1974**, 47(3), 755-65.
81. Hinz C. Description of sorption data with isotherm equations *Geoderma* **2001**, 102(3-4), 405-6.
82. Essington ME. *Soil and Water chemistry. An integrative Approach*. CRC Press, New York **2004**.
83. Atkins PW. *Physical chemistry*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; **1990**.
84. Lutzhoft HCH, Halling-Sorensen B, Jorgensen SE. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Arch Environ Contam Toxicol* **1999**, 36(1), 1-6.
85. Halling-Sorensen B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* **2000**, 40(7), 731-9.
86. Fernandez C, Alonso C, Babin MM, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. *Sci Total Environ* **2004**, 323(1-3), 63-9.

87. Westergaard K, Muller AK, Christensen S, Bloem J, Sorensen SJ. Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community. *Soil Biology & Biochemistry* **2001**, 33(15), 2061-71.
88. Sommer C, Bibby BM. The influence of veterinary medicines on the decomposition of dung organic matter in soil. *European Journal of Soil Biology* **2002**, 38(2), 155-9.
89. Wollenberger L, Halling-Sorensen B, Kusk KO. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* **2000**, 40(7), 723-30.
90. Boleas S, Alonso C, Pro J, Babin MM, Fernandez C, Carbonell G, et al. Effects of sulfachlorpyridazine in MS.3-arable land: a multispecies soil system for assessing the environmental fate and effects of veterinary medicines. *Environ Toxicol Chem* **2005**, 24(4), 811-9.
91. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use, L 311 (**2001**), 1-62.
92. Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products., L 311 (**2001**), 62.
93. 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, L 327 (**2000**), 72.
94. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, L 348 (**2008**), 14.
95. International Cooperation on Harmonisation of Technical requirements for Approval of Veterinary Medicinal Products (VICH). Environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products (VMPS) - PHASE I. VICH GL 6, EPI **2000**.
96. International Cooperation on Harmonisation of Technical requirements for Approval of Veterinary Medicinal Products (VICH). Environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products (VMPS) - PHASE II. VICH GL 38, EPI **2004**.
97. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). Revised guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the

- VICH guidelines GL6 and GL38. Doc. Ref. EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1. **2008**.
98. Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* **2006**, 69(2), 334-42.
  99. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. 2nd ed ed. New York: Springer-Verlag; **2004**.
  100. Grung M, Kallqvist T, Sakshaug S, Skurtveit S, Thomas KV. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicol Environ Saf* **2008**, 71(2), 328-40.
  101. Hermens J, Balaz S, Damborsky J, Karcher W, Muller M, Peijnenburg W, et al. Assessment of QSARS for Predicting Fate and Effects of Chemicals in the Environment: An International European Project. *SAR QSAR Environ Res* **1995**, 3(3), 223-36.
  102. Zhanel GG, Homenuik K, Nichol K, Noreddin A, Vercaigne L, Embil J, et al. The glycylicyclines - A comparative review with the tetracyclines. *Drugs* **2004**, 64(1), 63-88.
  103. Babić S, Horvat AJM, Mutavdžić Pavlović D, Kaštelan-Macan M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC, Trends Anal Chem* **2007**, 26(11), 1043-61.
  104. Qiang Z, Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* **2004**, 38(12), 2874-90.
  105. Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **2003**, 166(2), 145-67.
  106. Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A* **2000**, 882(1-2), 109-33.
  107. Chen Y, Hu C, Qu J, Yang M. Photodegradation of tetracycline and formation of reactive oxygen species in aqueous tetracycline solution under simulated sunlight irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2008**, 197(1), 81-7.

108. Mitscher LA. The chemistry of the tetracycline antibiotics. New York: M. Dekker; **1978**.
109. Winckler C, Grafe A. Use of veterinary drugs in intensive animal production; evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *J Soils Sed* **2001**, 1(2), 66-70.
110. Hu XG, Luo Y, Zhou QX, Xu L. Determination of Thirteen Antibiotics Residues in Manure by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2008**, 36(9), 1162-6.
111. Hamscher G, Pawelzick HT, Hoper H, Nau H. Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ Toxicol Chem* **2005**, 24(4), 861-8.
112. Blackwell PA, Kay P, Ashauer R, Boxall AB. Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils. *Chemosphere* **2009**, 75(1), 13-9.
113. Jacobsen P, Berglind L. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms. *Aquaculture* **1988**, 70(4), 365-70.
114. Li D, Yang M, Hu J, Ren L, Zhang Y, Li K. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river. *Environ Toxicol Chem* **2008**, 27(1), 80-6.
115. Boxall AB, Fogg LA, Baird DJ, Lewis C, Telfer TC, Kolpin D. Targeted monitoring study for veterinary medicines in the environment: UK Environmental Agency. **2005**.
116. Winckler C, Grafe A. Stoffeintrag durch Tierarzneimittel und pharmakologisch wirksame Futterzusatzstoffe unter besonderer Berücksichtigung von Tetrazyklinen. **2000**.
117. Halling-Sorensen B, Jacobsen AM, Jensen J, Sengelov G, Vaclavik E, Ingerslev F. Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: A field-scale study in southern Denmark. *Environ Toxicol Chem* **2005**, 24(4), 802-10.
118. Aust MO, Godlinski F, Travis GR, Hao X, McAllister TA, Leinweber P, et al. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ Pollut* **2008**, 156(3), 1243-51.
119. Zhang DD, Lin LF, Luo ZX, Yan CZ, Zhang X. Occurrence of selected antibiotics in Jiulongjiang River in various seasons, South China. *J Environ Monit* **2011**, 13(7), 1953-60.

120. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* **2002**, 36(6), 1202-11.
121. Hamscher G, Mohring SAI. Veterinary Drugs in Soil and in the Aquatic Environment. *Chem Ing Tech* **2012**, 84(7), 1052-61.
122. Campagnolo ER, Johnson KR, Karpati A, Rubin CS, Kolpin DW, Meyer MT, et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Sci Total Environ* **2002**, 299(1-3), 89-95.
123. Ben W, Qiang Z, Adams C, Zhang H, Chen L. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **2008**, 1202(2), 173-80.
124. Kay P, Blackwell PA, Boxall ABA. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere* **2005**, 59(7), 951-9.
125. Trefouel J, Nitti F, Bovet D. The activity of p-aminophenylsulfamide on experimental streptococcus infections of the mouse and the rabbit. *C R Seances Soc Biol Fil* **1935**, 120, 756-8.
126. Woods DD. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphaniilamide. *Br J Exp Pathol* **1940**, 21(2), 74-90.
127. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios Database (AEMPS). <<http://aemps.gob.es/medicamentosVeterinarios/portada/home.htm>> (consulta: 1 febrer 2013); **2012**.
128. International Veterinary Information Service (IVIS). Proceedings of the 17th American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics Biennial Symposium, "Evaluation of polymorphisms in the sulfonamide detoxification genes CYB5A and CYB5R3 in dogs with sulfonamide hypersensitivity". **2011**.
129. Merck. Merck Research Laboratories. The Merck manual of diagnosis and therapy. 18th ed. Whitehouse Station, N.J. London: Merck, Elsevier Health Sciences; 2006.
130. Lin CE, Chang CC, Lin WC. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. 3. Citrate buffer as a background electrolyte. *J Chromatogr A* **1997**, 768(1), 105-12.

131. Sakurai H, Ishimitsu T. Microionization constants of sulphonamides. *Talanta* **1980**, 27(3), 293-8.
132. Carda-Broch S, Berthod A. Countercurrent chromatography for the measurement of the hydrophobicity of sulfonamide amphoteric compounds. *Chromatographia* **2004**, 59(1-2), 79-87.
133. Stoob K, Singer HP, Stettler S, Hartmann N, Mueller SR, Stamm CH. Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction. *J Chromatogr A* **2006**, 1128(1-2), 1-9.
134. Halling-Sorensen B, Jensen J, Tjornelund J, Montforts M. Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture. Kummerer K, editor; **2001**.
135. Boxall ABA, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, Tolls J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol Lett* **2002**, 131(1-2), 19-28.
136. Renner R. Do cattle growth hormones pose an environmental risk? *Environ Sci Technol* **2002**, 36(9), 194A-7A.
137. Höper H, Kues H, Nau H, Hamscher G. Eintrag und Verbleib von Tierarzneimittelwirkstoffen in Böden. *Bodenschutz* **2002**, 4, 141-8.
138. Li YW, Wu XL, Mo CH, Tai YP, Huang XP, Xiang L. Investigation of Sulfonamide, Tetracycline, and Quinolone Antibiotics in Vegetable Farmland Soil in the Pearl River Delta Area, Southern China. *J Agric Food Chem* **2011**, 59(13), 7268-76.
139. Watanabe N, Bergamaschi BA, Loftin KA, Meyer MT, Harter T. Use and Environmental Occurrence of Antibiotics in Freestall Dairy Farms with Manured Forage Fields. *Environ Sci Technol* **2010**, 44(17), 6591-600.
140. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **1999**, 225(1-2), 109-18.
141. Batt AL, Kostich MS, Lazorchak JM. Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Anal Chem* **2008**, 80(13), 5021-30.
142. Batt AL, Snow DD, Aga DS. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* **2006**, 64(11), 1963-71.

143. Porta i Casanellas J, López-Acevedo Reguerín M, Roquero de Laburu C. Edafología: para la agricultura y el medio ambiente. Madrid: Mundi-Prensa; **1994**.
144. Evangelou VP. Environmental soil chemistry: principles and applications. New York [etc.]: John Wiley & Sons; **1998**.
145. Rodríguez CJ, Carriazo J, Corredor P, Molina R, Moreno S. synthesis of polyaniline/clay microcomposite materials: characterization and assessment of its activity as anticorrosive agents. *Revista Colombiana de Química* **2008**, 37(3), 337-53.
146. Sposito G. The Surface Chemistry of Soils. Oxford Univ Press, New York; **1984**.
147. United States Department of Agriculture (USDA), Soil profile. <<http://soils.usda.gov/education/resources/lessons/profile/>> (consulta: 1 febrer 2013).
148. Karickhoff SW, Brown DS, Scott TA. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res* **1979**, 13(3), 241-8.
149. Chiou CT, Peters LJ, Freed VH. A physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds. *Science* **1979**, 206(4420), 831-2.
150. Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ Sci Technol* **2001**, 35(17), 3397-406.
151. Loke ML, Tjornelund J, Halling-Sorensen B. Determination of the distribution coefficient ( $\log K_d$ ) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure. *Chemosphere* **2002**, 48(3), 351-61.
152. Gu C, Karthikeyan KG, Sibley SD, Pedersen JA. Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere* **2007**, 66(8), 1494-501.
153. Gu C, Karthikeyan KG. Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *J Environ Qual* **2008**, 37(2), 704-11.
154. Sithole BB, Guy RD. Models for tetracycline in aquatic environments. 2. Interaction with humic substances. *Water Air and Soil Pollution* **1987**, 32(3-4), 315-21.
155. MacKay AA, Canterbury B. Oxytetracycline sorption to organic matter by metal-bridging. *J Environ Qual* **2005**, 34(6), 1964-71.
156. Avisar D, Primor O, Gozlan I, Mamane H. Sorption of Sulfonamides and Tetracyclines to Montmorillonite Clay. *Water Air and Soil Pollution* **2010**, 209(1-4), 439-50.



157. Figueroa RA, Leonard A, MacKay AA. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(2), 476-83.
158. Kulshrestha P, Giese RF, Jr., Aga DS. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(15), 4097-105.
159. Li Z, Chang PH, Jean JS, Jiang WT, Wang CJ. Interaction between tetracycline and smectite in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* **2010**, 341(2), 311-9.
160. Wang J, Hu J, Zhang S. Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater. *J Colloid Interface Sci* **2010**, 349(2), 578-82.
161. Zhao Y, Geng J, Wang X, Gu X, Gao S. Tetracycline adsorption on kaolinite: pH, metal cations and humic acid effects. *Ecotoxicology* **2011**, 20(5), 1141-7.
162. Parolo ME, Savini MC, Valles JM, Baschini MT, Avena MJ. Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. *Applied Clay Science* **2008**, 40(1-4), 179-86.
163. Parolo ME, Avena MJ, Pettinari GR, Baschini MT. Influence of Ca<sup>2+</sup> on tetracycline adsorption on montmorillonite. *J Colloid Interface Sci* **2012**, 368(1), 420-6.
164. Gu C, Karthikeyan KG. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(23), 9166-73.
165. Tanis E, Hanna K, Emmanuel E. Experimental and modeling studies of sorption of tetracycline onto iron oxides-coated quartz. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, 327(1-3), 57-63.
166. Pils JR, Laird DA. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. *Environ Sci Technol* **2007**, 41(6), 1928-33.
167. Rabolle M, Spliid NH. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* **2000**, 40(7), 715-22.
168. ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environ Toxicol Chem* **2006**, 25(4), 904-11.
169. Kwon J-W. Mobility of Veterinary Drugs in Soil with Application of Manure Compost. *Bull Environ Contam Toxicol* **2011**, 87(1), 40-4.

170. Jones AD, Bruland GL, Agrawal SG, Vasudevan D. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environ Toxicol Chem* **2005**, 24(4), 761-70.
171. ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J. Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties. *Environ Toxicol Chem* **2006**, 25(4), 933-41.
172. Figueroa-Diva RA, Vasudevan D, MacKay AA. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere* **2010**, 79(8), 786-93.
173. Sassman SA, Lee LS. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(19), 7452-9.
174. Bao Y, Zhou Q, Wang Y. Adsorption characteristics of tetracycline by two soils: assessing role of soil organic matter. *Aust J Soil Res* **2009**, 47(3), 286-95.
175. Li LL, Huang LD, Chung RS, Fok KH, Zhang YS. Sorption and Dissipation of Tetracyclines in Soils and Compost. *Pedosphere* **2010**, 20(6), 807-16.
176. Kong W, Li C, Dolhi JM, Li S, He J, Qiao M. Characteristics of oxytetracycline sorption and potential bioavailability in soils with various physical-chemical properties. *Chemosphere* **2012**, 87(5), 542-8.
177. Gong W, Liu X, He H, Wang L, Dai G. Quantitatively modeling soil-water distribution coefficients of three antibiotics using soil physicochemical properties. *Chemosphere* **2012**, 89(7), 825-31.
178. Thiele S. Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess Chernozem. *J Plant Nutr Soil Sci* **2000**, 163(6), 589-94.
179. Thiele-Bruhn S, Aust MO. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Arch Environ Contam Toxicol* **2004**, 47(1), 31-9.
180. Kurwadkar ST, Adams CD, Meyer MT, Kolpin DW. Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *J Agric Food Chem* **2007**, 55(4), 1370-6.
181. Stoob K, Singer HP, Mueller SR, Schwarzenbach RP, Stamm CH. Dissipation and transport of veterinary sulfonamide antibiotics after manure application to grassland in a small catchment. *Environ Sci Technol* **2007**, 41(21), 7349-55.
182. Forster M, Laabs V, Lamshoft M, Groeneweg J, Zuhlke S, Spiteller M, et al. Sequestration of manure-applied sulfadiazine residues in soils. *Environ Sci Technol* **2009**, 43(6), 1824-30.

183. Kahle M, Stamm C. Sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to organic materials of different origin. *Environ Sci Technol* **2007**, 41(1), 132-8.
184. Richter MK, Sander M, Krauss M, Christl I, Dahinden MG, Schneider MK, et al. Cation Binding of Antimicrobial Sulfathiazole to Leonardite Humic Acid. *Environ Sci Technol* **2009**, 43(17), 6632-8.
185. Bialk HM, Simpson AJ, Pedersen JA. Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(12), 4463-73.
186. Bialk HM, Pedersen JA. NMR investigation of enzymatic coupling of sulfonamide antimicrobials with humic substances. *Environ Sci Technol* **2008**, 42(1), 106-12.
187. Thiele-Bruhn S, Seibicke T, Schulten HR, Leinweber P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J Environ Qual* **2004**, 33(4), 1331-42.
188. Gao JA, Pedersen JA. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(24), 9509-16.
189. Kahle M, Stamm C. Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere* **2007**, 68(7), 1224-31.
190. Lertpaitoonpan W, Ong SK, Moorman TB. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* **2009**, 76(4), 558-64.
191. Białk-Bielińska A, Maszkowska J, Mroziak W, Bielawska A, Kołodziejaska M, Palavinskas R, et al. Sulfadimethoxine and sulfaguanidine: Their sorption potential on natural soils. *Chemosphere* **2012**, 86(10), 1059-65.
192. Davis JG, Truman CC, Kim SC, Ascough JC, 2nd, Carlson K. Antibiotic Transport via Runoff and Soil Loss. *J Environ Qual* **2006**, 35(6), 2250-60.
193. Langhammer JP. Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Bonn: Univ. of Bonn; **1989**.
194. Drillia P, Stamatelatos K, Lyberatos G. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere* **2005**, 60(8), 1034-44.
195. Goldberg ED. Black carbon in the environment: properties and distribution. New York: J. Wiley; **1985**.
196. International Biochar Initiative (IBI). <<http://www.biochar-international.org/biochar>> (consulta: 1 febrer 2013).

197. Lehmann J, Joseph S. Biochar for environmental management: science and technology. London; Sterling, VA: Earthscan; **2009**.
198. Whitman T, Lehmann J. Biochar-One way forward for soil carbon in offset mechanisms in Africa? *Environmental Science & Policy* **2009**, 12(7), 1024-7.
199. Meyer S, Glaser B, Quicker P. Technical, economical, and climate-related aspects of biochar production technologies: a literature review. *Environ Sci Technol* **2011**, 45(22), 9473-83.
200. Sohi S, Lopez-Capel E, Krull E, Bol R. Biochar, climate change and soil: A review to guide future research. CSIRO land and Water Science report 05/09 <<http://www.csiro.au/Outcomes/Environment/Australian-Landscapes/Biochar-climate-change-and-soil.aspx>> (consulta: 1 febrer 2013); **2009**.
201. Biochar Farms. Resources for sustainable use of biochar in agriculture. <[http://biocharfarms.org/biochar\\_production\\_energy/](http://biocharfarms.org/biochar_production_energy/)> (consulta: 1 febrer 2013).
202. Lua AC, Guo J. Microporous oil-palm-shell activated carbon prepared by physical activation for gas-phase adsorption. *Langmuir* **2001**, 17(22), 7112-7.
203. Tomaszewski JE, Werner D, Luthy RG. Activated carbon amendment as a treatment for residual DDT in sediment from a superfund site in San Francisco Bay, Richmond, California, USA. *Environ Toxicol Chem* **2007**, 26(10), 2143-50.
204. Demirbas A. Effects of temperature and particle size on bio-char yield from pyrolysis of agricultural residues. *J Anal Appl Pyrolysis* **2004**, 72(2), 243-8.
205. Chun Y, Sheng GY, Chiou CT, Xing BS. Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(17), 4649-55.
206. Keiluweit M, Nico PS, Johnson MG, Kleber M. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environ Sci Technol* **2010**, 44(4), 1247-53.
207. Schmidt MWI, Noack AG. Black carbon in soils and sediments: Analysis, distribution, implications, and current challenges. *Global Biogeochem Cycles* **2000**, 14(3), 777-93.
208. Qadeer R, Hanif J, Saleem M, Afzal M. Characterization of activated-charcoal. *J Chem Soc Pak* **1994**, 16(4), 229-35.
209. Mochidzuki K, Soutric F, Tadokoro K, Antal MJ, Toth M, Zelei B, et al. Electrical and physical properties of carbonized charcoals. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2003**, 42(21), 5140-51.

210. Puri BR. Chemistry and physics of carbon. New York: M. Dekker 1970.
211. Leon y Leon CA, Radovic LR. Chemistry and physics of carbon. New York: M. Dekker **1992**.
212. Kuhlbusch TA. Method for determining black carbon in residues of vegetation fires. *Environ Sci Technol* **1995**, 29(10), 2695-702.
213. Brennan JK, Bandosz TJ, Thomson KT, Gubbins KE. Water in porous carbons. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2001**, 187, 539-68.
214. Bourke J, Manley-Harris M, Fushimi C, Dowaki K, Nunoura T, Antal MJ, Jr. Do all carbonized charcoals have the same chemical structure? 2. A model of the chemical structure of carbonized Charcoal. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2007**, 46(18), 5954-67.
215. Amonette JE, Joseph S. Characteristics of Biochar: microchemical properties, Biochar for environmental management: science and technology. London; Sterling, VA: Earthscan; **2009**.
216. Radovic LR, Moreno-Castilla C, Rivera-Utrilla J. Carbon materials as adsorbents in aqueous solutions. In: Radovic LR, editor. *Chemistry and Physics of Carbon*, Vol 27 **2001**. p. 227-405.
217. Zhu D, Kwon S, Pignatello JJ. Adsorption of single-ring organic compounds to wood charcoals prepared under different thermochemical conditions. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(11), 3990-8.
218. Kleiner K. The bright prospect of biochar. <<http://www.nature.com/climate/2009/0906/full/climate.2009.48.html>> (consulta: 1 febrer 2013); **2009**.
219. Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nat Commun* **2010**, 1(5), 1-9.
220. Solomon S, Plattner G-K, Knutti R, Friedlingstein P. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**, 106(6), 1704-9.
221. Hughes RF, Kauffman JB, Cummings DL. Fire in the Brazilian Amazon 3. Dynamics of biomass, C, and nutrient pools in regenerating forests. *Oecologia* **2000**, 124(4), 574-88.

- 
222. Glaser B, Lehmann J, Zech W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - a review. *Biol Fertility Soils* **2002**, 35(4), 219-30.
223. Lehmann J, Gaunt J, Rondon M. Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems - a review. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* **2006**, 11(2), 403-27.
224. Mann CC. 1491: new revelations of the Americas before Columbus. 1st ed. New York: Knopf; **2005**.
225. Mann CC. Ancient earthmovers of the Amazon. *Science* **2008**, 321(5893), 1148-52.
226. Petersen JB, Neves E, Heckenberger MJ. Gift from the past: Terra preta and prehistoric amerindian occupation in Amazonia. London: The British Museum press: Unknown Amazon: Culture in nature in ancient Brazil; **2001**.
227. Marris E. Putting the carbon back: Black is the new green. *Nature* **2006**, 442(7103), 624-6.
228. Lehmann J, Rondon M. Bio-char soil management on highly weathered soils in the humid tropics. *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems* **2006**, 113, 517-30.
229. Woods WI. Amazonian dark earths: Wim Sombroek's vision. Dordrecht; London: Springer; **2009**.
230. Glaser B, Haumaier L, Guggenberger G, Zech W. The 'Terra Preta' phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften* **2001**, 88(1), 37-41.
231. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology & Biochemistry* **2011**, 43(9), 1812-36.
232. Atkinson CJ, Fitzgerald JD, Hipps NA. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant Soil* **2010**, 337(1-2), 1-18.
233. Novak JM, Busscher WJ, Laird DL, Ahmedna M, Watts DW, Niandou MAS. Impact of Biochar Amendment on Fertility of a Southeastern Coastal Plain Soil. *Soil Science* **2009**, 174(2), 105-12.
234. Lehmann J, da Silva JP, Steiner C, Nehls T, Zech W, Glaser B. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant Soil* **2003**, 249(2), 343-57.

235. Shindo H. Elementary composition, humus composition and decomposition in soil of charred grassland plants. *Soil Sci Plant Nutr* **1991**, 37(4), 651-7.
236. Bird MI, Moyo C, Veenendaal EM, Lloyd J, Frost P. Stability of elemental carbon in a savanna soil. *Global Biogeochem Cycles* **1999**, 13(4), 923-32.
237. Lehmann J. Bio-energy in the black. *Front Ecol Environ* **2007**, 5(7), 381-7.
238. Shindell DT, Faluvegi G, Koch DM, Schmidt GA, Unger N, Bauer SE. Improved Attribution of Climate Forcing to Emissions. *Science* **2009**, 326(5953), 716-8.
239. Sanderson K. Aerosols make methane more potent. <<http://www.nature.com/news/2009/091029/full/news.2009.1049.html#B1>> (consulta: 1 febrer 2013); **2009**.
240. Hale SE, Lehmann J, Rutherford D, Zimmerman AR, Bachmann RT, Shitumbanuma V, et al. Quantifying the total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons and dioxins in biochars. *Environ Sci Technol* **2012**, 46(5), 2830-8.
241. Stanmore BR. The formation of dioxins in combustion systems. *Combust Flame* **2004**, 136(3), 398-427.
242. Downie A, Crosky A, Munroe P. Physical properties of Biochar, Biochar for environmental management: science and technology. London; Sterling, VA: Earthscan; **2009**.
243. Yu XY, Ying GG, Kookana RS. Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil. *Chemosphere* **2009**, 76(5), 665-71.
244. Yang X-B, Ying G-G, Peng P-A, Wang L, Zhao J-L, Zhang L-J, et al. Influence of Biochars on Plant Uptake and Dissipation of Two Pesticides in an Agricultural Soil. *J Agric Food Chem* **2010**, 58(13), 7915-21.
245. Yang YN, Sheng GY, Huang MS. Bioavailability of diuron in soil containing wheat-straw-derived char. *Sci Total Environ* **2006**, 354(2-3), 170-8.
246. Gomez-Eyles JL, Sizmur T, Collins CD, Hodson ME. Effects of biochar and the earthworm *Eisenia fetida* on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements. *Environ Pollut* **2011**, 159(2), 616-22.
247. Zheng W, Guo M, Chow T, Bennett DN, Rajagopalan N. Sorption properties of greenwaste biochar for two triazine pesticides. *J Hazard Mater* **2010**, 181(1-3), 121-6.
248. Yu XY, Ying GG, Kookana RS. Sorption and desorption behaviors of diuron in soils amended with charcoal. *J Agric Food Chem* **2006**, 54(22), 8545-50.

249. Chen BL, Zhou DD, Zhu LZ. Transitional adsorption and partition of nonpolar and polar aromatic contaminants by biochars of pine needles with different pyrolytic temperatures. *Environ Sci Technol* **2008**, 42(14), 5137-43.
250. Cao X, Ma L, Gao B, Harris W. Dairy-manure derived biochar effectively sorbs lead and atrazine. *Environ Sci Technol* **2009**, 43(9), 3285-91.
251. Cao X, Ma L, Liang Y, Gao B, Harris W. Simultaneous immobilization of lead and atrazine in contaminated soils using dairy-manure biochar. *Environ Sci Technol* **2011**, 45(11), 4884-9.
252. Hua L, Wu W, Liu Y, McBride MB, Chen Y. Reduction of nitrogen loss and Cu and Zn mobility during sludge composting with bamboo charcoal amendment. *Environ Sci Pollut Res Int* **2009**, 16(1), 1-9.
253. Hartley W, Dickinson NM, Riby P, Lepp NW. Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environ Pollut* **2009**, 157(10), 2654-62.
254. Beesley L, Moreno-Jimenez E, Gomez-Eyles JL. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ Pollut* **2010**, 158(6), 2282-7.





**PART EXPERIMENTAL**

---

*Capítol 3*



## 3.1. Instrumentació

### 3.1.1. Cromatografia de líquids

Per a la determinació dels compostos estudiats en aquest treball s'ha utilitzat un cromatògraf de líquids Agilent Series 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, EUA). Aquest equip consta de cabina de dissolvents, desgassificador de buit, bomba quaternària, injector automàtic, i detectors d'absorció UV-Vis i fluorescència (FL).

El detector de sèrie de díodes (DAD) utilitzat combina una làmpada de descàrrega d'arc de deuteri per a la zona UV de l'espectre amb una de tungstè per a la regió del visible i infraroig proper (NIR). La combinació d'ambdues làmpades permet treballar a longituds d'ona compreses entre 190 i 950 nm. Aquest detector té un sistema d'esclatxa d'entrada variable d'1 a 16 nm per a l'optimització de la sensibilitat, linealitat i resolució espectral.

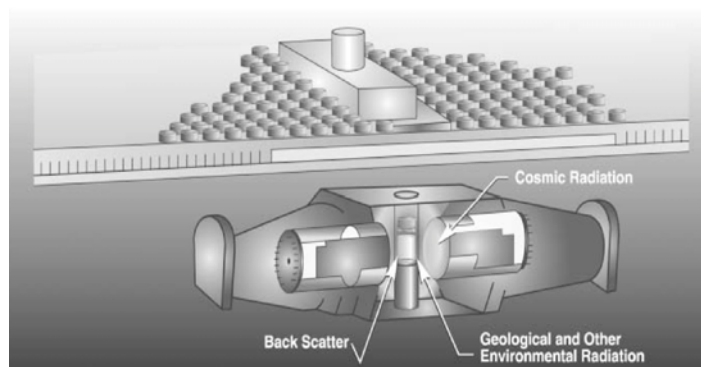
El cromatògraf també incorpora un detector de FL que consisteix en una làmpada de descàrrega de xenó de 150 W. Un flash de 3 µs produeix un espectre continu de llum que permet treballar en un interval de longituds d'ona entre 200 i 900 nm. Aquest detector presenta dos monocromadors (un d'excitació i un d'emissió), amb unes xarxes hologràfiques còncaues de 1200 línies per mm. L'amplada de banda de la llum emesa és de 20 nm. El detector corregeix les fluctuacions d'intensitat de la làmpada mitjançant un díode de referència que mesura la llum d'excitació transmesa per la cel·la de flux. El detector de FL permet l'adquisició de l'espectre d'excitació o d'emissió a temps real i la detecció simultània de senyals corresponents a diverses longituds d'ona.

El sistema cromatogràfic es controla mitjançant el programari *Agilent Chemstation for LC-systems<sup>TM</sup>* que permet el tractament de les dades obtingudes.

### 3.1.2. Espectrometria d'escintil·lació líquida

En alguns experiments de sorció de sulfametazina (SMT), s'ha utilitzat un comptador d'escintil·lació líquida TRI-CARB 2900TR (Perkin-Elmer, Downers Grove, IL, EUA). Es tracta d'un equip optimitzat per a la mesura de nivells d'activitat baixos, que minimitza el soroll de fons i garanteix l'estabilitat de la resposta de l'instrument durant temps llargs. L'equip consisteix en un porta-mostres bidireccional, un parell de tubs fotomultiplicadors i un analitzador multicanal.

Els tubs fotomultiplicadors, es troben enfrontats i equidistants al vial que conté la mostra (Figura 3.1). Aquesta disposició permet discriminar els fotons emesos per la mostra dels de la radiació de fons.



**Figura 3.1.** Esquema del detector incorporat al TRI-CARB 2900TR, on es mostren la cambra de comptatge, els dos tubs fotomultiplicadors i el vial que conté la mostra (Figura extreta del manual de l'equip) [1].

L'analitzador multicanal presenta una resolució efectiva de fins a 0.1 keV, amb un ampli interval dinàmic d'esmoreïment i permet treballar en l'interval d'energia comprès entre 0 – 2000 keV.

El comptador mesura i corregeix automàticament l'esmoreïment de les mostres a partir del paràmetre tSIE (índex espectral transformat de la font externa, *transformed Spectral Index of External standard*) a partir d'una font de  $^{133}\text{Ba}$  que incorpora. Totes aquestes funcions es controlen mitjançant el programari *QuantaSmart™*.

### 3.1.3. Altres instruments i equips

- Agitadors rotatoris Breda 34526 i SBS MRH-4 (Breda Scientific, Breda, Països Baixos) que proporcionen velocitats compreses entre 0.5 i 100 rpm.
- Agitador de rodets Ovan *RollerMix*, D RM120-D E (Ovan, Barcelona) que consta de 5 corrons que permeten l'agitació horitzontal rotatòria a velocitats compreses entre 20 i 150 rpm.
- Divisor *Micro riffle* de Jones® (Sepor Inc., CA, USA). Aquest model d'acer inoxidable està dissenyat per fraccionar petites quantitats de sòl (25 g – 1 kg) i

presenta 14 canals alternats de 3.2 mm d'amplada que distribueixen la mostra de forma homogènia en dos recipients.

- Estufa refrigerada Medilow (JP Selecta, Abrera, Barcelona) que permet treballar entre 0 – 50 °C.
- Estufa Conterm (JP Selecta, Abrera, Barcelona) que permet treballar entre 40 – 250 °C.
- Centrifugadora Heareus Christ Labofuge 400 (Heareus Christ, Osterode am Harz, Alemanya) que permet treballar fins a 3500 rpm.
- pH-metre Crison GLP21 (Crison Instruments, Alella, Barcelona), equipat amb un elèctrode combinat de vidre Crison 52-02 amb un sistema de referència Ag/AgCl. Té una precisió de  $\pm 0.01$  unitats de pH.
- Mesclador vòrtex Stuart<sup>®</sup> SA8 (Barloworld Scientific Ltd., Staffordshire, UK) amb control de velocitat variable entre 200 i 2500 rpm. Permet l'agitació en mode continu o intermitent.
- Bany d'ultrasons Branson 5510 (Branson Ultrasonidos, Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Treballa a una freqüència de 40 kHz i té un tanc de 10 L de capacitat.

## 3.2. Reactius, dissolucions i materials

### 3.2.1. Reactius

Clorhidrats d'oxitetraciclina (OTC, CAS 2058-46), tetraciclina (TC, CAS 64-75-5) i clortetraciclina (CTC, CAS 64-72-2) de qualitat Vetranal subministrats per Riedel-de-Haën (Seelze, Alemanya). Doxiciclina (DC, CAS 24390-14-5) de puresa  $\geq 98$  % subministrada per Fluka (Buchs, Suïssa). Les dissolucions mare de 250 mg L<sup>-1</sup> s'han preparat en CaCl<sub>2</sub> 10 mM i s'han guardat en matrassos de vidre de color topazi. Aquestes s'han conservat un màxim de 15 dies a 4 °C. Les dissolucions més diluïdes s'han preparat diàriament per dilució de la dissolució mare amb CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

SMT (CAS 57-68-1) de puresa  $\geq 99$  %, subministrada per Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Les dissolucions mare de SMT, de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , s'han preparat en medi aquós contenint un 4 % de metanol (MeOH). Les solucions s'han emmagatzemat a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  en flascons de vidre de color topazi i s'han utilitzat durant un període màxim de 2 setmanes des de la seva preparació. Les dissolucions més diluïdes s'han preparat diàriament per dilució de la solució mare amb  $\text{CaCl}_2$  10 mM i  $\text{NaN}_3$  1.5 mM. També s'han preparat dissolucions de  $10 \text{ g L}^{-1}$  en MeOH, amb l'ajuda d'ultrasons. Fluorescamina ( $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich), subministrada per Fluka, s'ha emprat com a agent derivatitzant. Sulfametoxidiazina (Sigma-Aldrich) s'ha emprat com a patró intern.

SMT amb el grup fenil marcat isotòpicament (Sulfametazina [anell-fenil- $^{14}\text{C}$ (U)], ARC: 3065), amb una activitat específica de  $8.2 \text{ mCi mmol}^{-1}$  ( $0.30 \text{ GBq mmol}^{-1}$ ) i subministrada per American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO, EUA). El reactiu comercial està dissolt en MeOH i té una concentració de  $0.1 \text{ mCi mL}^{-1}$ . El cocktail d'escintil·lació líquida emprat ha estat l'Opti-Fluor (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, EUA).

Àcid aminobenzoic (CAS 150-13-0,  $\geq 99$  %), 2-acetamido-4,6-dimetilpirimidina (CAS 15-74-2,  $\geq 99$  %), 2,4-dinitrotoluenè (CAS 121-14-2,  $> 97$  %), anilina (CAS 62-53-3,  $\geq 99$  %), metansulfonamida (CAS 3144-09-0,  $\geq 97.0$  %), clorur de tetrametilamoni (CAS 75-57-0,  $\geq 99.0$  %), etanolamina (CAS 141-43-5,  $\geq 99$  %) i clorur de trimetilfenilamoni (CAS 138-24-9,  $\geq 98$  %), subministrats per Sigma-Aldrich.

Els productes utilitzats per a preparar fases mòbils o dissolucions reguladores de pH han estat de qualitat reactiu analític.

### 3.2.2. Dissolvents

Aigua doblement desionitzada obtinguda mitjançant un sistema de purificació tipus Milli-Q® Gradient A10 Millipore (Molheim, França), amb una resistivitat de  $18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , un nivell de Carboni Orgànic Total (TOC)  $\leq 5$  ppb, un nombre de partícules de mida  $> 0.22 \text{ }\mu\text{m} \leq 1$  per cada mL i un nombre de bacteries  $< 1 \text{ UFC mL}^{-1}$ . L'aigua ha estat recollida diàriament, per tal de preparar totes les dissolucions i les fases mòbils aquoses.

Acetonitril (ACN) i MeOH, han estat subministrats per Merck (Darmstadt, Alemanya) i presenten una qualitat HPLC-gradient.

### 3.2.3. Sòls

S'ha treballat amb un total de 15 mostres de sòls naturals procedents de diferents localitzacions de l'estat espanyol. Es tracta de sòls sense residus d'antibiòtics. Alguns d'aquests han estat subministrats pel laboratori Agroambiental Applus+ (Sidamon, Lleida), la Dra. Rigol, del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i el Dr. Macías, del Departament d'Edafologia de la Universitat de Santiago de Compostela.

Pel que fa al tractament dels sòls un cop rebuts, les mostres s'assequen a l'aire durant 48 h, es tamisen i s'obté la fracció de partícules  $\leq 2$  mm.

Els sòls s'homogeneïtzen per agitació mecànica durant 2 h. Posteriorment, les mostres es divideixen en varies fraccions fent ús d'un divisor *micro riffle* que assegura una reducció representativa de la mostra.

Les fraccions de les mostres es dipositen en recipients de polietilè d'alta densitat. Per tal de minimitzar l'activitat microbiana, les mostres s'han esterilitzat mitjançant irradiació amb raigs gamma procedents d'una font de Co-60, que subministra una dosi d'entre 25 – 35 kGy. Aquest tractament s'ha realitzat a l'empresa Aragogamma S.A. (Les Franqueses del Vallès, Barcelona). Finalment, les fraccions de sòl esterilitzades es guarden en un lloc sec i protegit de la llum. Prèviament a la seva utilització, els sòls s'homogeneïtzen de nou a l'agitador de rodets durant 1 h.

La textura (mètode de sedimentació discontinua), el contingut de matèria orgànica (mètode Walkley-Black) i el CEC (extraccions amb acetat d'amoni) s'han determinat al laboratori Agroambiental Applus+ (Sidamon, Lleida). La composició elemental dels sòls s'ha determinat per fluorescència de raigs X o XRF (*X-ray fluorescence*) als Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB). La Taula 3.1 recull les propietats fisicoquímiques més rellevants dels sòls estudiats.



**Taula 3.1.** Propietats fisicoquímiques dels sòls estudiats.

Mostra	pH <sup>a</sup>	OC (%) <sup>b</sup>	CEC (meq/100g) <sup>c</sup>	Argila (%)	Sorra (%)	Textura (classificació USDA)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%) <sup>d</sup>	MnO <sub>2</sub> (%) <sup>d</sup>	CaO (%) <sup>d</sup>	K <sub>2</sub> O (%) <sup>d</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%) <sup>d</sup>	SiO <sub>2</sub> (%) <sup>d</sup>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%) <sup>d</sup>	MgO (%) <sup>d</sup>	Na <sub>2</sub> O (%) <sup>d</sup>
P1	7.90	1.60	-	38.00	-	Franco-argil·lollimosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	5.90	8.40	-	15.80	-	Franco-arenosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	8.20	1.14	17.10	30.90	13.60	Franco-argil·lollimosa	4.01	0.06	25.4	1.71	0.13	36.32	9.95	1.44	0.21
S2	8.10	2.30	15.40	29.10	29.10	Franco-argilosa	2.65	0.04	30.84	1.37	0.18	30.32	6.64	1.82	0.26
S3	8.00	1.00	12.10	34.00	7.70	Franco-argilosa	5.27	0.09	15.06	2.90	0.16	45.33	13.86	2.87	0.72
S4	7.90	2.62	13.80	19.60	51.50	Franca	4.47	0.09	10.72	2.15	0.14	48.48	11.60	2.14	0.55
S5	6.70	5.41	22.00	13.70	52.50	Argil·lollimosa	7.42	0.14	4.72	3.38	0.55	54.60	17.31	3.85	0.72
S6	6.50	8.78	24.30	11.30	36.70	Franco-llimosa	8.80	0.16	3.08	3.52	0.70	55.47	19.39	2.07	1.23
S7	5.30	1.90	6.50	10.90	56.40	Franco-arenosa	1.57	0.06	0.25	1.91	0.08	84.32	7.06	0.35	0.71
S8	5.00	1.00	12.30	20.50	36.70	Franca	10.9	0.22	1.26	1.71	0.20	56.65	19.14	2.52	0.64
S9	3.88	7.26	21.50	8.70	81.00	Franco-arenosa	2.90	0.04	0.59	3.71	0.34	67.11	17.94	0.35	2.60
S10	8.20	1.45	10.60	23.70	38.60	Franca	5.29	0.08	7.37	2.41	0.15	61.76	12.9	1.38	0.51
S11	7.20	2.53	11.00	10.50	76.00	Franco-arenosa	4.29	0.13	0.94	1.79	0.09	79.19	9.63	0.60	0.14
S12	6.20	5.12	16.10	10.30	72.20	Argil·lollimosa	8.88	0.17	2.24	3.41	0.57	55.02	20.69	2.26	1.07
S13	6.00	1.70	12.10	22.20	47.60	Franca	6.15	0.10	0.72	3.10	0.30	66.75	16.65	1.32	0.18

<sup>a</sup> pH mesurat després d'una equilibració de 6 hores. Relació emprada: 1 g de sòl en 50 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.01M.

<sup>b</sup> Matèria orgànica determinada mitjançant el mètode Walkley-Black (factor = 1.74).

<sup>c</sup> Determinat mitjançant el mètode d'extracció amb acetat d'amoni a pH = 7.

<sup>d</sup> Determinat mitjançant l'anàlisi elemental per fluorescència de raigs X o XRF (X-Ray Fluorescence).

### 3.2.4. Biochars

En aquesta tesi s'han estudiat quatre biochars proporcionats per diferents fabricants:

- Agrichar<sup>®</sup> subministrat per BEST Energies Australia (Somersby, Australia).
- Soil Reef<sup>®</sup> subministrat per EcoTechnologies Group, LLC (Berwyn, PA, EUA).
- PureBlack<sup>®</sup> subministrat per BuyActivatedCharcoal.com (Crawford, NE, EUA).
- CQuest<sup>®</sup> subministrat per Dynamotive Energy Systems Corp. (McLean, VA, EUA).

Tots ells han estat produïts mitjançant una piròlisi en absència d'oxigen. Soil Reef i PureBlack han estat molturats i tamisats ( $\leq 2$  mm). L'Agrichar només s'ha tamisat ( $\leq 2$  mm) i el CQuest es va rebre en forma de pols. Tots els biochars s'han guardat en recipients de polietilè d'alta densitat en un lloc sec i protegit de la llum.

Aquests biochars presenten propietats fisicoquímiques diferents, segons indica la Taula 3.2. La superfície específica i la mida de porus de cada biochar s'han determinat amb un analitzador Autosorb-1 de Quantachrome Instr. (Boynton Beach, FL, EUA). Aquestes propietats s'han determinat, prèvia desgasificació a 200 °C, mitjançant l'adsorció de N<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub> a 77 i 273 K, respectivament. En el cas de l'Agrichar s'ha determinat la seva càrrega superficial utilitzant un analitzador del potencial zeta SurPAAS Electrokinetic Analyzer marca Anton Paar (Graz, Àustria), en el Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la Universitat Politècnica de Catalunya.

**Taula 3.2.** Propietats fisicoquímiques dels diferents biochars.

	<b>Agrichar</b>	<b>Soil Reef</b>	<b>PureBlack</b>	<b>CQuest</b>
Material de partida	Restes de frondoses (Eucalyptus spp.)	Encenalls de frondoses	Frondoses mesclades	Serradures de frondoses
Mètode de producció	Piròlisi lenta, 600 °C	Piròlisi lenta, 600 °C	Piròlisi lenta; T desconeguda	Piròlisi ràpida, 450–500 °C
C (% pes sec) <sup>a</sup>	91.7	77.4	80.9	70.5
H (% pes sec) <sup>a</sup>	0.9	2.0	2.6	3.3
Relació H/C	0.116	0.303	0.385	0.555
Cendres (% pes sec) <sup>a</sup>	1.4	7.9	3.1	10.9
N <sub>2</sub> – B.E.T. Àrea superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	427	338	46.6	<0.1 <sup>c</sup>
pH <sup>d</sup>	7.9	7.9	7.55	6.3

<sup>a</sup> Galbraith Laboratories, Inc. (Knoxville, TN, EUA). Valor obtingut per combustió a 900 °C.

<sup>b</sup> Calcuada a partir de l'ajust per Brunauer-Emmett-Teller de la isoterma d'adsorció de N<sub>2</sub> a 77 K.

<sup>c</sup> CQuest va donar resultats poc fiables.

<sup>d</sup> Relació sòlid-aigua 1:20 (w/v), després d'agitar durant 48 h.

### 3.3. Metodologia de treball

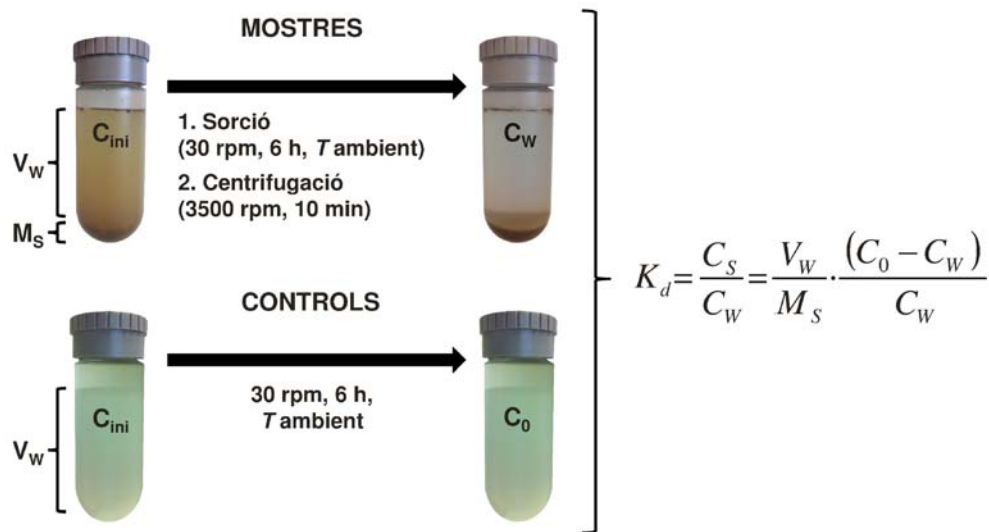
#### 3.3.1. Estudis de sorció

##### 3.3.1.1. Sorció de tetraciclines en sòls

L'estudi del procés de sorció de tetraciclines en sòls naturals s'ha dut a terme seguint les pautes marcades per la directriu 106 de la OECD [2]. Aquesta directriu tracta de la determinació de la sorció mitjançant experiments tipus *batch*. La fase líquida consisteix en una dissolució de  $\text{CaCl}_2$  10 mM. Aquesta s'empra per mantenir la força iònica constant durant el procés de sorció i minimitzar la suspensió de partícules. Sovint, se l'anomena "aigua artificial" perquè pretén simular les condicions d'aigua de pluja natural.

Un cop determinada la relació sòl-aigua adequada (1:50,  $\text{g mL}^{-1}$ ) i el temps necessari per assolir l'equilibri (6 h) mitjançant estudis preliminars, s'han dut a terme experiments de sorció per tal de caracteritzar les isoterms. Les dissolucions de les tetraciclines en medi  $\text{CaCl}_2$  10 mM, es posen en contacte amb 1 g de sòl dins de tubs de centrífuga de polipropilè. Tot seguit, s'afegeix  $\text{CaCl}_2$  10 mM fins a completar 50 mL de fase aquosa, assolint així la concentració objectiu a l'inici dels experiments ( $C_{\text{ini}}$ ). Els experiments de sorció realitzats han consistit en replicats de mostres i controls (Figura 3.2). Els controls, sense sòl, s'han emprat per a la determinació de cada concentració inicial ( $C_0$ ), compresa entre 0.5 i 10  $\text{mg L}^{-1}$ . L'anàlisi dels controls ha permès descartar qualsevol degradació o sorció de tetraciclines a les parets dels recipients ( $C_{\text{ini}} = C_0$ ).

Els tubs de centrífuga de polipropilè de mostres i controls s'agiten a 30 rpm durant 6 h protegits de la llum. Un cop finalitzada l'etapa d'agitació, les mostres es centrifuguen a 3500 rpm durant 10 min i es mesura el pH (Figura 3.2). Posteriorment, s'extreu una alíquota de 10 mL de la fase aquosa sobrenedant, es diposita en un vial de vidre, s'acidifica amb HCl fins a pH 2 – 3, es filtra a través d'una membrana de niló de 0.22  $\mu\text{m}$  i s'injecta a l'equip cromatogràfic per determinar la  $C_w$ . En aquest punt, es mesura el pH de totes les mostres i controls.



**Figura 3.2.** Resum esquematitzat dels experiments de sorció.

### 3.3.1.2. Sorció de sulfametazina en biochar i mescles sòl-biochar

En els estudis de sorció de SMT en biochars (sistema biochar-aigua) o mescles sòl-biochar (sistema sòl+biochar-aigua), s'ha emprat un fase aquosa composta per  $\text{CaCl}_2$  10 mM i  $\text{NaN}_3$  1.5 mM. L'ús de  $\text{NaN}_3$  respon a la necessitat d'emprar un agent bactericida durant els experiments, ja que la presència de biochar en aquests sistemes pot estimular l'aparició de microorganismes [3].

Els experiments destinats a elucidar els mecanismes de sorció que tenen lloc en el biochar –estudis de dependència de la sorció amb el pH, competició i variació del pH en afegir SMT– s'han realitzat en aigua i vials de vidre de color topazi.

En l'estudi de la sorció de SMT (a través de la construcció d'isotermes), la relació sòl-aigua i la concentració inicial de SMT s'han ajustat per tal d'obtenir valors de  $C_w$  dins de l'interval comprès entre  $10^{-3}$  i  $10^2$  mg  $\text{L}^{-1}$ . En tots els casos, s'ha assegurat que la sorció de SMT fos  $\geq 20$  %. Atès que les dissolucions mare de SMT contenien MeOH, el contingut final d'aquest en mostres, controls i blancs ha estat ajustat al 0.5 %. Els experiments previs van demostrar que la presència de MeOH a una concentració per sota del 0.6 % no afecta significativament a la sorció.

Els sistemes biochar-aigua i les mescles sòl-biochar s'han pre-equilibrat durant 48 h a 20 °C amb un 80 % de  $V_w$ , en absència de llum i sota una agitació suau. Un cop finalitzada aquesta etapa, s'addiciona a tots els sistemes la quantitat adient de SMT, MeOH i fase aquosa fins assolir els nivells de concentració i  $V_w$  desitjats. Les relacions sòlid-aigua emprades en els sistemes biochar-aigua i mescles sòl-biochar es detallen en la Taula 3.3. Posteriorment, s'equilibra cada sistema durant 48 h, es centrifuga a 1800 rpm durant 20 min i es mesura el pH. S'extreu una alíquota del líquid sobrenedant i es filtra. La concentració de SMT present en aquestes alíquotes es quantifica mitjançant LC-FL, LC-UV o LSC en funció de l'experiment.

**Taula 3.3.** Relació sòlid-aigua ( $\text{g mL}^{-1}$ ) emprada en la construcció d'isotermes de sorció.

Sorbent	Relació sòlid-aigua ( $\text{g mL}^{-1}$ )
Agrichar	$4 \times 10^{-4}$ (0.02:50)
Soil Reef	$4 \times 10^{-4}$ (0.02:50)
PureBlack	$1 \times 10^{-2}$ (0.1:10)
CQuest	$1 \times 10^{-1}$ (1:10)
Sòl-Agrichar	$4 \times 10^{-2}$ (2:50)
Sòl-Soil Reef	$6 \times 10^{-1}$ (3:5)
Sòl-PureBlack	$6 \times 10^{-1}$ (3:5)
Sòl-CQuest	$6 \times 10^{-1}$ (3:5)

Atès que els biochars contenen grups funcionals que els confereixen caràcter àcid-base, es van realitzar experiments previs per tal de determinar la quantitat d'HCl o NaOH necessària que calia addicionar per tal d'assolir el pH desitjat al final dels experiments (en condicions d'equilibri de sorció).

Pel que fa als sistemes biochar-aigua, aquests es van ajustar addicionant HCl per tal d'assolir un pH = 5. Per la seva banda, les mescles sòl-biochar s'han preparat a partir d'un sòl procedent de St. Joan de les Abadesses (S4, Taula 3.1) sense alterar el pH del sòl (pH = 7.42, relació emprada: 1 g de sòl 5 mL d'una solució de  $\text{CaCl}_2$  10 mM i  $\text{NaN}_3$  1.5 mM). Les mescles contenen biochar al 1 o 2 % en pes. El pH de mescles i sòl al final dels experiments ha estat 7.43 (0.27) i 7.50 (0.03), respectivament.

### **Estudis de dependència de la sorció en funció del pH (*pH-edge sorption experiments*)**

L'estudi de la sorció en funció del pH, s'ha realitzat addicionant NaOH i HCl per tal d'estudiar la variació que experimenta la magnitud de la sorció ( $K_d$ ) en funció del pH del medi. L'interval de pH estudiat es troba entre 1 – 11 i s'ha escollit perquè permet caracteritzar la sorció de les diferents espècies de SMT presents en solució ( $\text{SMT}^+$ ,  $\text{SMT}^0$ ,  $\text{SMT}^-$ ). La força iònica de les mostres es va ajustar a 0.14 M mitjançant l'addició de NaCl (exceptuant les mostres a pH 1 que presentaven un força iònica = 0.21 M). La concentració inicial de SMT emprada ha estat  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

### **Estudis de competició**

Els estudis de sorció de SMT en biochar, i en presència d'altres molècules competidores, s'han realitzat amb SMT marcada isotòpicament a pH 1, 5 i 10.5. En aquestes condicions, les espècies predominants presents en solució són  $\text{SMT}^+$  (97.0 %),  $\text{SMT}^0$  (99.2 %) i  $\text{SMT}^-$  (99.9 %), respectivament.

S'han addicionat concentracions creixents de competidor, entre 0 i 0.1 M, a cada mostra que contenia una determinada concentració inicial de SMT en funció del pH estudiat ( $1.1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $3.6 \times 10^{-6} \text{ M}$  i  $1.2 \times 10^{-5} \text{ M}$  pels valors de pH 1, 5 i 10.5, respectivament). La quantificació de SMT en aquest apartat s'ha realitzat mitjançant LSC, i la fracció de SMT marcada ha estat <20 %, suficient per tal de mesurar una  $C_w$  de SMT marcada que fos unes deu vegades el límit de detecció de l'instrument (20 DPM).

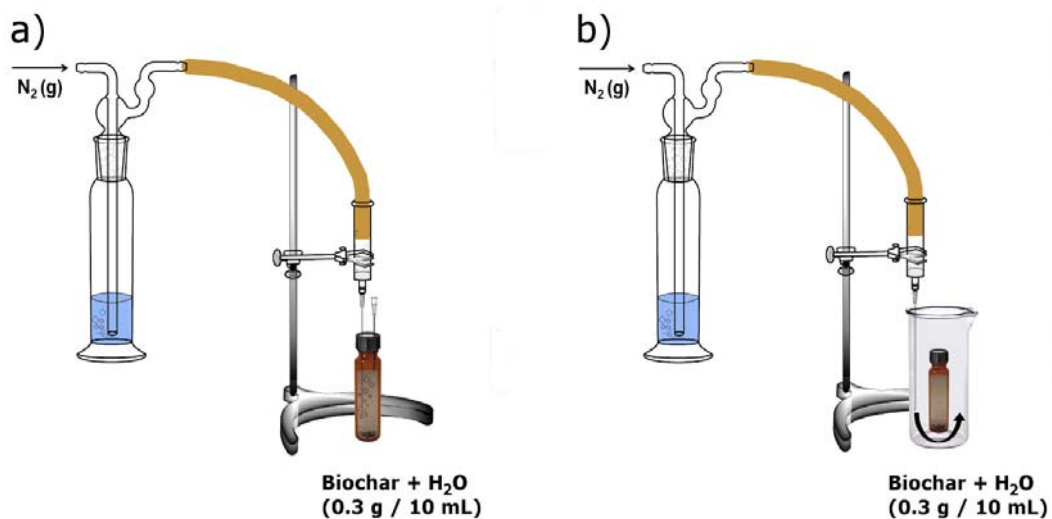
### **Determinació de la quantitat de $\text{OH}^-$ o $\text{H}^+$ alliberat durant la sorció de sulfametazina en biochar**

Per tal d'elucidar el mecanisme que té lloc durant la sorció de SMT en Agrichar, s'ha estudiat la variació del pH en afegir quantitats relativament elevades de SMT (0.05 – 100  $\mu\text{mols}$  de SMT a 10 mL de dissolució aquosa). Els experiments s'han realitzar a un pH inicial de 5 o 9.5, on la proporció de les espècies  $\text{SMT}^0$  i  $\text{SMT}^-$  en solució és de 99.7 i 99.2 %, respectivament. L'ajust dels pH inicials s'ha realitzat afegint NaOH o HCl abans del pre-equilibrament.

L'aigua emprada en aquests experiments, s'ha bullit per tal d'eliminar el  $\text{CO}_2$  dissolt. La relació sòlid-aigua ha estat 0.3 g d'Agrichar en 10 mL d'aigua. Els controls (sense Agrichar) només contenien 10 mL d'aigua. Tant mostres com controls s'han preparat per duplicat.

Abans de començar l'etapa de pre-equilibrament es fa passar un corrent de  $\text{N}_2$  durant 10 min (Figura 3.3, a). Un cop finalitzat el pre-equilibrament de 48 h, s'addiciona SMT. Pel cas de l'estudi a pH 9.5, s'addicionen quantitats creixents d'una dissolució de SMT de  $30 \text{ g L}^{-1}$  al mateix pH. Anàlogament als experiments de sorció descrits en l'anterior apartat, s'ha ajustat el volum final de la dissolució i la concentració de MeOH al 0.5 %. En els experiments a pH 5, s'addicionen quantitats creixents de SMT sòlida. Per tal de minimitzar el contacte amb l'atmosfera i la possible captació de  $\text{CO}_2$  per part de la dissolució, s'ha emprat un dispositiu experimental que permet la introducció de la SMT sòlida, minimitzant l'exposició al  $\text{CO}_2$  atmosfèric (Figura 3.3, b).

Un cop introduïda la SMT en el sistema, s'ha equilibrat durant 48 h i transcorregut aquest temps s'ha mesurat el pH. Després de mesurar el pH, s'ha extret i filtrat una alíquota de cada vial i s'ha determinat el contingut de SMT en solució mitjançant LC-UV.



**Figura 3.3.** Muntatge experimental per tal d'evitar la contaminació de les mostres amb  $\text{CO}_2$  en experiments realitzats a pH 9.5 (a) i 5 (b).



## **Experiments de desgast (“envelliment”)**

Per tal de simular les condicions que pot experimentar al llarg del temps el biochar incorporat en un sòl, s’han realitzat experiments de desgast (també anomenats experiments de *weathering o aging*) i s’han comprovat els canvis que poden experimentar les característiques de sorció de les mescles sòl-biochar.

S’han preparat mostres de sòl que contenen biochar al 1 o 2 % en pes. El desgast ha consistit en un condicionament durant 28 dies, a 40 °C i dues agitacions manuals diàries, prèvies a una etapa de pre-equilibrament de 48 h, a 20 °C i agitació a 30 rpm. Posteriorment, s’addiciona SMT i s’equilibra durant 48 h més, a 20 °C i agitació a 30 rpm. Un cop completada l’etapa de sorció, es quantifica la SMT restant en la fase aquosa mitjançant LC-UV o LC-FL.

### **3.3.2. Determinació de les concentracions aquoses de sorbat**

#### **3.3.2.1. Determinació cromatogràfica de tetraciclins**

La quantificació de les tetraciclins estudiades en aquest treball (OTC, TC, CTC i DC) s’ha realitzat mitjançant LC-UV.

La separació s’ha dut a terme en mode isocràtic, a temperatura ambient, amb una columna C<sub>18</sub> HyPurity Aquastar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de 250 mm de longitud × 4.6 mm de diàmetre intern i una mida de partícula de 5 µm. Aquesta està connectada a una pre-columna tipus Uniguard™ amb un rebliment de les mateixes característiques que la columna. La fase mòbil està composta d’una dissolució reguladora de pH d’àcid oxàlic/oxalat 10 mM a pH = 2.2 i ACN, en una proporció 70:30. El tampó es filtra a través d’un filtre de membrana de niló de 0.22 µm abans de la seva utilització. El cabal de fase mòbil ha estat d’1 mL min<sup>-1</sup> i el volum d’injecció de 100 µL. La detecció s’ha realitzat a 360 nm.

La quantificació s’ha realitzat mitjançant recta de calibratge externa, mesurant les àrees de patrons preparats el mateix dia. Els límits de quantificació (LOQ, *limit of quantification*) del mètode són 20 µg L<sup>-1</sup> (OTC), 10 µg L<sup>-1</sup> (TC) i 30 µg L<sup>-1</sup> (CTC i DC).

### 3.3.2.2. Determinació cromatogràfica de la sulfametazina

La quantificació de la SMT s'ha realitzat per LC-FL o LC-UV en funció del nivell de concentració a quantificar.

#### LC-UV

La separació cromatogràfica es realitza en mode isocràtic, a temperatura ambient i utilitzant una columna C<sub>18</sub> HyPurity Aquastar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) connectada a una pre-columna amb un rebliment de les mateixes característiques. La fase mòbil està composta per una dissolució reguladora de pH d'àcid acètic/acetat 10 mM a pH = 4.5 i ACN en proporció 80:20. El tampó es filtra a través d'un filtre de membrana de niló de 0.22 µm abans de la seva utilització. El cabal de fase mòbil ha estat d'1 mL min<sup>-1</sup> i el volum d'injecció de 50 µl. La detecció dels analits es duu a terme a 268 nm. La quantificació s'ha realitzat mitjançant recta de calibratge externa, mesurant les àrees de patrons preparats diàriament. El LOQ del mètode és 13 µg L<sup>-1</sup>.

#### LC-FL

D'altra banda, per a concentracions més baixes de SMT s'empra detecció fluorimètrica. Atès que les sulfonamides no són fluorescents intrínsecament, la detecció per FL requereix una etapa de derivatització prèvia a la separació cromatogràfica. Es va procedir a optimitzar i adequar un mètode desenvolupat en el nostre grup [4]. La reacció de derivatització s'ha realitzat a temperatura ambient durant 2 h seguint les etapes següents:

1. Es diposita 1 mL de la solució aquosa que conté SMT en un vial de vidre de color topazi.
2. S'addiciona 1 mL d'una dissolució reguladora de pH d'àcid fòrmic/formiat 40 mM a pH 3.4, que conté 100 mg L<sup>-1</sup> de sulfametoxidiazina com a patró intern.
3. S'addicionen 2 mL de fluorescamina al 0.1 % en ACN (p/v).

Passades 2 h, la solució derivatitzada es filtra a través d'un filtre de niló de 0.45 µm, es descarten les primeres gotes i s'injecta al sistema cromatogràfic. La separació es duu a terme en mode gradient (Taula 3.4), a temperatura ambient, amb una columna C<sub>18</sub>

Supelco Discovery (Bellefonte, PA, USA) de 250 mm de longitud × 4 mm de diàmetre intern i 5 µm de mida de partícula. Aquesta es connecta a una pre-columna tipus Supelguard Discovery guard. La fase mòbil està formada per una dissolució reguladora de pH d'àcid fòrmic/ formiat 10 mM ajustada a pH = 3.4 i ACN. El tampó es filtra a través d'un filtre de membrana de niló de 0.22 µm. El cabal ha estat 1 mL min<sup>-1</sup> i el volum d'injecció 50 µL. La detecció dels analits es duu a terme a una  $\lambda_{\text{excitació}}$  i  $\lambda_{\text{emissió}}$  de 405 i 485 nm, respectivament. La quantificació per FL s'ha realitzat mitjançant recta de calibratge externa, mesurant les àrees de patrons preparats el mateix dia. El LOQ del mètode és 0.2 µg L<sup>-1</sup>.

**Taula 3.4.** Gradient d'elució emprat en la determinació per LC-FL.

Temps (min)	% Dissolució reguladora de pH	% ACN
0	66	34
12	66	34
17	30	70
19	66	34
24	66	34

### 3.3.2.3. Determinació de la sulfametazina per escintil·lació líquida

La quantificació de la SMT marcada isotòpicament s'ha dut a terme per espectrometria d'escintil·lació líquida o LSC (*liquid scintillation counting*).

Un cop finalitzats els experiments de competició, es filtra a través d'un filtre de niló de 0.45 µm una alíquota de 10 mL de solució sobrenedant. Les primeres gotes filtrades es descarten. A continuació, es diposita un volum conegut de mostra filtrada (1 – 3 mL) dins un vial de polietilè de baixa difusió de 20 mL (Perkin-Elmer) i es mescla amb 15 mL de cocktail d'escintil·lació *Opti-fluor*. Posteriorment, la mescla s'homogeneïtza manualment, es col·loca al porta-mostres de l'analitzador, s'ajusta la regió energètica de comptatge (finestra de treball) a l'interval comprès entre 0 – 156 keV i el temps de mesura a 20 min.

## Referències

1. Specifications. Liquid scintillation analyzers. Tri-Carb 2900TR. <<http://www.perkinelmer.com/Catalog/Family/ID/Tri%20Carb%20Liquid%20Scintillation%20Counters>> (consulta: 1 febrer 2013).
2. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guideline for testing of chemicals. Test No. 106: Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method, France, **2000**.
3. Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology & Biochemistry* **2011**, 43(9), 1812-36.
4. Raich-Montiu J, Folch J, Compano R, Granados M, Prat MD. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *J Chromatogr A* **2007**, 1172(2), 186-93.



## RESULTATS I DISCUSSIÓ

---

### *Capítol 4*



## 4.1. Sorció de tetraciclins en sòls

Tal com s'ha comentat en la introducció, la presència de traces d'antimicrobians en els compartiments ambientals afavoreix l'aparició de microorganismes patògens resistents [1-2]. Atès que el procés de sorció en sòls juga un paper clau en el destí, transport, reactivitat, ecotoxicitat i biodisponibilitat de les tetraciclins en el medi ambient, cal caracteritzar la sorció per a l'avaluació del risc ambiental que representa la dispersió d'aquests antimicrobians en el medi.

En aquest capítol es presenten els resultats de l'estudi realitzat sobre sorció de tetraciclins en sòl. En concret, s'ha estudiat la sorció de les quatre tetraciclins més emprades en medicina veterinària (oxitetraciclina, OTC; tetraciclina, TC; clortetraciclina, CTC; i doxiciclina, DC) en 15 sòls naturals [3]. En una primera etapa, l'estudi caracteritza la sorció mitjançant l'ajust de les dades experimentals al model de sorció més adient (p. ex. Freundlich i Langmuir). En una segona etapa, s'apliquen mètodes quimiomètrics a les dades obtingudes, que inclouen la magnitud de la sorció (i.e. el coeficient de distribució,  $K_d$ ) i les característiques fisicoquímiques del sòl per a cada combinació sòl-tetraciclina. El tractament multivariant de les dades ha permès identificar els descriptors del sòl amb més influència en el procés de sorció, així com també proporcionar models de predicció satisfactoris emprant un nombre reduït de propietats.

Els resultats d'aquets estudi s'han recollit en l'article científic "Sorption of tetracyclins onto natural soils: data analysis and prediction" publicat a la revista *Environmental science and pollution research*.





4.1.1. Publicació 1. “Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction”

*Sorption of tetracyclines onto natural soils:  
data analysis and prediction*

**M. Teixidó, M. Granados, M. D. Prat &  
J. L. Beltrán**

**Environmental Science and Pollution  
Research**

ISSN 0944-1344  
Volume 19  
Number 8

Environ Sci Pollut Res (2012)  
19:3087-3095  
DOI 10.1007/s11356-012-0954-5



 Springer



## Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction

M. Teixidó · M. Granados · M. D. Prat · J. L. Beltrán

Received: 17 February 2012 / Accepted: 24 April 2012  
 © Springer-Verlag 2012

**Abstract** Residues of tetracyclines reach soils as a result of animal waste application. Sorption is a key process in transport, fate, and effects of contaminants in the environment. In this work, we have attempted to predict the sorption of four widely used tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, and doxycycline) from soil physicochemical properties. Batch sorption experiments were performed on 15 natural soils with a broad range of physicochemical properties, and the data were fitted to several isotherm models. Multivariate analysis methods were conducted to identify the main factors affecting the sorption distribution coefficients ( $K_d$ ) of the tetracyclines at two aqueous concentration levels (100 and 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). All four tetracycline sorption isotherms in alkaline and acidic soils were well described by the Freundlich and Langmuir equation, respectively. At intermediate soil pH (from 5.3 to 7), oxytetracycline and tetracycline exhibited Freundlich behavior, whereas chlortetracycline and doxycycline followed a Langmuir model. Two partial least squares (PLS) models were developed. The first one uses five soil descriptors as input variables; the second uses, pH, cation exchange capacity (CEC), and  $\log K_{d,OTC}$ . Both models satisfactorily predicted distribution coefficients within a factor of 1.5. Sorption of tetracyclines in soil is governed by several factors, in the following order of importance: solution speciation, CEC

(dominant at acidic–neutral soil pH), transition metal content, and texture. The PLS models indicated that tetracycline sorption can be predicted using a minimal set of soil descriptors including oxytetracycline sorption data.

**Keywords** Antibiotics · Tetracyclines · Sorption · Isotherm · Modeling · Freundlich · Langmuir · PCA · PLS

### Introduction

In recent years, there has been growing concern about the presence of numerous antibiotics in different environmental compartments, such as soils, sediments, and surface and ground waters (Kemper 2008; Luo et al. 2011; Sarmah et al. 2006). Antimicrobials and their metabolites may appreciably affect the soil microflora, particularly bacteria (Halling-Sorensen et al. 2002; Thiele-Bruhn and Beck 2005) and contribute to enhanced resistance of pathogens to these compounds (Boxall et al. 2003; Heuer et al. 2011). Tetracyclines are a class of highly efficient and inexpensive broad-spectrum antimicrobials that are widely used in veterinary medicine, to prevent and treat bacterial diseases; or in some countries to promote growth. Tetracyclines may enter soil when manure from medicated animals is spread on agricultural fields. Concentrations in the range of 12–100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in soils have been reported (Hamscher et al. 2002). Nonetheless, persistence of tetracyclines in the environment may lead to higher concentrations (Aga et al. 2003).

Tetracyclines are polyketones, presenting a naphthalene ring structure and containing three acidic groups: (a) tricarbonyl, (b) phenolic  $\beta$ -diketone, and (c) dimethylamine, with  $\text{p}K_a$  values in the range of 3–4, 7–8, and 9–10, respectively (see Fig. S1 in the Electronic supplementary material) (Leeson et al. 1963; Martindale 1991; Qiang and Adams 2004).

Responsible editor: Philippe Garrigues

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11356-012-0954-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Teixidó · M. Granados · M. D. Prat · J. L. Beltrán (✉)  
 Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona,  
 Martí i Franqués, 1-11,  
 08028 Barcelona, Catalunya, Spain  
 e-mail: jibeltran@ub.edu

Therefore, tetracyclines can exist in aqueous solutions as a cation, zwitterion, and anion. Generally, tetracyclines are zwitterionic over most of the environmental soil pH range (between 3 and 8). Tetracyclines also form metal chelates of high stability, particularly with divalent metal ions, such as calcium and magnesium (Nelson 1998).

The fate, mobility, and bioavailability of tetracyclines in soil are governed by sorption. Studies on sorption of tetracyclines can provide valuable information about their environmental impact. Sorption of organic compounds, such as tetracyclines, is a complex process, involving partition, electrostatic attraction to negatively charged clay surfaces, cation exchange, cation bridging, surface complexation, etc. (Tolls 2001).

Studies on reference clay minerals (montmorillonite and kaolinite) indicate that tetracycline sorption depends mainly on solution pH (i.e., tetracycline speciation), ionic strength, and presence of humic substances (Avisar et al. 2010; Figueroa et al. 2004; Kulshrestha et al. 2004; Li et al. 2010b; Wang et al. 2010; Zhao et al. 2011). In these cases, sorption was found to decrease with increasing pH and ionic strength, consistent with a cation exchange mechanism being dominant in the pH range where tetracyclines exist as cations or zwitterions. Figueroa et al. (2004) proposed that tetracycline retention also occurs via surface complexation. Tetracycline sorption on clay surfaces is inhibited in the presence of isolated humic substances (Gu and Karthikeyan 2008; Pils and Laird 2007), possibly by masking available sites. Sorption interactions of tetracycline with aluminum and iron oxides via surface complexation are also reported (Gu and Karthikeyan 2005; Tanis et al. 2008).

Studies of oxytetracycline sorption on artificially pH-adjusted soils revealed the importance of organic matter (OM), cation exchange capacity (CEC), texture, and free/crystalline oxide content (Jones et al. 2005; ter Laak et al. 2006a). Studies of tetracycline sorption by soils and marine sediments at natural pH found that oxytetracycline sorption was greater compared to other antimicrobials (Rabolle and Spliid 2000) and clearly depended on soil texture (Pouliquen and LeBris 1996). Still, other studies suggest that CEC, pH, and ionic strength are primary contributors to the tetracycline sorption by ordinary soils (Figueroa-Diva et al. 2010; Sassman and Lee 2005). Attempts to model tetracycline sorption in natural soils are scarce, and data treatment is frequently simplistic. Most of the studies just used the Freundlich equation to parameterize the sorption process in soils. The choice of an appropriate model to describe sorption behavior is a prerequisite for accurately predicting contaminant transport and fate in soil systems.

In the present work, we have quantified the sorption of four tetracyclines: oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), and doxycycline (DC) on 13 natural soils. The studied tetracyclines are the most widely used in veterinary practices during last decades.

To ascertain main soil properties affecting sorption coefficients ( $K_d$ ), we have applied multivariate data analysis (principal component analysis—PCA—and partial least squares—PLS—regression). A prediction model for each tetracycline using a reduced set of soil descriptors was constructed. Satisfactory estimation of the log  $K_d$  values for TC, CTC, and DC is possible with a model containing only pH, CEC, and log  $K_{d,OTC}$  as input variables.

## Materials and methods

### Chemicals

Vetranal-grade OTC hydrochloride (CAS number 2058-46-0), TC hydrochloride (CAS number 64-75-5), and CTC hydrochloride (CAS number 64-72-2) were purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). DC hydrochloride (CAS number 24390-14-5) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). All other chemicals used were analytical grade. Stock standard solutions (250 mg L<sup>-1</sup>) were prepared by dissolving the corresponding hydrochlorides in water. Solutions were stored at 4°C in amber glass bottles and used within 2 weeks. Fresh working solutions were prepared daily by dilution of the stock solutions with 0.01 M calcium chloride. Calcium chloride dihydrate was purchased from Panreac (Barcelona, Catalunya, Spain), and oxalic acid dihydrate was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Solvents used were acetonitrile (ACN) HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and deionized water with a resistivity of 18.2 MΩ cm<sup>-1</sup> (Milli-Q plus system, Millipore, Molheim, France).

### Instrumentation

Tetracyclines in aqueous phase were analyzed on a 1100 Agilent high performance liquid chromatography system (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), consisting of an HP 1100 quaternary pump, an automatic injector Agilent 1100 G1313A, and an Agilent diode array detector. The analytical column was a 5-μm C18 Hypurity Aquastar, 250×4.6 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) connected to a Uniguard<sup>TM</sup> HPLC precolumn. A rotary shaker was used in sorption experiments. The pH was measured using a Crison GLP 21 pH meter (Alella, Spain), equipped with a Crison 52-02 combined glass electrode. A Heraeus Christ centrifuge (Osterode am Harz, Germany) was used to carry over the separation of the supernatant phase. In order to obtain secure representative mass fractions, a Jones micro riffle splitter (Sepor Inc., CA, USA) was used.

### Chemical analysis

Determination of tetracycline concentrations in the aqueous phase was performed by HPLC in isocratic mode, with

absorptiometric detection at 360 nm. The mobile phase consisted of a 70:30 mixture of 0.01 M oxalic acid (pH 2.2 adjusted with 0.01 M NaOH) and ACN, respectively. The mobile phase was prepared daily and filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  membrane. The flow rate was set at 1 mL  $\text{min}^{-1}$  and injection volume was 100  $\mu\text{L}$ . Quantification was performed by external calibration measuring peak areas. Limits of quantification were 0.02  $\text{mg L}^{-1}$  for OTC, 0.01  $\text{mg L}^{-1}$  for TC, and 0.03  $\text{mg L}^{-1}$  for both CTC and DC.

### Soils

Fifteen different soils, from different Spanish locations, in physicochemical properties were used to carry over the experiments (Table S1 in the supplementary material). Soils were air-dried, sieved through a 2-mm mesh, sterilized using Co-60 gamma radiation (Aragogamma S.L, Barcelona, Spain), and splittered. Finally, the samples were stored in the dark, in closed containers at room temperature. Two soils (P1 and P2) were used for preliminary tests, as they have very different clay and organic carbon content (OC). Sorption isotherms were obtained for 13 soils (S1 to S13).

### Sorption studies

Batch sorption experiments were performed according to the OECD 106 directive (OECD 2000).  $\text{CaCl}_2$  solutions (0.01 M) containing tetracycline were added to soil samples in polypropylene centrifugation tubes (soil-to-solution ratio was 1:50). All containers were wrapped with aluminum foil, in order to prevent photodegradation, and were under gentle constant agitation in the rotary mixer at 30 rpm at room temperature. Subsequently, samples were centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. An aliquot of each supernatant was acidified to pH 2–3 to minimize tetracycline degradation (Sassman and Lee 2005), filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  nylon membrane (no tetracycline uptake by the membrane was observed in previous experiments), and transferred to 1-mL PTFE vials prior to injection to the HPLC system. In order to obtain sorption isotherms, ten solutions with different tetracycline initial concentrations, ranging from 0.5 to 10  $\text{mg L}^{-1}$  in 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ , were equilibrated with S1 to S13 soils. Duplicate sorption experiments and duplicate soil-free blank experiments (used as control concentration) were made for each concentration. Moreover, a couple of tetracycline-free blanks (containing only 1 g of soil and 50 mL 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ ) were used just to ensure that soil matrices did not contain any tetracycline residues. Six-hour sorption equilibration time was chosen from preliminary sorption studies, using P1 and P2 soils (Fig. S2). No significant tetracycline degradation and shifts in final solution pH were observed within this time.

### Data treatment

The sorption exchange of chemicals between the aqueous phase and the soil is governed by the distribution coefficient ( $K_d$ ,  $\text{L kg}^{-1}$ ), defined as:

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} \quad (1)$$

where  $C_w$  stands for tetracycline equilibrium concentration in the aqueous phase ( $\text{mg L}^{-1}$ ), and  $C_s$  is the concentration of tetracyclines sorbed onto the soil ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).  $C_w$  values were determined by liquid chromatography, and the corresponding concentrations of tetracyclines sorbed by the soil,  $C_s$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) values, were calculated by mass balance equation:

$$C_s = (C_0 - C_w) \cdot \frac{V_w}{M_s} \quad (2)$$

where  $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) is the initial aqueous concentration,  $V_w$  (L) is the volume of aqueous solution, and  $M_s$  (kg) stands for the soil mass. The variation of  $C_s$  vs.  $C_w$  is represented by sorption isotherms (Hinze 2001), the Freundlich and Langmuir models being the most commonly used (Eqs. 3 and 4, respectively):

$$C_s = K_F \cdot (C_w)^N \quad (3)$$

$$C_s = \frac{b \cdot K_L \cdot C_w}{1 + K_L \cdot C_w} \quad (4)$$

$K_F$  ( $\text{mg}^{1-N} \text{L}^N \text{kg}^{-1}$ ) is the Freundlich coefficient and it is related to the sorption magnitude and  $N$  stands for the unitless linearity parameter. Low  $N$  values indicate a heterogeneity of the surface sites (Essington 2004; Sposito 1984). On the other hand, in the Langmuir equation,  $b$  ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) is the maximum sorption capacity of the soil and  $K_L$  ( $\text{L mg}^{-1}$ ) is the Langmuir adsorption constant.  $K_L$  is also a measure of the sorption intensity. The rearranging of Eqs. 1, 3, and 4 allows the calculation of distribution coefficients according to:  $K_d = K_F \cdot C_w^{N-1}$  and  $K_d = b \cdot K_L \cdot (1 + K_L \cdot C_w)^{-1}$ , for the Freundlich and Langmuir models, respectively.

Sorption data of tetracyclines for the different soils were fitted to the Langmuir and Freundlich equations using non-linear least squares (NLLS) (Kinniburgh 1986). The solver function of Microsoft Excel<sup>TM</sup> spreadsheet was used in order to find the set of adjustable parameters that minimized the weighted objective function:

$$U = \sum_{i=1}^m \left( \frac{C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i}}{C_{S,exp,i}} \right)^2 \quad (5)$$

$C_{S,exp,i}$  and  $C_{S,calc,i}$  are the experimental and calculated sorbed concentrations, respectively. Use of weighted NLLS

offers the possibility for all data points to be equally weighted in the model. Best fits were chosen following two steps. First, an examination of logarithmized  $C_S$  vs.  $C_W$  and  $K_d$  vs.  $C_S$  plots allowed to disclose the type of isotherm according to the classification proposed in the literature (Giles et al. 1974; Hinz 2001). This approximation was confirmed in a second step through the goodness of fit (Kinniburgh 1986), selecting the isotherm type giving the lowest residual root mean square error (RMSE):

$$\text{RMSE} = \left( \frac{U}{m-p} \right)^{1/2} \quad (6)$$

where  $m$  is the number of experimental data points and  $p$  is the number of adjustable parameters. The standard deviation of each parameter was calculated with the macro Solstat.xls for Microsoft Excel™ (Billo 2001).

## Results and discussion

**Isotherm modeling: transition from Langmuir to Freundlich behavior**

Although several isotherm equations were tested (Hinz 2001), they did not improve results significantly compared to the Langmuir and Freundlich models. Moreover, both models well described data with only two adjustable parameters. Results are shown in Table 1, which presents the Freundlich- and Langmuir-adjusted parameters (best fits in bold). In the present study, soil retention—i.e.,  $K_F$ ,  $b$ , and  $K_L$  estimated parameters—was considerably high for all tetracyclines in comparison with other previously reported veterinary ionizable antimicrobials (Rabolle and Spliid 2000; ter Laak et al. 2006b; Tolls 2001). Most tetracycline-soil systems displayed nonlinear, concave downward-shaped isotherms. Hence, they were described with the Langmuir or Freundlich equation with  $N$  below unity. This indicates limitations in the number of available sites on the soil surface; therefore, at higher  $C_W$  values it becomes more difficult to sorb molecules on the binding sites (Kulshrestha et al. 2004). Table 1 also shows that a decrease in the soil pH values (S1 to S9 and S10 to S13) is concomitant with isotherm nonlinearity ( $N < 1$  or Langmuir behavior). Nonlinearity arises from site-specific interactions with functional groups present in the soil OM and the sorption to mineral surfaces (Chiou and Kile 1998; Xing et al. 1996). Additionally, nonlinear isotherms have also been reported for other ionizable polar compounds, such as sulfonamides (Thiele-Bruhn et al. 2004). On the other hand, CTC and DC sorption onto alkaline soils (S1, S2, S3, and S10) could not be fitted to the Langmuir equation due to  $N$  values slightly higher than unity.

The Freundlich model described most of the tetracycline-soil systems in this study. Nevertheless, some remarkable exceptions were found. All four tetracycline sorption isotherms in moderately alkaline soils (S1 to S4 and S10, with moderate OM and CEC values and loamy textures) were well described by the Freundlich equation. In this pH range, the anionic and zwitterionic species were predominant in solution. On the other hand, at moderately acid/neutral pH (from 5.3 to 7, where the zwitterionic species predominates) OTC and TC exhibited the best fit for the Freundlich model, whereas CTC and DC sorption were better described by the Langmuir model. We note that CTC and DC in soil S6 were better described by the Freundlich equation; this could be explained by its highest OC content (8.78 %). Finally, the Langmuir model fitted the sorption of all compounds in acidic soils (pH range from 3.88 to 5.0).

Representative OTC and DC sorption isotherms, on S3 and S13 soils respectively, are shown in Fig. 1. TC sorption on S3 soil (Fig. 1a and b) was better described by the Freundlich equation, as indicated by the linear relationship in  $\log K_d$  vs.  $\log C_S$  plot (Fig. 1b). Likewise, DC sorption data for S13 soil, exhibited in Fig. 1c and d, indicate a Langmuir-type behavior. The curved negative slope of  $\log K_d$  vs.  $\log C_S$  plot confirmed this model (Fig. 1d).

These changes in sorption behavior, observed from alkaline to acidic soils, are compatible with a transition from several concurrent interactions (i.e., CEC, metal bridging and/or surface complexation, polar interactions with OM, Van der Waals, etc.) to a predominant CEC interaction at lower pH values. This behavior is in accordance with a specific sorption mechanism through sites of similar energy (Essington 2004; Xing et al. 1996). Similar results regarding this shift can be found in the Li et al. (2010a) study: sorption of tetracyclines onto neutral/alkaline soil was better described by the Freundlich equation, and sorption onto acidic soil followed a Langmuir-type isotherm.

From the sorption parameters (Table 1), we calculate the sorption coefficients for all systems at two  $C_W$  levels: 100 and 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  (see Table S2). Detailed analysis of  $\log K_d$  values shows that in most cases, the sorption magnitude was systematically higher for CTC and DC compared to OTC and TC. The sorption parameters ( $K_F$  or  $K_L$ ) in Table 1 show the same trend. This fact seems to be related to the water solubility differences between CTC/DC and TC/OTC (Fig. S3) (Ahmed and Jee 1984; Bogardus and Blackwood 1979). Therefore, more effective polar-polar interactions occur between CTC and DC functional groups and acidic groups present on the clay and/or OM edges.

**Multivariate data analysis: modeling and predicting  $K_d$  values**

One of the aims of this work is the prediction of the tetracycline sorption capacity as a function of the soil characteristics. As the sorption isotherm can be different owing to

**Table 1** Sorption parameters of tetracyclines in different soils with their standard deviations (best fits in bold)

Compound	Soil	Freundlich fit <sup>a</sup>				Langmuir fit <sup>b</sup>			
		$K_F$ (mg <sup>1-N</sup> L <sup>N</sup> kg <sup>-1</sup> )	$N$ (unitless)	RMSE <sup>c</sup>	$r^2$	$b$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	RMSE <sup>c</sup>	$r^2$
OTC	S1	<b>280 (3)</b>	<b>0.95 (0.02)</b>	<b>0.041</b>	<b>0.997</b>	2,874 (624)	0.11 (0.03)	0.050	0.996
	S2	<b>170 (2)</b>	<b>0.91 (0.01)</b>	<b>0.044</b>	<b>0.998</b>	1,463 (235)	0.14 (0.03)	0.059	0.994
	S3	<b>105 (2)</b>	<b>0.91 (0.02)</b>	<b>0.026</b>	<b>0.997</b>	1,184 (173)	0.10 (0.02)	0.047	0.994
	S4	<b>323 (2)</b>	<b>0.83 (0.02)</b>	<b>0.040</b>	<b>0.997</b>	896 (96)	0.57 (0.09)	0.087	0.985
	S5	<b>411 (5)</b>	<b>0.76 (0.02)</b>	<b>0.054</b>	<b>0.993</b>	668 (77)	1.31 (0.29)	0.144	0.955
	S6	<b>704 (17)</b>	<b>0.84 (0.03)</b>	<b>0.053</b>	<b>0.992</b>	1,027 (85)	1.18 (0.15)	0.060	0.992
	S7	<b>209 (8)</b>	<b>0.58 (0.04)</b>	<b>0.094</b>	<b>0.960</b>	327 (17)	2.28 (0.35)	0.137	0.957
	S8	586 (15)	0.72 (0.03)	0.087	0.982	<b>698 (20)</b>	<b>2.18 (0.13)</b>	<b>0.044</b>	<b>0.996</b>
	S9	1,362 (94)	0.77 (0.04)	0.074	0.981	<b>1,097 (100)</b>	<b>2.78 (0.38)</b>	<b>0.055</b>	<b>0.991</b>
	S10	<b>158 (2)</b>	<b>0.80 (0.02)</b>	<b>0.033</b>	<b>0.996</b>	638 (80)	0.37 (0.08)	0.111	0.974
	S11	<b>237 (5)</b>	<b>0.58 (0.02)</b>	<b>0.087</b>	<b>0.984</b>	342 (28)	2.91 (0.71)	0.250	0.895
	S12	<b>381 (6)</b>	<b>0.74 (0.03)</b>	<b>0.058</b>	<b>0.986</b>	618 (39)	1.38 (0.18)	0.093	0.981
	S13	<b>308 (6)</b>	<b>0.70 (0.03)</b>	<b>0.086</b>	<b>0.986</b>	493 (35)	1.58 (0.24)	0.134	0.969
TC	S1	<b>664 (14)</b>	<b>0.92 (0.02)</b>	<b>0.054</b>	<b>0.994</b>	2,144 (422)	0.39 (0.09)	0.070	0.993
	S2	<b>399 (4)</b>	<b>0.88 (0.02)</b>	<b>0.070</b>	<b>0.996</b>	1,280 (140)	0.43 (0.06)	0.091	0.994
	S3	<b>255 (3)</b>	<b>0.83 (0.02)</b>	<b>0.041</b>	<b>0.995</b>	833 (69)	0.46 (0.06)	0.051	0.992
	S4	<b>367 (3)</b>	<b>0.82 (0.02)</b>	<b>0.052</b>	<b>0.997</b>	891 (108)	0.67 (0.13)	0.096	0.981
	S5	<b>472 (4)</b>	<b>0.78 (0.02)</b>	<b>0.045</b>	<b>0.998</b>	748 (80)	1.28 (0.24)	0.117	0.969
	S6	<b>614 (8)</b>	<b>0.73 (0.01)</b>	<b>0.029</b>	<b>0.996</b>	717 (66)	2.05 (0.35)	0.091	0.972
	S7	<b>295 (10)</b>	<b>0.59 (0.04)</b>	<b>0.099</b>	<b>0.959</b>	412 (21)	2.54 (0.35)	0.112	0.967
	S8	828 (36)	0.71 (0.03)	0.078	0.982	<b>693 (27)</b>	<b>3.49 (0.27)</b>	<b>0.048</b>	<b>0.994</b>
	S9	1,601 (106)	0.78 (0.03)	0.053	0.987	<b>1,115 (92)</b>	<b>3.30 (0.40)</b>	<b>0.045</b>	<b>0.993</b>
	S10	<b>240 (3)</b>	<b>0.78 (0.02)</b>	<b>0.079</b>	<b>0.994</b>	652 (86)	0.64 (0.14)	0.159	0.963
	S11	<b>295 (6)</b>	<b>0.64 (0.02)</b>	<b>0.072</b>	<b>0.985</b>	438 (30)	2.12 (0.37)	0.160	0.953
	S12	<b>392 (6)</b>	<b>0.74 (0.03)</b>	<b>0.072</b>	<b>0.985</b>	618 (51)	1.41 (0.23)	0.115	0.972
	S13	<b>322 (6)</b>	<b>0.71 (0.03)</b>	<b>0.077</b>	<b>0.985</b>	521 (34)	1.48 (0.20)	0.104	0.977
CTC	S1	<b>1,745 (80)</b>	<b>1.11 (0.03)</b>	<b>0.099</b>	<b>0.993</b>	–	–	–	not fitted
	S2	<b>1,002 (26)</b>	<b>1.02 (0.02)</b>	<b>0.067</b>	<b>0.995</b>	–	–	–	not fitted
	S3	<b>417 (10)</b>	<b>0.74 (0.03)</b>	<b>0.069</b>	<b>0.985</b>	636 (80)	1.46 (0.34)	0.119	0.959
	S4	<b>547 (12)</b>	<b>0.77 (0.03)</b>	<b>0.066</b>	<b>0.989</b>	894 (117)	1.16 (0.24)	0.097	0.971
	S5	807 (22)	0.81 (0.03)	0.058	0.989	<b>1,117 (77)</b>	<b>1.29 (0.13)</b>	<b>0.053</b>	<b>0.994</b>
	S6	<b>1,009 (36)</b>	<b>0.70 (0.02)</b>	<b>0.045</b>	<b>0.990</b>	791 (64)	3.68 (0.53)	0.073	0.978
	S7	323 (12)	0.58 (0.04)	0.114	0.947	<b>418 (19)</b>	<b>2.81 (0.33)</b>	<b>0.078</b>	<b>0.977</b>
	S8	870 (41)	0.76 (0.04)	0.078	0.981	<b>853 (27)</b>	<b>2.34 (0.13)</b>	<b>0.049</b>	<b>0.998</b>
	S9	1,988 (131)	0.74 (0.03)	0.042	0.991	<b>1,057 (94)</b>	<b>5.34 (0.72)</b>	<b>0.038</b>	<b>0.991</b>
	S10	<b>511 (11)</b>	<b>0.86 (0.03)</b>	<b>0.052</b>	<b>0.990</b>	1,197 (153)	0.64 (0.11)	0.066	0.989
	S11	<b>371 (7)</b>	<b>0.67 (0.02)</b>	<b>0.088</b>	<b>0.987</b>	529 (33)	1.95 (0.27)	0.122	0.973
	S12	591 (24)	0.72 (0.05)	0.112	0.957	<b>727 (24)</b>	<b>1.89 (0.12)</b>	<b>0.049</b>	<b>0.995</b>
	S13	445 (12)	0.73 (0.03)	0.081	0.981	<b>606 (30)</b>	<b>1.73 (0.17)</b>	<b>0.054</b>	<b>0.990</b>
DC	S1	<b>1,329 (44)</b>	<b>1.33 (0.03)</b>	<b>0.064</b>	<b>0.995</b>	–	–	–	not fitted
	S2	<b>568 (6)</b>	<b>1.07 (0.02)</b>	<b>0.064</b>	<b>0.998</b>	–	–	–	not fitted
	S3	<b>350 (5)</b>	<b>1.04 (0.03)</b>	<b>0.055</b>	<b>0.993</b>	–	–	–	not fitted
	S4	<b>558 (6)</b>	<b>0.91 (0.02)</b>	<b>0.027</b>	<b>0.998</b>	2,136 (336)	0.33 (0.06)	0.035	0.996
	S5	763 (19)	0.86 (0.03)	0.048	0.990	<b>1,514 (114)</b>	<b>0.75 (0.07)</b>	<b>0.040</b>	<b>0.996</b>
	S6	<b>1,072 (44)</b>	<b>0.77 (0.03)</b>	<b>0.049</b>	<b>0.998</b>	1,050 (127)	2.19 (0.40)	0.072	0.978
	S7	352 (12)	0.57 (0.04)	0.096	0.957	<b>439 (23)</b>	<b>3.09 (0.42)</b>	<b>0.088</b>	<b>0.969</b>
	S8	1,063 (48)	0.81 (0.03)	0.071	0.987	<b>1,036 (46)</b>	<b>2.02 (0.14)</b>	<b>0.046</b>	<b>0.997</b>



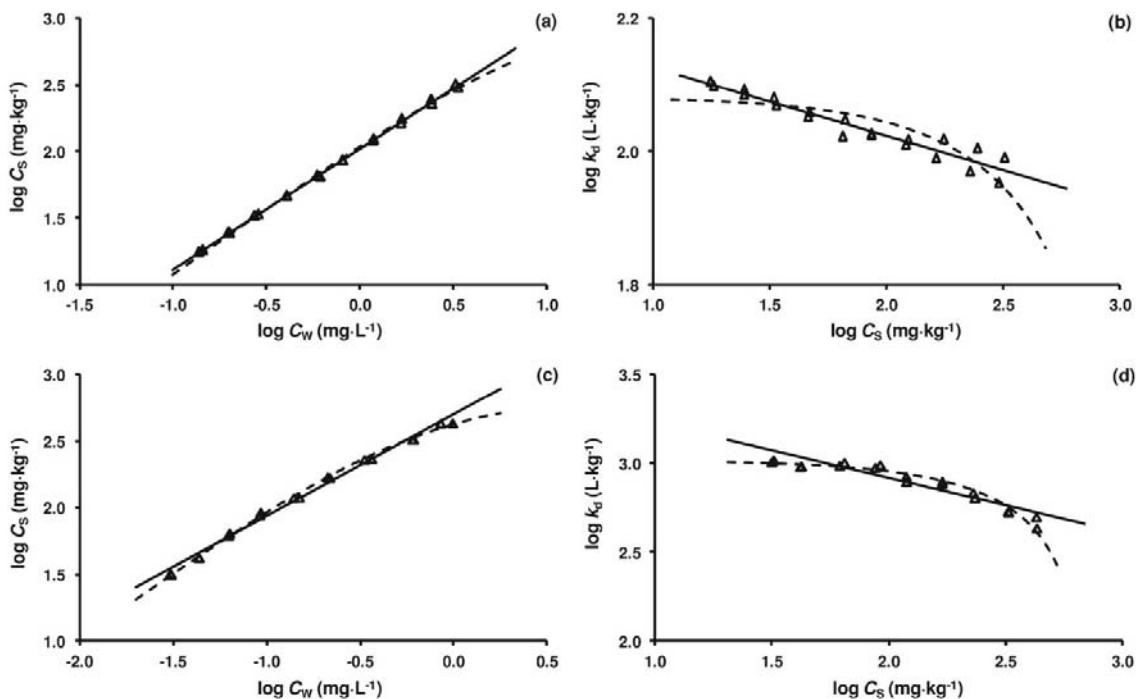
**Table 1** (continued)

Compound	Soil	Freundlich fit <sup>a</sup>				Langmuir fit <sup>b</sup>			
		$K_F$ ( $\text{mg}^{1-N}\text{L}^N\text{kg}^{-1}$ )	$N$ (unitless)	RMSE <sup>c</sup>	$r^2$	$b$ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	$K_L$ ( $\text{L mg}^{-1}$ )	RMSE <sup>c</sup>	$r^2$
	S9	1,903 (207)	0.70 (0.05)	0.056	0.978	<b>1,033 (130)</b>	<b>6.05 (1.20)</b>	<b>0.046</b>	<b>0.981</b>
	S10	<b>439 (8)</b>	<b>1.04 (0.04)</b>	<b>0.078</b>	<b>0.990</b>	–	–	–	not fitted
	S11	<b>422 (6)</b>	<b>0.70 (0.02)</b>	<b>0.050</b>	<b>0.993</b>	594 (451)	1.81 (2.87)	0.098	0.501
	S12	624 (19)	0.78 (0.04)	0.078	0.977	<b>885 (25)</b>	<b>1.37 (0.63)</b>	<b>0.043</b>	<b>0.998</b>
	S13	501 (14)	0.76 (0.03)	0.081	0.983	<b>702 (34)</b>	<b>1.50 (0.13)</b>	<b>0.045</b>	<b>0.994</b>

<sup>a</sup>Equation 3<sup>b</sup>Equation 4<sup>c</sup>Equation 6

soil characteristics and properties of tetracyclines, we have focused on the  $K_d$  prediction at 100- and 400- $\mu\text{g L}^{-1}$   $C_w$  levels. In order to elucidate most influential soil physico-chemical properties on sorption, a principal component analysis (PCA) data analysis prior to a PLS regression method was applied. From PCA loadings plots (Fig. S4), the most important soil descriptors found were: pH, OC, CEC, texture (clay and sand contents), alkali metals ( $\text{K}_2\text{O}$  and  $\text{Na}_2\text{O}$ ), transition metals ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), and  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Further details and analysis from PCA can be found in the

Electronic supplementary material. The PCA results allowed to attempt a PLS prediction model with a reduced set of soil descriptors. From an initial pool of 15 physico-chemical soil variables, PLS regression studies were conducted with the ten most significant variables. These soil properties, together with the  $\log K_d$  values for all tetracyclines at two  $C_w$  levels, were used to construct the PLS model. S1 to S9 soils were chosen as calibration samples, and S10 to S13 soils were used as external validation set to evaluate the prediction capability of the model. The number



**Fig. 1** Sorption isotherms for OTC (a and b) and DC (c and d) in S3 and S13 soils, respectively. The initial concentration range of tetracyclines in solution was 0.05–10  $\text{mg L}^{-1}$ . Symbols indicate experimental

data; solid and dashed lines stand for the Freundlich and Langmuir fittings, respectively

of latent variables (LVs) was determined by the leave-one-out cross-validation procedure (Esbensen 1994). In the calibration set, four LVs explained 94 % of the variance observed in the different  $\log K_{ds}$  for both concentration levels. At this step, the regression vectors from PLS analysis (Table S3) were used to estimate the magnitude of the effect that these ten variables produce on  $K_d$ . The most relevant soil descriptors were: pH, CEC,  $K_2O$ ,  $Al_2O_3$ , and clay content. So, a five-variable final PLS was performed subsequently taking into account only these descriptors. Although the calibration variable set was reduced to half, it explained practically the same variance than the ten-variable model (in this case, four LVs explained 93 % of the variance observed). Regression vectors from the five-variable PLS analysis can also be found in Table S3. The application of this five-variable model to the external validation set allowed  $K_{ds}$  prediction for all tetracyclines at low and high concentration levels, with errors between 1 and 4 % (as relative standard deviation, see Table S4). The good prediction capability is also illustrated in Figs. 2 and S5, showing the predicted against the experimental  $\log K_d$  values for OTC and the rest of the tetracycline family, respectively. Dashed lines in Figs. 2 and S5 evidenced that only five soil descriptors were able to well predict sorption with an accuracy factor of 1.5 ( $\pm 0.18$  log units).

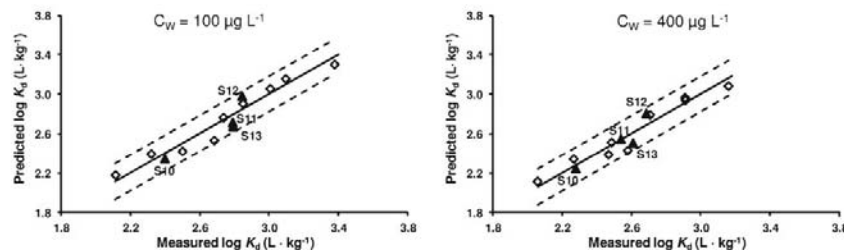
The good results obtained by the previous regressions led us to develop a PLS model able to predict other tetracyclines using the sorption data from OTC and the minimum number of soil descriptors. This model contains only the  $K_{d,OTC}$ , pH, and CEC for a given soil as input data. OTC was chosen because it is the most used tetracycline in veterinary practices in the European Union (Sarmah et al. 2006), and in most studies, OTC is often selected as the representative of the family. Soil pH and CEC were chosen because they were found to be the two most relevant soil descriptors. The application of this model was satisfactory, explaining up to 91.5 % of the  $\log K_d$  (at  $C_w=100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) variance, with prediction errors between 2 and 5 %. Figure S6 and Table S5 show the errors for the calibration and validation sets.

These reasonable predictions highlight the idea that it is possible to predict tetracycline family compounds from OTC sorption data. This fact corroborates the important role that the tetracycline common structure plays in sorption, which includes the dimethylamine and the phenolic  $\beta$ -diketone functional groups (labeled C and B in Fig. S1). Both ionizable groups have been directly related to CEC and metal bridging/surface complexation mechanisms, respectively (Figueroa et al. 2004; Sassman and Lee 2005). Differences in R1, R2, and R3 functional groups, which seem to have minor effect on  $pK_a$  values reported in Fig. S1, could be a secondary factor.

## Conclusions

Sorption of tetracyclines is strong, particularly for the more soluble tetracyclines, CTC and DC. Examination of sorption isotherms revealed several differences in tetracycline sorption behavior, being more evident at high  $C_w$ . The Freundlich equation satisfactorily described sorption in alkaline soils. Over nearly the entire circumneutral pH range, less soluble tetracyclines (OTC and TC) best fit the Freundlich model, whereas the more soluble tetracyclines (CTC and DC) best fit the Langmuir model. Finally, the sorption of all four tetracyclines in acidic soils was fitted to the Langmuir model. This indicates a CEC predominant mechanism (i.e., related to a more specific sorption on surface) especially at low-to-moderate soil pH values.

Multivariate analysis (PCA and PLS) of  $\log K_d$  (calculated at 100 and  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) led to a better understanding of the most important soil contributors to sorption. From the results, we may conclude that the five soil properties exhibiting higher influence were:  $\text{pH} > \text{CEC} > K_2O > Al_2O_3 > \text{clay content}$ . The present results highlight that tetracyclines sorb by several mechanisms: electrostatic attraction (Coulombic forces), cationic exchange, and surface complexation with metal oxides. Results from PLS also show the minor role that



**Fig. 2** PLS predicted OTC distribution coefficients (as  $\log K_d$ ) vs. measured  $\log K_d$ . Left and right sides correspond to calculated  $K_d$  values at  $C_w$  equal to 100 and  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. Open

diamonds indicate calibration data set, and closed triangles stand for external validation samples. Dashed lines indicate an accuracy factor of 1.5 ( $\pm 0.18$  log units)

OM plays in tetracycline sorption, compared to other antimicrobials, such as sulfonamides (Thiele-Bruhn et al. 2004).

Finally, we note that this is the first attempt to model and predict (using external samples) the distribution coefficients of the most heavily used tetracyclines without artificially altering soil properties. Moreover, a small number of descriptors captured most of the log  $K_d$  variance.

The PLS model that includes OTC sorption parameters, pH and CEC, exhibited good prediction capabilities for the other three tetracyclines. Although we have studied the most used tetracyclines (Oka et al. 2000), further studies should be conducted on the rest of the tetracyclines in order to generalize these findings to the entire compound family. Extrapolation of these results to natural ecosystems receiving tetracycline input should be performed with caution. In order to obtain a more accurate risk assessment, one must take into account the length of time of exposure, as well as the stability of these compounds in the environment.

**Acknowledgments** Funding for this research was provided by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project CTQ2010-20156). We thank Dr. J. J. Pignatello (CAES, New Haven, CT, USA) for helpful comments on the manuscript. The authors also acknowledge M. Aran from Applus+Agroambiental (Lleida, Spain), Dr. A. Rigol from Universitat de Barcelona (Spain) and Dr. F. Macías from Universidade de Santiago de Compostela (Spain) for providing soil samples. M. Teixidó also thanks Universitat de Barcelona for an APIF grant.

## References

- Aga DS, Goldfish R, Kulshrestha P (2003) Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst* 128:658–662
- Ahmed BM, Jee RD (1984) The acidity and solubility constants of tetracyclines in aqueous-solutions. *Anal Chim Acta* 166:329–333
- Avisar D, Primor O, Gozlan I, Mamane H (2010) Sorption of sulfonamides and tetracyclines to Montmorillonite clay. *Water Air Soil Pollut* 209:439–450
- Billo EJ (2001) *Excel for chemists: a comprehensive guide*. Wiley-VCH, New York, xxv, 483 p. pp
- Bogardus JB, Blackwood RK Jr (1979) Solubility of doxycycline in aqueous solution. *J Pharm Sci* 68:188–194
- Boxall AB, Kolpin DW, Halling-Sorensen B, Tolls J (2003) Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ Sci Technol* 37:286A–294A
- Chiou CT, Kile DE (1998) Deviations from sorption linearity on soils of polar and nonpolar organic compounds at low relative concentrations. *Environ Sci Technol* 32:338–343
- Esbensen K (1994) *Multivariate analysis in practice*. CAMO AS, Trondheim
- Essington ME (2004) *Soil and water chemistry. An integrative approach*. CRC Press, Berlin
- Figuerola-Diva RA, Vasudevan D, MacKay AA (2010) Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. *Chemosphere* 79:786–793
- Figuerola RA, Leonard A, MacKay AA (2004) Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environ Sci Technol* 38:476–483
- Giles CH, Smith D, Huitson A (1974) General treatment and classification of solute adsorption-isotherm. I. *Theor J Colloid Interface Sci* 47:755–765
- Gu C, Karthikeyan KG (2005) Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. *Environ Sci Technol* 39:9166–9173
- Gu C, Karthikeyan KG (2008) Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *J Environ Qual* 37:704–711
- Halling-Sorensen B, Sengelov G, Tjornelund J (2002) Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch Environ Contam Toxicol* 42:263–271
- Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, Nau H (2002) Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74:1509–1518
- Heuer H, Schmitt H, Smalla K (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 14:236–243
- Hinz C (2001) Description of sorption data with isotherm equations. *Geoderma* 102:405–406
- Jones AD, Bruland GL, Agrawal SG, Vasudevan D (2005) Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environ Toxicol Chem* 24:761–770
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1–13
- Kinniburgh DG (1986) General-purpose adsorption-isotherms. *Environ Sci Technol* 20:895–904
- Kulshrestha P, Giese RF Jr, Aga DS (2004) Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. *Environ Sci Technol* 38:4097–4105
- Leeson LJ, Krueger JE, Nash RA (1963) Concerning the structural assignment of the second and third acidity constants of the tetracycline antibiotics. *Tetrahedron Lett* 18:1155–1160
- Li LL, Huang LD, Chung RS, Fok KH, Zhang YS (2010a) Sorption and Dissipation of Tetracyclines in Soils and Compost. *Pedosphere* 20, 807–816
- Li Z, Chang PH, Jean JS, Jiang WT, Wang CJ (2010b) Interaction between tetracycline and smectite in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* 341:311–319
- Luo Y, Xu L, Rysz M, Wang Y, Zhang H, Alvarez PJ (2011) Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ Sci Technol* 45:1827–1833
- Martindale PK (1991) *The complete drug reference*. Pharmaceutical Press, London
- Nelson ML (1998) Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Adv Dent Res* 12:5–11
- OECD (2000) OECD guideline for testing of chemicals. Test no. 106: adsorption-desorption using a batch equilibrium method, France.
- Oka H, Ito Y, Matsumoto H (2000) Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A* 882:109–133
- Pils JR, Laird DA (2007) Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. *Environ Sci Technol* 41:1928–1933
- Pouliquen H, LeBris H (1996) Sorption of oxolinic acid and oxytetracycline to marine sediments. *Chemosphere* 33:801–815
- Qiang Z, Adams C (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38:2874–2890
- Rabolle M, Spliid NH (2000) Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40:715–722
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB (2006) A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of

- veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65:725–759
- Sassman SA, Lee LS (2005) Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environ Sci Technol* 39:7452–7459
- Sposito G (1984) *The surface chemistry of soils*. Oxford Univ. Press, New York
- Tanis E, Hanna K, Emmanuel E (2008) Experimental and modeling studies of sorption of tetracycline onto iron oxides-coated quartz. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* 327:57–63
- ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J (2006a) Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties. *Environ Toxicol Chem* 25:933–941
- ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J (2006b) The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environ Toxicol Chem* 25:904–911
- Thiele-Bruhn S, Seibicke T, Schulten HR, Leinweber P (2004) Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J Environ Qual* 33:1331–1342
- Thiele-Bruhn S, Beck IC (2005) Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* 59:457–465
- Tolls J (2001) Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ Sci Technol* 35:3397–3406
- Wang J, Hu J, Zhang S (2010) Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater. *J Colloid Interface Sci* 349:578–582
- Xing BS, Pignatello JJ, Gigliotti B (1996) Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environ Sci Technol* 30:2432–2440
- Zhao Y, Geng J, Wang X, Gu X, Gao S (2011) Tetracycline adsorption on kaolinite: pH, metal cations and humic acid effects. *Ecotoxicology* 20:1141–1147



## Electronic Supplementary Material

Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction

M. Teixidó, M. Granados, M.D. Prat and J.L. Beltrán\*.  
Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona.  
Martí i Franqués, 1-11. 08028 Barcelona, Catalonia (SPAIN)

\*Corresponding author phone: 0034 93 4039120; fax: 0034 934021233; e-mail:jlbeltran@ub.edu

## Contents

### Tables

**Table S1** Physicochemical properties of the soils.

**Table S2** Distribution Coefficients ( $K_d$ , L kg<sup>-1</sup>) of OTC, TC, CTC and DC in the studied soils.

**Table S3** Regression vector for each tetracycline obtained from Partial Least Squares (PLS).

**Table S4** log  $K_d$  prediction errors from PLS model (5-variable model).

**Table S5.** log  $K_d$  prediction errors for TC, CTC and DC. Model consists of log  $K_{d,OTC}$  and 5 soil properties.

### Figures

**Fig. S1** General structure of tetracyclines studied in the present work. Oxytetracycline distribution diagram as a function of pH and pK<sub>a</sub> values reported in literature (Martindale 1991).

**Fig. S2** Preliminary kinetic studies for OTC, TC, CTC and DC. Percentages of sorption for each tetracycline are plotted as a function of time in P1 (a) and P2 (b) soils. Initial spiking concentration: 5 mg L<sup>-1</sup>; soil-to-solution ratio: 1/50 (g mL<sup>-1</sup>). Symbols indicate: ■ OTC, ▲ TC, ▼ CTC and ♦ DC.

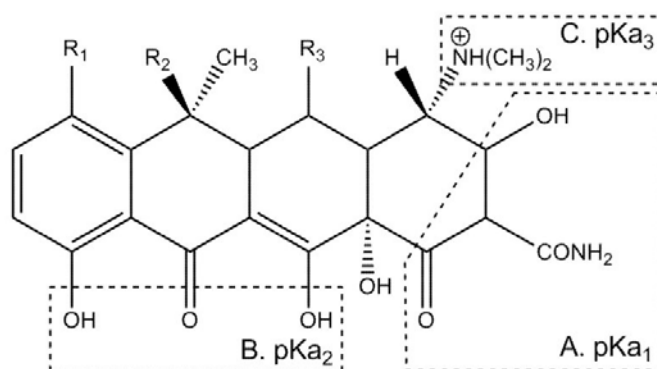
**Fig. S3** Effect of pH on the water solubility of OTC, TC, CTC and DC. Data calculated from literature reported solubility constants (Ahmed and Jee 1984, Bogardus and Blackwood 1979). Symbols indicate: ■ OTC, ▲ TC, ▼ CTC and ♦ DC. Dashed lines indicate the soil pH upper and lower limits in the present work.

### **Principal Component Analysis (PCA)**

**Fig. S4** PCA loadings plot of the first two principal components.

**Fig. S5** PLS predicted distribution coefficients (as log  $K_d$ ) of TC, CTC and DC vs. measured log  $K_d$ . PLS model was constructed with 5 soil descriptors. Left and right sides correspond to calculated  $K_d$  values at C<sub>w</sub> equal to 100 and 400 µg L<sup>-1</sup>, respectively. Open diamonds indicate calibration data set and closed triangles stand for external validation samples. Dashed lines indicate an accuracy factor of 1.5 (±0.18 log units).

**Fig. S6** PLS predicted distribution coefficients (as log  $K_d$ ) of TC, CTC and DC vs. measured log  $K_d$ .  $K_d$  values were calculated at C<sub>w</sub> equal to 100 µg L<sup>-1</sup>. Three descriptors were used in the PLS model. Open diamonds indicate calibration data set and closed triangles stand for external validation samples. Dashed lines indicate an accuracy factor of 1.5 (±0.18 log units).



Antibiotic	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a3</sub>
Oxytetracycline	H	OH	OH	3.3	7.3	9.1
Tetracycline	H	OH	H	3.3	7.7	9.7
Chlortetracycline	Cl	OH	H	3.3	7.4	9.3
Doxycycline	H	H	OH	3.5	7.7	9.5

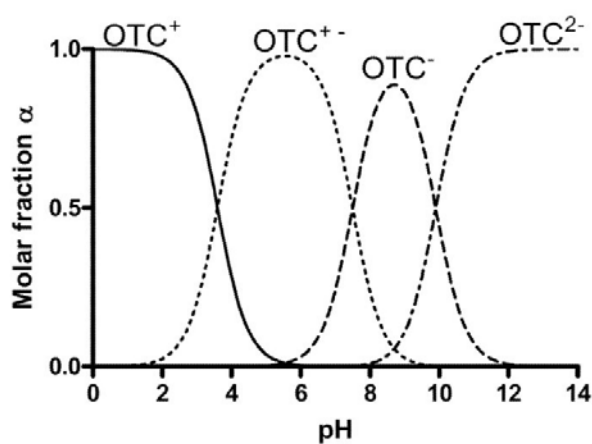


Fig. S1



**Table S1** Physicochemical properties of the soils.

Soil name	pH <sup>a</sup>	OC (%) <sup>b</sup>	CEC (meq/100g) <sup>c</sup>	Clay (%) <sup>c</sup>	Sand (%)	Texture (USDA)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%) <sup>d</sup>	MnO <sub>2</sub> (%) <sup>d</sup>	CaO (%) <sup>d</sup>	K <sub>2</sub> O (%) <sup>d</sup>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%) <sup>d</sup>	SiO <sub>2</sub> (%) <sup>d</sup>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%) <sup>d</sup>	MgO (%) <sup>d</sup>	Na <sub>2</sub> O (%) <sup>d</sup>	
P1	7.90	1.60	-	38.00	-	Silty clay loam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	5.90	8.40	-	15.80	-	Sandy loam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S1	8.20	1.14	17.10	30.90	13.60	Silty clay loam	4.01	0.06	25.4	1.71	0.13	36.32	9.95	1.44	0.21	
S2	8.10	2.30	15.40	29.10	29.10	Clay loam	2.65	0.04	30.84	1.37	0.18	30.32	6.64	1.82	0.26	
S3	8.00	1.00	12.10	34.00	7.70	Clay loam	5.27	0.09	15.06	2.90	0.16	45.33	13.86	2.87	0.72	
S4	7.90	2.62	13.80	19.60	51.50	Loam	4.47	0.09	10.72	2.15	0.14	48.48	11.60	2.14	0.55	
S5	6.70	5.41	22.00	13.70	52.50	Silty clay	7.42	0.14	4.72	3.38	0.55	54.60	17.31	3.85	0.72	
S6	6.50	8.78	24.30	11.30	36.70	Silty loam	8.80	0.16	3.08	3.52	0.70	55.47	19.39	2.07	1.23	
S7	5.30	1.90	6.50	10.90	56.40	Sandy loam	1.57	0.06	0.25	1.91	0.08	84.32	7.06	0.35	0.71	
S8	5.00	1.00	12.30	20.50	36.70	Loam	10.9	0.22	1.26	1.71	0.20	56.65	19.14	2.52	0.64	
S9	3.88	7.26	21.50	8.70	81.00	Sandy loam	2.90	0.04	0.59	3.71	0.34	67.11	17.94	0.35	2.60	
S10	8.20	1.45	10.60	23.70	38.60	Loam	5.29	0.08	7.37	2.41	0.15	61.76	12.9	1.38	0.51	
S11	7.20	2.53	11.00	10.50	76.00	Sandy loam	4.29	0.13	0.94	1.79	0.09	79.19	9.63	0.60	0.14	
S12	6.20	5.12	16.10	10.30	72.20	Silty clay	8.88	0.17	2.24	3.41	0.57	55.02	20.69	2.26	1.07	
S13	6.00	1.70	12.10	22.20	47.60	Loam	6.15	0.10	0.72	3.10	0.30	66.75	16.65	1.32	0.18	

<sup>a</sup> pH measured after equilibration of 1 g soil in 50 mL of CaCl<sub>2</sub> 0.01M.<sup>b</sup> Determined by Walkley-Black method.<sup>c</sup> Determined by Ammonium Acetate extraction method.<sup>d</sup> Determined by X-Ray Fluorescence (XRF) elemental analysis.

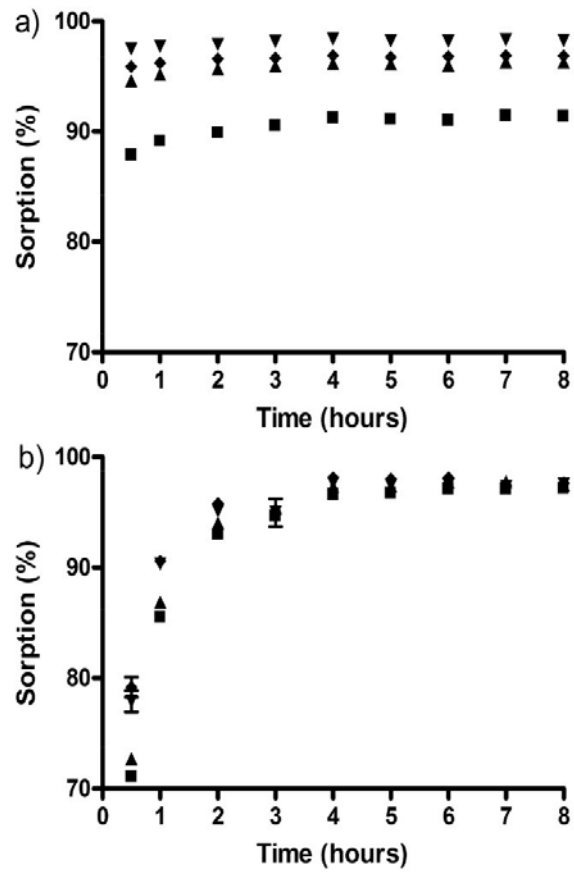


Fig. S2

**Table S2** Calculated distribution coefficients ( $\log K_d$ ) of OTC, TC, CTC and DC in the studied soils.

Soil name	$C_w = 100 \mu\text{g L}^{-1}$				$C_w = 400 \mu\text{g L}^{-1}$			
	OTC	TC	CTC	DC	OTC	TC	CTC	DC
S1	2.50	2.90	3.13	2.79	2.47	2.85	3.20	2.99
S2	2.32	2.72	2.98	2.69	2.27	2.65	2.99	2.73
S3	2.11	2.57	2.88	2.51	2.06	2.47	2.72	2.53
S4	2.68	2.74	2.96	2.84	2.58	2.64	2.83	2.78
S5	2.85	2.89	3.11	3.02	2.71	2.76	2.98	2.94
S6	3.01	3.06	3.30	3.26	2.91	2.90	3.12	3.12
S7	2.74	2.88	2.96	3.02	2.49	2.63	2.74	2.78
S8	3.10	3.25	3.21	3.24	2.91	3.00	3.01	3.06
S9	3.38	3.44	3.57	3.59	3.16	3.20	3.26	3.26
S10	2.40	2.60	2.85	2.60	2.28	2.47	2.76	2.63
S11	2.79	2.83	2.90	2.92	2.54	2.61	2.70	2.74
S12	2.84	2.85	3.06	3.03	2.69	2.70	2.89	2.89
S13	2.79	2.79	2.95	2.96	2.61	2.62	2.79	2.82

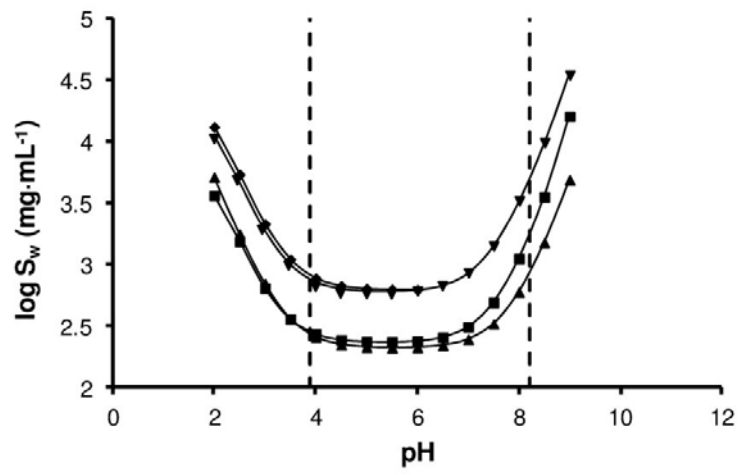


Fig. S3

### Principal Component Analysis (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) was conducted over the full data matrix, consisting of the  $\log K_d$  values (calculated from the corresponding isotherm equations) at 100 and 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentration levels and all soil properties (Tables S1 and S2). Results indicate that 12 principal components (PC) captured the entire variance of the data matrix. Eventually, a 5-PC model was chosen because the first five PCs captured about 95% of total variance and the 5-th PC had an eigenvalue less than unity, probably not describing any systematic variance in the system (Wise 2004). As indicated by their relative positions in the loadings plot (Fig. S4),  $\log K_d$  values were negatively correlated with pH. This fact could be easily explained by electrostatic interactions between soil sites and ionized tetracyclines. Mineral surface of clays is negatively charged at typical soil pH range due to isomorphous substitution as well as OM functional groups (Sposito 1984). Hence cationic/zwitterionic species of tetracyclines with their positive charged moieties might be electrostatically attracted, promoting sorption in acid soils (Sassman and Lee 2005). Meanwhile, anionic species would be repulsed at high pH. We note that CEC was an important sorption contributor, particularly for CTC at high  $C_w$  values. Sorption of DC, TC and OTC was also affected by CEC, but in lesser extent. Several authors highlighted that CTC high sorption is related to its water solubility. In contrast, DC exhibiting similar water solubility (Fig. S3), shows much less strength of relationship with CEC. Figueroa et al. (2005) suggested that the dimethylamine group (B-group in Fig. S1) is the main contributor via CEC sorption mechanisms. In the case of DC, the CEC mechanisms could be hindered due to steric hindrance of OH group on  $R_3$  (Fig. S1). Transition metal content was positively correlated with  $\log K_d$  for all tetracyclines. This is explained by surface complexation mechanisms between metal oxides ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  rather than  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ) and the hydroxyl groups present in molecules of tetracyclines -A and B groups in Fig. S1- (Jones et al. 2005, Nelson 1998, Tanis et al. 2008). In particular, manganese oxide ( $\text{MnO}_2$ ) was correlated to sorption of tetracyclines in lesser extent compared to iron content, which was more correlated to CTC sorption. Finally, an inverse correlation was apparent between  $\log K_d$  and CaO content. Nevertheless, it is a consequence of the high intercorrelation between CaO content and pH (calcium might be in carbonate form, increasing soil pH values).

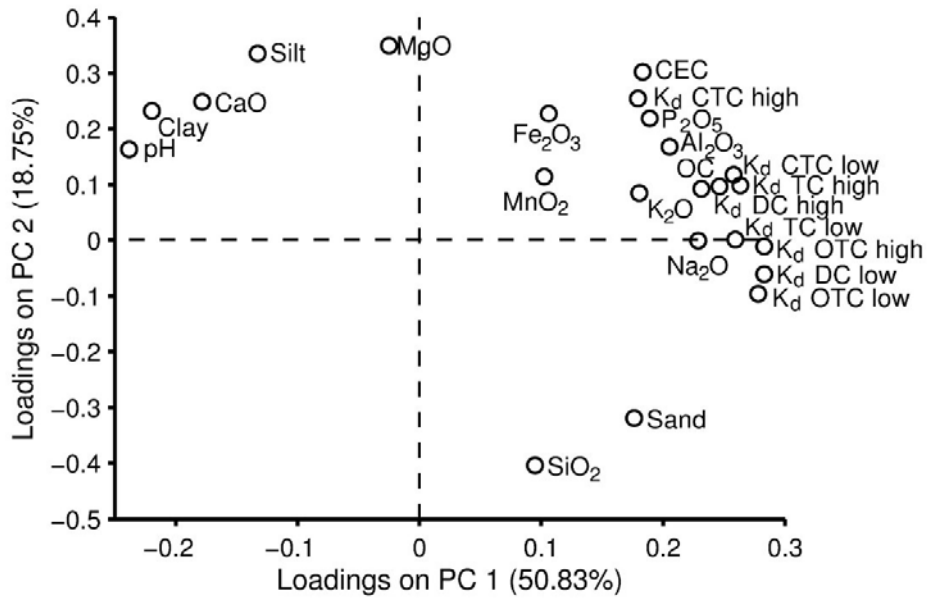


Fig. S4

**Table S3** Regression vector for each tetracycline obtained from Partial Least squares (PLS).

		pH <sup>a</sup>	OC (%)	CEC (meq/100g)	Clay (%)	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	MnO <sub>2</sub> (%)	K <sub>2</sub> O (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (%)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (%)	Na <sub>2</sub> O (%)	Intercept
10-variable model	OTC	-0.130	0.009	0.022	-0.008	0.014	0.276	-0.154	-0.234	0.015	0.155	3.377
	TC	-0.111	0.005	0.029	-0.003	0.012	-0.157	-0.202	-0.304	0.012	0.131	3.503
	CTC	-0.068	0.010	0.028	0.000	0.005	-0.506	-0.135	-0.148	0.009	0.107	3.267
	DC	-0.112	0.009	0.020	-0.006	0.009	-0.018	-0.132	-0.206	0.012	0.146	3.541
10-variable model	OTC	-0.108	0.010	0.028	-0.004	0.015	0.124	-0.162	-0.189	0.015	0.134	2.982
	TC	-0.087	0.006	0.033	0.001	0.011	-0.381	-0.200	-0.257	0.011	0.111	3.104
	CTC	-0.051	0.008	0.039	0.005	0.007	-0.779	-0.188	-0.176	0.008	0.086	2.927
	DC	-0.074	0.007	0.030	0.000	0.011	-0.266	-0.161	-0.175	0.010	0.099	3.079
5-variable model	OTC	-0.131	-	0.023	-0.016	-	-	-0.181	-	0.028	-	3.630
	TC	-0.167	-	0.033	0.000	-	-	-0.145	-	0.001	-	3.864
	CTC	-0.134	-	0.034	0.006	-	-	-0.042	-	-0.006	-	3.524
	DC	-0.156	-	0.025	-0.007	-	-	-0.104	-	0.010	-	3.880
5-variable model	OTC	-0.102	-	0.029	-0.013	-	-	-0.186	-	0.028	-	3.157
	TC	-0.140	-	0.037	0.004	-	-	-0.138	-	-0.001	-	3.394
	CTC	-0.116	-	0.045	0.012	-	-	-0.116	-	-0.008	-	3.194
	DC	-0.104	-	0.033	0.000	-	-	-0.144	-	0.008	-	3.309

**Table S4**  $\log K_{ow}$  prediction errors from PLS model (5-variable model).

Compound	Prediction Relative Error (%)			
	Calibration set		External validation set	
	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ level	400 $\mu\text{g L}^{-1}$ level	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ level	400 $\mu\text{g L}^{-1}$ level
Oxytetracycline	2.81	2.97	3.79	3.16
Tetracycline	2.20	2.25	2.08	1.72
Chlortetracycline	1.74	1.84	2.31	3.67
Doxycycline	1.81	2.32	1.61	1.31



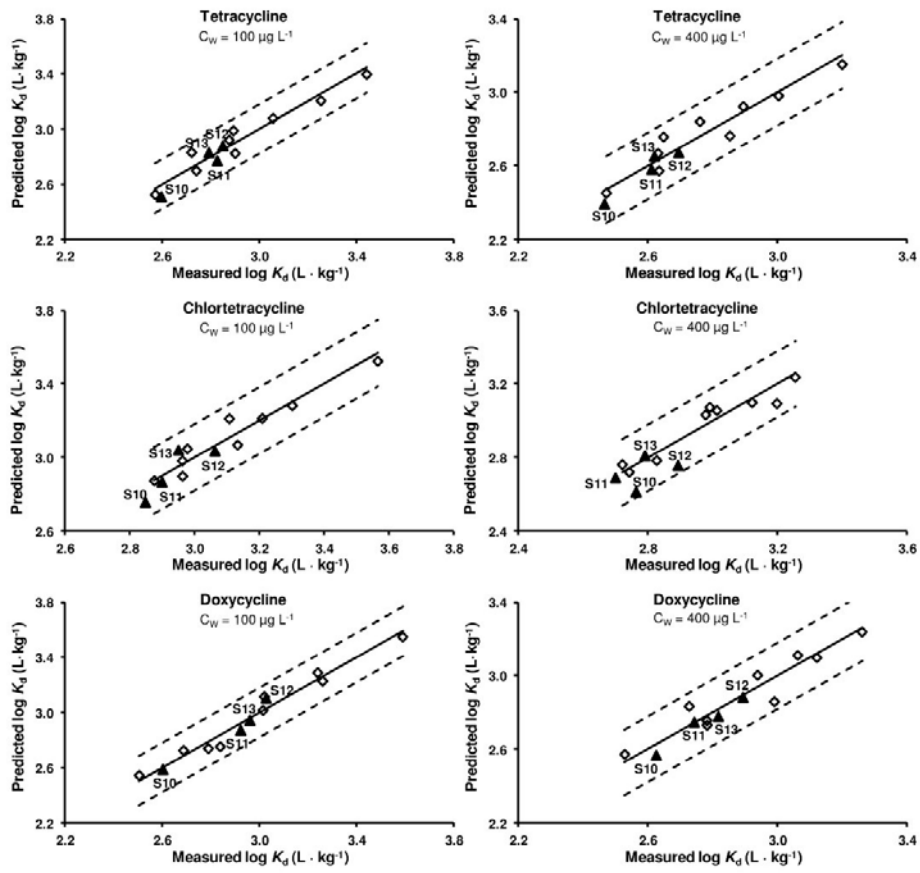


Fig. S5

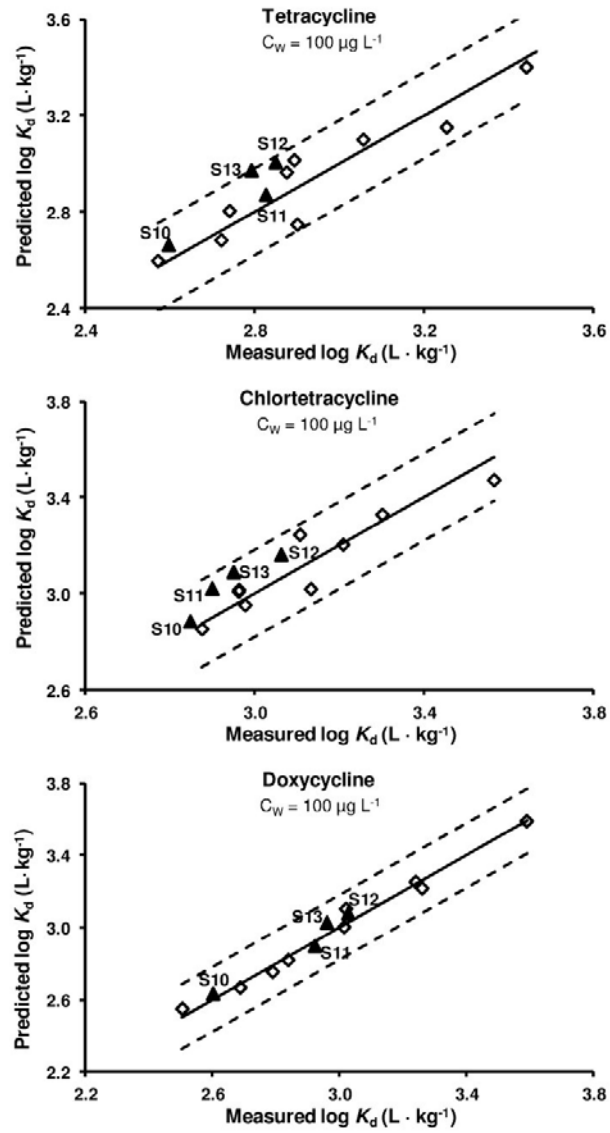


Fig. S6

**Table S5.**  $\log K_d$  (calculated at  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) prediction error for TC, CTC and DC. Model consists of  $\log K_{d,OTC}$  and 2 soil properties.

Compound	Prediction Relative Error (%)	
	Calibration set	External validation set
Tetracycline	2.91	4.52
Chlortetracycline	2.32	3.61
Doxycycline	1.27	1.56

**References**

- Ahmed BM, Jee RD (1984): The acidity and solubility constants of tetracyclines in aqueous-solutions  
*Analytica Chimica Acta* 166, 329-333
- Bogardus JB, Blackwood RK, Jr. (1979): Solubility of doxycycline in aqueous solution. *J Pharm Sci* 68, 188-94
- Jones AD, Bruland GL, Agrawal SG, Vasudevan D (2005): Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environ Toxicol Chem* 24, 761-70
- Martindale PK (1991): The complete drug reference. Pharmaceutical Press, London
- Nelson ML (1998): Chemical and biological dynamics of tetracyclines. *Adv Dent Res* 12, 5-11
- Sassman SA, Lee LS (2005): Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environ Sci Technol* 39, 7452-9
- Sposito G (1984): The Surface Chemistry of Soils. Oxford Univ. Press, New York.
- Tanis E, Hanna K, Emmanuel E (2008): Experimental and modeling studies of sorption of tetracycline onto iron oxides-coated quartz. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 327, 57-63
- Wise BM, Gallagher, N.B., Bro R., Shaver, J.M., Windig, W., Koch, R.S. (2004): PLS\_Toolbox 3.5 for use with MATLAB. Eigenvector Research, Inc.



#### 4.1.2. Discussió dels resultats

En iniciar la present tesi doctoral la bibliografia existent sobre la sorció de tetraciclins en sòls naturals era bastant limitada. Fins aquell moment, els estudis s'havien centrat quasi exclusivament en la sorció d'OTC en les fraccions pures del sòl, com argiles de referència [4-5], hidròxids d'Al i Fe [6], i àcids húmics [7]. Els treballs realitzats en aquests sistemes simples, coincideixen en que el valor de  $K_d$  depèn inversament del pH i la força iònica [8-11], i proposen tant el bescanvi catiònic com la formació de complexos com a possibles mecanismes de sorció [4-5]. Només l'estudi presentat per Pils *et al.* [12], proporcionava una primera informació sobre diferències en la sorció entre tetraciclins. Aquests autors van observar que la magnitud de la sorció de CTC era superior a la sorció de TC en totes les fraccions pures estudiades (argiles, substàncies húmiques i mescles entre substàncies húmiques i argila).

Pel que fa a la sorció en sòls, els estudis realitzats anteriorment remarcaven l'elevada sorció que presenta l'OTC en comparació amb agents antimicrobians d'altres famílies, com el metronidazole, l'olaquinox i la tilosina [13]. En aquests treballs s'indica que pH, CEC, textura i contingut de Fe i Al influeixen sobre la sorció [14-17], tot i que hi ha controvèrsia sobre quins descriptors del sòl són més rellevants. Tanmateix, es tracta d'estudis focalitzats en escenaris molt concrets, el que dificulta l'obtenció de conclusions globals sobre el comportament de les tetraciclins en el medi ambient. A més, els models de predicció desenvolupats solen presentar una baixa capacitat de predicció de  $K_d$  [16].

El aquesta tesi s'avalua de forma quantitativa la sorció d'OTC, TC, CTC i DC en un conjunt de sòls que intenten cobrir un ampli interval de propietats fisicoquímiques. Per a tots els sistemes s'han obtingut les isoterms de sorció. L'ajust d'aquestes isoterms als models de sorció més adients és una etapa crucial per tal d'avaluar la magnitud de la sorció ( $K_d$ ) dins un interval de concentracions de solut. En aquest sentit, cal recordar que un ajust deficient, a causa d'una selecció errònia de tipus d'equació de la isoterma, pot comportar errors importants en els posteriors models de transport que se'n derivaran [18].

En la present tesi, l'ajust de les dades experimentals als diferents models s'ha realitzat mitjançant regressió no lineal per mínims quadrats o NLLS (*nonlinear least squares*) minimitzant la funció descrita en la següent equació [19]:

$$U = \sum_{i=1}^m \left( \frac{C_{s,exp,i} - C_{s,calc,i}}{C_{s,exp,i}} \right)^2 \quad (4.1)$$

On  $C_{s,exp,i}$  i  $C_{s,calc,i}$  són la concentració en fase sòlida experimental i calculada mitjançant el model, respectivament. La inclusió de la ponderació a través de  $C_{s,exp,i}$  al denominador de l'equació 4.1, permet que tots els punts presentin el mateix pes estadístic i evita que els punts corresponents a altes concentracions de solut tinguin més influència en el model. D'aquesta manera, es garanteix que els punts corresponents a baixes concentracions, generalment més rellevants des d'un punt de vista mediambiental, resultin ben ajustats. Aquesta funció s'ha minimitzat mitjançant l'eina *Solver* que es troba integrada dins el programa Microsoft Excel™.

### La selecció de la isoterma

Per tal d'assolir el millor ajust possible, és convenient seguir dues etapes. En primer lloc, és recomanable un examen de la forma de la isoterma a escala lineal o logarítmica. A més a més, donada la dependència de  $K_d$  amb la concentració del solut, fer una observació d'altres representacions, com  $K_d$  vs.  $C_s$  o  $K_d$  vs.  $C_w$ , pot facilitar la selecció dels models que puguin resultar més adequats [20]. En segon lloc, l'elecció del model es confirma mitjançant el criteri proposat per Kinniburgh [19], que selecciona el model que presenta un menor error quadràtic mitjà de residuals (RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\left( \frac{U}{m-p} \right)} \quad (4.2)$$

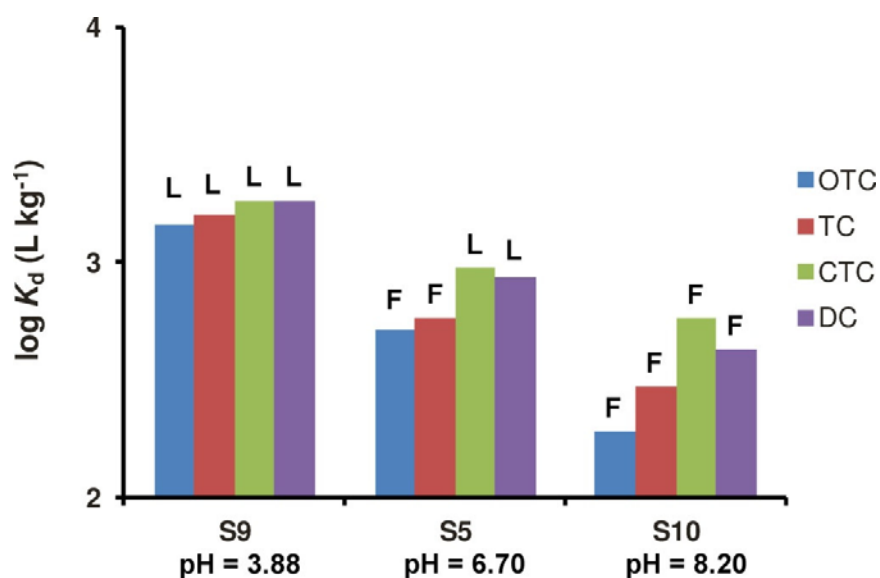
on  $m$  i  $p$  corresponen al nombre de punts experimentals i de paràmetres ajustables de l'equació en qüestió, respectivament.

Pel que fa a aquest estudi, es van ajustar les dades a un ampli grup de models d'isoterma (p. ex. Freundlich, Langmuir, Langmuir-Freundlich, BET, *two-site* Langmuir, *modified* Langmuir, Redlich-Peterson, Toth i Aranovich-Donohue) [20], per tal de minimitzar la suma de quadrats d'errors residuals (equació 4.1). Els models de Langmuir (equació 2.2) o Freundlich (equació 2.3) han proporcionat un millor ajust (mínim RMSE i un menor nombre de paràmetres) en tots els sistemes tetraciclina-sòl estudiats.

El model més adient per descriure la sorció de totes les tetraciclines en sòls àcids ( $3.88 < \text{pH} < 5.00$ ) ha estat el de Langmuir. En canvi, l'equació de Freundlich ha resultat ser la més idònia pels sòls bàsics ( $\text{pH} > 7.00$ ). En el cas dels sòls de pH moderadament àcid i neutre ( $5.30 < \text{pH} < 7.00$ ), les dades de sorció corresponents a OTC i TC presentaven un millor ajust al model de Freundlich, a diferència de les dades de CTC i DC, que s'ajustaven satisfactòriament al model de Langmuir. La transició que experimenten aquests sistemes des d'un model de Langmuir fins a un model de Freundlich, en augmentar el pH del sòl, s'explica pel predomini del bescanvi catiònic en la sorció en sòls àcids/neutres on les espècies catiònica i zwitteriònica són les majoritàries. En la mateixa línia, Figueroa *et al.* [4] van observar evidències que aquest mecanisme de bescanvi pot predominar fins a pH 5.5. En canvi, a valors de pH superiors, el mecanisme de bescanvi catiònic perd rellevància, ja que les tetraciclines es troben majoritàriament en la seva forma aniònica. En aquestes condicions la sorció es pot explicar per un conjunt d'interaccions, com la formació de complexos amb òxids metàl·lics, *cation bridging* amb un catió bescanvable, interaccions polars entre grups funcionals (ponts d'hidrogen), etc.

Un cop ajustades les dades experimentals als models de Freundlich o Langmuir, s'han calculat els valors de  $K_d$  tenint en compte els paràmetres corresponents a cada isoterma. Tant els valors de  $K_d$  com els paràmetres de sorció relacionats amb la intensitat de la sorció ( $K_F$  o  $K_L$  en el cas de Freundlich o Langmuir, respectivament), han posat de manifest que les tetraciclines queden fortament retingudes en tots els sòls, són de l'ordre dels reportats per altres autors (Taula 2.4, pàgines 50-51) i són significativament superiors a altres fàrmacs presents en el medi ambient [21]. D'altra banda, en les tetraciclines estudiades s'han trobat diferències pel que fa a la magnitud de sorció. Així, les tetraciclines més solubles en aigua (CTC i DC), presenten generalment uns valors de  $K_d$  superiors en comparació amb les menys solubles (OTC i TC). A més a més, aquestes diferències solen ser més evidents a mesura que s'augmenta el pH del sòl i la concentració de sorbat. A tall d'exemple es mostren els valors de  $K_d$  corresponents a tres sòls estudiats, els quals representen un pH àcid, intermedi i alcalí (Figura 4.1).





**Figura 4.1.** Log  $K_d$  calculats mitjançant el model de Langmuir (L) o Freundlich (F) per a tres sòls, a una  $C_w$  de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### Anàlisi multivariant i predicció de la magnitud de sorció

L'estudi de les principals propietats fisicoquímiques del sòl involucrades en la sorció de les tetraciclins i la predicció de la sorció d'aquestes, es va realitzar mitjançant l'anàlisi per components principals o PCA (*principal component analysis*) i la regressió per mínims quadrats parcials o PLS (*partial least squares regression*).

El PCA és un mètode matemàtic utilitzat per trobar relacions entre les variables que descriuen un sistema. Aquest mètode es caracteritza per formar combinacions lineals de les variables originals que resulten en noves variables ortogonals, no correlacionades, anomenades components principals o PCs (*principal components*). La informació més rellevant sobre les dades es troba generalment en els primers PCs, que són els que capturen més variància de les dades experimentals. Des d'un punt de vista matemàtic, és possible descompondre la matriu de les dades originals ( $X$ , de dimensió  $13 \times 19$ ), que conté els valors de log  $K_d$  per a cada tetraciclina i les propietats fisicoquímiques (15 descriptors) de cadascun dels 13 sòls:

$$X = T P^T + E \quad (4.3)$$

Aquesta descomposició dona lloc a 3 noves matrius:  $T$ ,  $P^T$  i  $E$ .  $T$  és la matriu de *scores* ( $13 \times \text{PCs}$ ),  $P^T$  és la matriu transposada de *loadings* ( $\text{PCs} \times 19$ ) i  $E$  correspon a la matriu de residuals ( $13 \times 19$ ). Els *scores* corresponen als valors (coordenades) que presenten les mostres (sòls estudiats) en aquest nou espai i els *loadings* indiquen la importància que té cada una de les variables (valors de  $K_d$  i propietats fisicoquímiques) en cada component [22]. La representació dels *scores* i *loadings* permeten interpretar les causes de la variabilitat de les dades i ordenar-les per ordre d'importància.

Atès que les variables no són de la mateixa magnitud i tenen unitats diferents, s'ha realitzat un pretractament de les dades que consisteix en un autoescalat abans del PCA.

L'aplicació del PCA a les dades indica que els descriptors del sòl amb més influència sobre  $K_d$  són pH, OC, CEC, textura (argila i sorra), metalls alcalins ( $K_2O$  i  $Na_2O$ ), metalls de transició ( $Fe_2O_3$  i  $Al_2O_3$ ) i  $P_2O_5$ .

Posteriorment, es van realitzar els estudis de PLS amb les 10 variables identificades prèviament per PCA. El PLS presenta errors de predicció inferiors a d'altres mètodes multivariants i es tracta d'un mètode recomanable quan existeixen variables amb un elevat grau de col·linealitat [23-24]. En aquest treball, s'ha emprat la versió PLS2, la qual realitza la modelització utilitzant totes les variables de resposta, és a dir, els log  $K_d$  corresponents a les 4 tetraciclins. Per tal de construir el model s'han emprat 9 sòls amb una avaluació creuada (*leave-one-out*). Finalment, aquest model s'ha validat amb 4 sòls no presents en el conjunt de calibratge. L'anàlisi de dades per PLS permet calcular el nombre de variables latents o LVs (*latent variables*) a partir d'una matriu  $X$  (que conté els descriptors) i una matriu  $Y$  (que conté les variables dependents, en el nostre cas els valors de log  $K_d$ ):

$$X = T P^T + E \quad (4.4)$$

$$Y = U Q^T + F \quad (4.5)$$

On  $T$  i  $P^T$  corresponen a les matrius de *scores* ( $9 \times \text{LVs}$ ) i *loadings* ( $\text{LVs} \times 10$ ) associades a la matriu  $X$  ( $9 \times 10$ );  $U$  i  $Q^T$  són les matrius de *scores* ( $9 \times \text{LVs}$ ) i *loadings* ( $\text{LVs} \times 4$ ) associades a la matriu  $Y$  ( $9 \times 4$ ).  $E$  i  $F$  són les matrius de residuals que contenen la informació no explicada de  $X$  i  $Y$ , respectivament.

L'anàlisi per PLS ha permès identificar els 5 principals descriptors que expliquen la variabilitat dels valors de log  $K_d$ . Aquests descriptors en ordre decreixent d'importància

són pH, CEC,  $K_2O$ ,  $Al_2O_3$  i argila. Els models obtinguts proporcionen bones prediccions de  $\log K_d$ , amb errors relatius <5 %.

D'altra banda, també s'ha desenvolupat un model que permet la predicció de  $\log K_d$  de TC, CTC i DC a partir de les dades de sorció corresponents a l'OTC ( $\log K_{d,OTC}$ ) i els dos descriptors del sòl més rellevants (pH i CEC) amb resultats satisfactoris. Aquest fet posa de manifest la importància en la sorció que té l'estructura comú de les tetraciclins, que inclou tant el grup dimetilamino involucrat en el bescanvi catiònic (important a valors de pH del sòl àcids), com el grup  $\beta$ -dicetona involucrat en la complexació i *cation bridging* en superfície (rellevant pels sòls amb un pH intermedi/alt) [4].

Aquest estudi també ha constatat el poc efecte que presenta la matèria orgànica en la sorció de les tetraciclins als sòls. Tal com s'ha comentat en la introducció, els estudis previs realitzats amb fraccions pures o grups reduïts de sòls arribaven a conclusions contradictòries pel que fa al rol de la matèria orgànica. Per exemple, mentre que en els estudis de realitzats per Ter Laak *et al.* [16] s'arriba a la conclusió que la matèria orgànica té una gran influència sobre la sorció, només superada pel pH, l'estudi de Jones *et al.* [15] no mostra cap correlació significativa entre sorció i matèria orgànica. Altres estudis més recents també han corroborat el poc efecte de la matèria orgànica en la sorció de tetraciclins en sòls [25-26], fet que contrasta amb altres antimicrobians, com per exemple les sulfonamides [21].

Finalment, cal indicar que tots els sistemes sòl-tetraciclina estudiats en aquesta tesi han mostrat una forta sorció, la qual cosa indica que les tetraciclins són compostos que un cop introduïts al sòl presenten un baix risc de dispersió a altres compartiments ambientals.

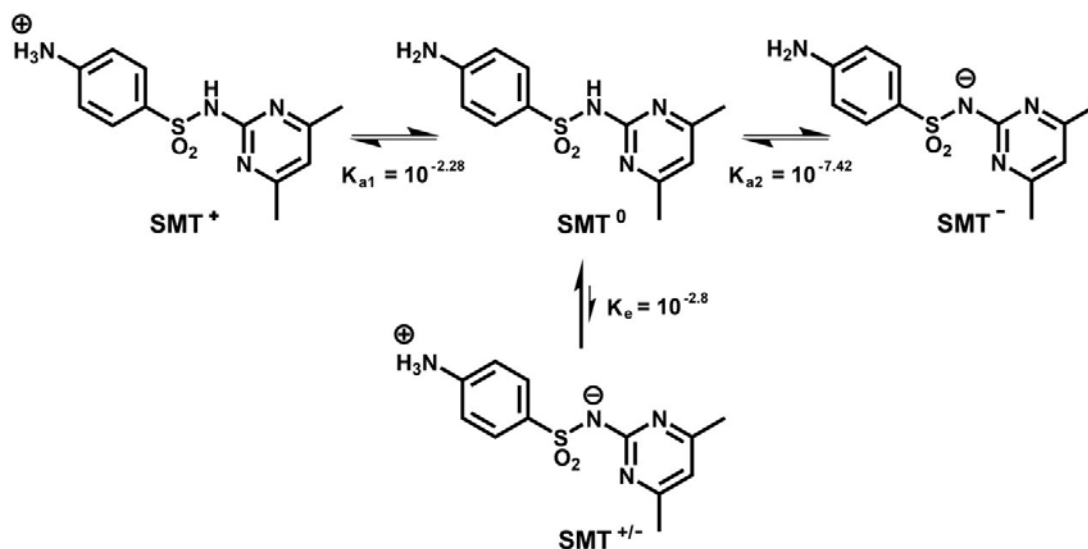
## 4.2. Sorció de sulfametazina en biochar i mescles sòl-biochar

En el darrers anys, l'estudi del destí ambiental de les sulfonamides s'ha intensificat a causa de diverses raons. D'una banda, es tracta d'una de les principals famílies emprades en medicina veterinària [27-28]. D'altra banda, les sulfonamides presenten una elevada mobilitat en el sòl, que facilita la seva lixiviació cap a aigües subterrànies i el seu transport cap a aigües superficials [29]. Els estudis realitzats durant la última dècada han confirmat que l'addició de fems pot reduir significativament la sorció de sulfonamides en sòl, mitjançant un increment del pH o bloquejant possibles setis de sorció, facilitant encara més la seva dispersió en el medi ambient [30-31]. En aquest escenari, és interessant trobar sistemes que puguin reduir la seva mobilitat.

Durant els últims anys, el biochar s'ha estudiat com a sistema de remeiació en sòls contaminats amb contaminants orgànics hidrofòbics (com PAH, PCB, pesticides, herbicides, etc) [32-36] i ions metàl·lics [37-39]. Tenint en compte que el biochar presenta una superfície altament porosa (amb una superfície específica relativament alta) i amb grups funcionals polars (carboxils, fenols, etc.), sembla un bon candidat per retenir sulfonamides amb una elevada mobilitat. En aquest capítol s'estudia el potencial de diferents biochars per tal de disminuir aquesta mobilitat en el sòl.

S'ha seleccionat la sulfametazina (SMT, 4-amino-N-[4,6-dimetil-2-pirimidinil] benzèsulfonamida), també anomenada sulfadimidina, com a compost model de la família de les sulfonamides. Es tracta d'un dels agents antimicrobians més utilitzats en veterinària als EUA i la UE [40].

La SMT posseeix dos grups funcionals ionitzables, els quals presenten uns valors de  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  de 2.28 i 7.42, respectivament [41]. La Figura 4.2 mostra els equilibris àcid-base que s'estableixen en solució. Hi ha dues espècies neutres, una sense càrrega ( $SMT^0$ ) i una zwitteriònica ( $SMT^{+/-}$ ), tot i que, aquesta última només representa el 0.2 % de la forma neutra [42]. Per tant, en l'interval de valors de pH ambiental (4 – 8), la SMT es troba generalment de forma neutra o aniònica. El canvi en l'especiació de la SMT en funció del pH condiciona la solubilitat en aigua ( $S_w$ ) i el seu caràcter hidròfob/hidròfil ( $K_{ow}$ ), i per tant la seva sorció. Els valors bibliogràfics de  $\log K_{ow}$  per l'espècie catiònica, neutra i aniònica són -1.30, 0.27 i -2.09, respectivament.



**Figura 4.2.** Esquema dels diferents equilibris àcid-base que pot presentar la SMT en solució aquosa.

La SMT és una de les sulfonamides amb més mobilitat en el sòl, i presenta valors de  $K_d$  que oscil·len entre 0.32 i 10 L kg<sup>-1</sup> (Taula 2.5, pàgina 53). Per aquesta raó, la SMT és detectada sovint en diferents compartiments ambientals, com aigües subterrànies [43], pous [44] o rius [45] (Taula 2.3, pàgina 40), situats a les proximitats de sòls agrícoles adobats regularment amb fens contaminants o instal·lacions de ramaderia intensiva.

En aquesta tesi, l'estudi dut a terme es planteja en dues etapes. En una primera fase s'estudia la sorció en biochars purs (sistema biochar-aigua). La segona fase consisteix en l'estudi de la sorció en sòls esmenats amb biochar (sistema sòl+biochar-aigua).

Els resultats d'aquests estudis es recullen en dos articles científics: "Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon" publicat a la revista *Environmental Science and Technology*, i "Predicting contaminant adsorption in black carbon (biochar)-amended soil for the veterinary antimicrobial, Sulfamethazine" enviat (en fase de revisió) a la *Environmental Science and Technology*. Part dels estudis recollits en la primera publicació s'han realitzat en el marc d'una estada a la Universitat de Yale i al Connecticut Agricultural Experiment Station (CAES) sota la supervisió del Dr. Joseph J. Pignatello i el Dr. Jordan Peccia. Els estudis posteriors s'han continuat al Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

## 4.2.1. Publicació 2. “Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon (biochar)”

**ENVIRONMENTAL**  
Science & Technology

ARTICLE

pubs.acs.org/est

### Speciation of the Ionizable Antibiotic Sulfamethazine on Black Carbon (Biochar)

Marc Teixidó,<sup>†</sup> Joseph J. Pignatello,<sup>‡,§,\*</sup> José L. Beltrán,<sup>†</sup> Mercè Granados,<sup>†</sup> and Jordan Peccia<sup>§</sup>

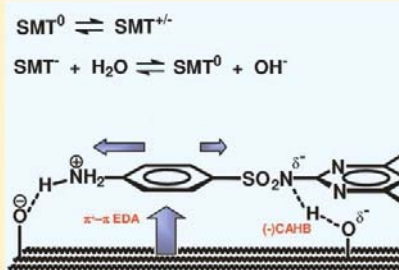
<sup>†</sup>Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Department of Environmental Sciences, Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Connecticut 06504, United States

<sup>§</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Yale University, New Haven, Connecticut 06520, United States

<sup>§</sup> Supporting Information

**ABSTRACT:** Adsorption of ionizable compounds by black carbon is poorly characterized. Adsorption of the veterinary antibiotic sulfamethazine (SMT; a.k.a., sulfadimidine;  $pK_{a1} = 2.28$ ,  $pK_{a2} = 7.42$ ) on a charcoal was determined as a function of concentration, pH, inorganic ions, and organic ions and molecules. SMT displayed unconventional adsorption behavior. Despite its hydrophilic nature ( $\log K_{ow} = 0.27$ ), the distribution ratio  $K_d$  at pH 5, where  $SMT^0$  prevails, was as high as  $10^6$  L kg<sup>-1</sup>, up to  $10^4$  times greater than literature reported  $K_{oc}$ . The  $K_d$  decreases at high and low pH but not commensurate with the decline in  $K_{ow}$  of the ionized forms. At pH 1, where  $SMT^+$  is predominant and the surface is positive, a major driving force is  $\pi$ - $\pi$  electron donor-acceptor interaction of the protonated aniline ring with the  $\pi$ -electron rich graphene surface, referred to as  $\pi^+$ - $\pi$  EDA, rather than ordinary electrostatic cation exchange. In the alkaline region, where  $SMT^-$  prevails and the surface is negative, adsorption is accompanied by near-stoichiometric proton exchange with water, leading to the release of  $OH^-$  and formation of an exceptionally strong H-bond between  $SMT^0$  and a surface carboxylate or phenolate, classified as a negative charge-assisted H-bond, (-)CAHB. At pH 5,  $SMT^0$  adsorption is accompanied by partial proton release and is competitive with trimethylphenylammonium ion, signifying contributions from  $SMT^+$  and/or the zwitterion,  $SMT^{\pm}$ , which take advantage of  $\pi^+$ - $\pi$  EDA interaction and Coulombic attraction to deprotonated surface groups. In essence, both  $pK_{a1}$  and  $pK_{a2}$  increase, and  $SMT^{\pm}$  is stabilized, in the adsorbed relative to the dissolved state.



#### INTRODUCTION

Sulfonamide antibiotics are widely used in veterinary medicine to promote growth and control infectious diseases. Since they are poorly metabolized, a large fraction is deposited onto soils from grazing and manure application.<sup>1,2</sup> At field concentrations, antibiotics impact soil microbial communities and functions,<sup>3,4</sup> and may contribute to the proliferation of antibiotic resistant bacterial pathogens.<sup>1,2,5</sup> Sorption is a critical process controlling the mobility and bioavailability of sulfonamide antibiotics in soil. The subject of our report is sulfamethazine (SMT; 4-amino-N-[4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl]benzenesulfonamide) a heavily used swine antibiotic in the U.S. and European Union.<sup>5</sup> Sorption of sulfonamides by whole soils, soil minerals, and dissolved organic matter has been studied, but reports are absent on sorption of these compounds to black carbon, an important component of the soil carbon pool and a form of which (biochar) is proposed as a soil amendment.

Sulfamethazine (Figure 1) is hydrophilic (octanol-water partition coefficient,  $\log K_{ow} = 0.27$ ) and in water exists as the cation ( $SMT^+$ ), anion ( $SMT^-$ ), uncharged molecule ( $SMT^0$ ), and zwitterion ( $SMT^{\pm}$ ) due to proton exchange at the aromatic amine and sulfonamide groups ( $pK_{a1}$ , 2.28;  $pK_{a2}$ , 7.42).<sup>6</sup> This complex speciation in water presages complex sorption behavior

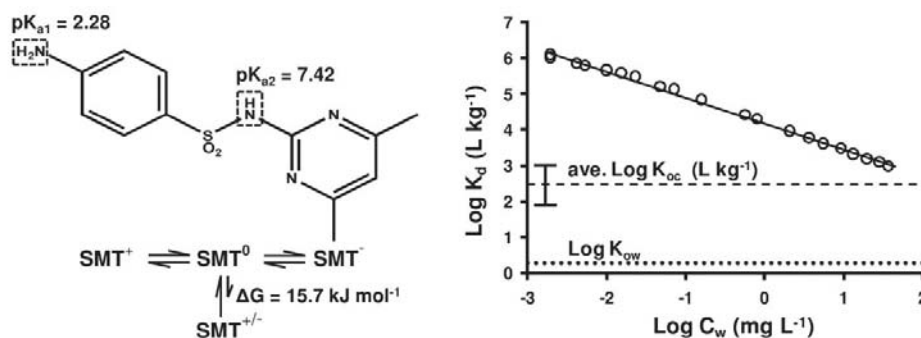
in soil. Several studies have probed chemical speciation of sulfonamide drugs adsorption on/in natural particles.<sup>7-15</sup> Sorption increases with organic carbon (OC) content and soil surface area and decreases with increasing soil solution pH.<sup>10</sup> Organic carbon is the main,<sup>11</sup> but not the only, active sorbent phase in soil.<sup>12</sup> Reported  $\log K_{oc}$  at around pH 5, where  $SMT^0$  predominates, range from 1.91 to 3.02.<sup>10,13,14</sup> Sorption of SMT by reference clays (kaolinite and montmorillonite) decreases with increasing solution pH and increases with ionic strength and surface charge density, consistent with a cation exchange mechanism.<sup>8</sup> Lertpaitoonpan et al.<sup>10</sup> proposed that sorption of  $SMT^0$  to dissolved humic acid occurs by “hydrophobic partitioning”. Richter et al.,<sup>11</sup> on the other hand, proposed that the related compound, sulfathiazole, having similar acidity constants as SMT ( $pK_{a1}$ , 2.11;  $pK_{a2}$ , 7.21), sorbs to dissolved humic acid mainly by cation exchange from low pH to pH  $\sim$  7.7. This assertion was based primarily on the finding that sorption generally decreased with increasing  $[H^+]$  at constant

Received: July 19, 2011

Accepted: October 7, 2011

Revised: October 4, 2011

Published: October 25, 2011



**Figure 1.** Left: Molecular structure of SMT<sup>0</sup> and the equilibria between species. Right: Sorption isotherm of SMT on Agrichar at pH = 5.0–5.2 (99.7% SMT<sup>0</sup>) in 0.5% methanol, 1.5 mM NaN<sub>3</sub>, and 10 mM CaCl<sub>2</sub> plotted as the distribution ratio vs equilibrium liquid-phase concentration. The solid line corresponds to the Freundlich model fit. The dashed line indicates the log of the mean  $K_{oc}$  of 12 soils at pH ~ 5 taken from the literature.<sup>1,10,14</sup> Nine were reported  $K_{oc}$  values, and three were calculated from reported OC content. The error bar indicates the range of  $K_{oc}$ . The dotted line indicates log  $K_{ow}$  at pH = 5.<sup>30</sup>

concentration of the cationic form in solution, and assuming that competition occurs with protons for anionic sites. Physisorption of SMT<sup>-</sup> to OC is claimed to be negligible.<sup>11</sup> SMT<sup>±</sup> comprises less than 0.2% of SMT<sup>0</sup> in the aqueous phase;<sup>16</sup> however, it is possible the relative stability of SMT<sup>±</sup> in the sorbed state is greater.

Charcoal is the subset of black carbon formed by pyrolysis of organic substances in the solid state. Charcoal resulting from natural fires and crop residue burning is a normal component of agricultural soils at levels reflecting the local fire history.<sup>17</sup> Biochar refers to charcoal produced from different biomass wastes in reactors under conditions of low oxygen and moderate temperature (ca. 350–600 °C).<sup>18</sup> Biochar has attracted interest for its potential to improve soil fertility and as a means of sequestering carbon.<sup>18</sup> Application rates of biochar in trials are on the order of a few percent by weight in the plow zone. We will use the terms charcoal and biochar interchangeably in this paper. The properties of charcoal depend on source material and formation conditions. During pyrolysis the structure evolves from altered biopolymer, to amorphous mixture of altered biopolymer and polyaromatic structures, to the graphite-like microcrystallite state.<sup>19</sup> The hydrophobic surface of the polyaromatic sheets, together with the microporosity created by the turbostratic arrangement of the graphene microcrystallites, renders charcoal a potentially strong adsorbent of organic compounds that may contribute appreciably to the overall sorption of incidental, natural, or applied chemicals in soil.

While adsorption of nonionic compounds is well-studied,<sup>20</sup> little attention has been paid to adsorption of ionizable compounds by charcoal black carbon. Charcoals in general have some cation exchange capacity due to the presence of dissociable carboxyl and hydroxyl groups along the edges of the graphene sheets and within uncarbonized biopolymer units.<sup>21</sup> The objective of this study was to determine the mechanisms by which SMT sorbs to charcoal. Sorption edge, isotherm, and competition experiments were conducted that address the mechanism in unprecedented detail. This study is part of a broader program to determine the potential of biochar to reduce the bioavailability of SMT, and thus limit its adverse environmental effects. Elsewhere we will report on the interaction of SMT with several biochars of different properties and as a result of weathering in soil. For the purpose of mechanistic elucidation we focus here on the biochar that resulted in the greatest sorption intensity of SMT.

## EXPERIMENTAL SECTION

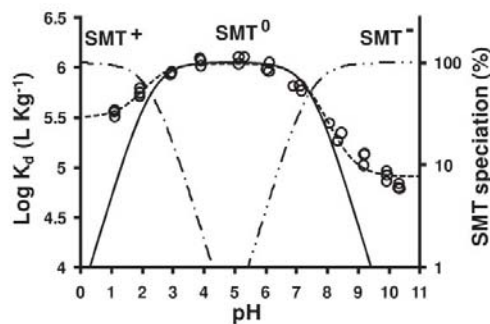
**Materials and Materials Characterization.** The sources and purities of the chemicals used are given in the Supporting Information. The biochar called Agrichar was donated by BEST Energies Australia, Somersby, Australia. It was produced by slow pyrolysis of hardwood litter (*Eucalyptus* spp.) at 600 °C in the absence of air. The <2 mm sieved fraction was stored in airtight plastic containers in the dark. This fraction had 91.7% C, 0.9% H, and 1.4% ash content (Galbraith Laboratories, Knoxville, TN, USA). The  $\zeta$  potential plot shows a point of zero net charge at pH 4.1 (Figure S1 in the Supporting Information). The titration curve shows a crossover point at pH 7.9.<sup>22</sup> Surface and pore characteristics were determined by N<sub>2</sub> adsorption at 77 K and CO<sub>2</sub> adsorption at 273 K on an Autosorb-1 (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, USA) after outgassing at 473 K.<sup>23,24</sup> Agrichar has a high surface area and is highly microporous. The N<sub>2</sub> Brunauer–Emmett–Teller (BET) specific surface area is 427 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, and the CO<sub>2</sub> cumulative surface area up to 1.4 nm is 614 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. The surface area and pore volume associated with the micropores ( $\leq 2$  nm, IUPAC) are 97 and 70% of the total, respectively.

**Sorption Experiments.** Sorption was conducted by established batch techniques detailed in the Supporting Information. Briefly, the biochar was prewetted in the experimental liquid phase adjusted to the desired pH for 48 h at 20.0 ± 0.2 °C, then spiked with SMT and other solutes, as applicable, and allowed to mix for an additional 48 h. Liquid-phase composition is specified in the figures. The 48 h contact time was chosen on the basis of prior kinetic tests (Figure S3). After phase separation, SMT concentration was determined in the supernatant by liquid chromatography with fluorimetric detection (HPLC-FL) or scintillation counting in the case of C<sup>14</sup>-labeled SMT (Supporting Information). The sorbed concentration was calculated by mass balance. Confidence and spike-recovery tests were satisfactory.

The apparent sorption distribution ratio ( $K_d$ , L kg<sup>-1</sup>) is defined as

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} = \frac{(V_w/M_s)(C_{w,\text{control}} - C_w)}{C_w} \quad (1)$$

where  $C_s$  (mg kg<sup>-1</sup>) is the sorbed concentration,  $C_w$  (mg L<sup>-1</sup>) is the liquid-phase concentration,  $C_{w,\text{control}}$  (mg L<sup>-1</sup>) is the liquid-phase concentration in the control (without sorbent),  $V_w$  (L) is



**Figure 2.** SMT adsorption edges to Agrichar. Solution composition: 0.5% methanol and 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . The dashed curve is a fit of the data (open circles) to the speciation model in eq 3 using MS Excel Solver (Redmond, WA, USA). Solid, dotted–dashed, and dotted–dotted–dashed curves represent the speciation of SMT. The total added mass of SMT was kept constant.

the liquid volume, and  $M_s$  (kg) is the sorbent mass. Isotherms were fit to the Freundlich model:

$$C_s = K_F C_w^N \quad (2)$$

where  $K_F$  ( $\text{mg}^{1-N} \text{L}^N \text{kg}^{-1}$ ) is the capacity–affinity parameter and  $N$  (dimensionless) is the exponential parameter. Parameters were estimated by nonlinear regression weighted by the dependent variable. The  $K_d$  may be calculated by use of the Freundlich equation as  $K_d = K_F C_w^{N-1}$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

**Isotherm of SMT at a pH Where  $\text{SMT}^0$  Predominates in Solution.** The isotherm of SMT on Agrichar was constructed at pH 5.0–5.2 where  $\text{SMT}^0$  is 99.7% of the total SMT in solution. The isotherm plotted in the traditional way ( $\log C_s$  vs  $\log C_w$ ) is given in Figure S2 while  $\log K_d$  vs  $\log C_w$ , showing the Freundlich fit, is exemplified in Figure 1. Adsorption of SMT to Agrichar is both remarkably intense and highly nonlinear ( $\log K_F = 4.18$ ,  $N = 0.27$ ;  $r^2 = 0.98$ ). The isotherm shows little sign of trending toward linearity at the lower end of the experimental concentration range, as the value of  $N$  increases only slightly to 0.43 upon regressing data from 0.001 to 0.1  $\text{mg L}^{-1}$ . The value of  $K_d$ , which reflects the fraction of SMT sorbed, varies by 3 orders of magnitude over the experimental range—clearly an important consideration in fate modeling efforts for this compound.

Figure 1 also shows the mean of 12 reported OC-based distribution coefficients ( $K_{oc}$ ) from natural soils at pH  $\sim 5$ .<sup>1,10,14</sup> The values of  $K_{oc}$  are in all cases given as constants without regard for concentration dependence, and, since they are calculated assuming all sorption occurs to the OC fraction, they represent an upper limit. The  $K_d$  for the biochar lies above the mean  $K_{oc}$  all across the isotherm. At the high end of the isotherm ( $\sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $K_d$  is only  $10^1$  times greater than mean  $K_{oc}$ , whereas, at the low end ( $\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), which more realistically represents environmental levels,<sup>25,26</sup>  $K_d$  is  $10^4$  times greater than mean  $K_{oc}$ . Figure 1 shows further that  $K_{ow}$  underpredicts sorption to Agrichar by as much as 6 orders of magnitude. Finally, we note that the  $K_d$  for SMT is considerably larger than previously reported for adsorption on graphite and multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) of other sulfonamide drugs having comparable  $K_{ow}$ s for the neutral molecule, regardless of whether

$K_d$  is based on mass ( $10^6$  vs  $10^3$ – $10^4 \text{ L kg}^{-1}$ ) or surface area ( $2.34$  vs  $0.0068$ – $0.068 \text{ L m}^{-2}$ ).<sup>27,28</sup>

**Influence of pH.** Adsorption is maximum in the pH region where  $\text{SMT}^0$  predominates (pH  $\sim 3$ – $6$ ) and decreases on either side of this range (Figure 2). Nominally, the order in sorption strength is  $\text{SMT}^0 > \text{SMT}^+ > \text{SMT}^-$ . We fit the observed  $K_d$  to a speciation model:<sup>29</sup>

$$K_d = K_d^+ \alpha^+ + K_d^0 \alpha^0 + K_d^- \alpha^- \quad (3)$$

where  $\alpha^+$ ,  $\alpha^0$ , and  $\alpha^-$  are the mass fractions of the species in solution given by

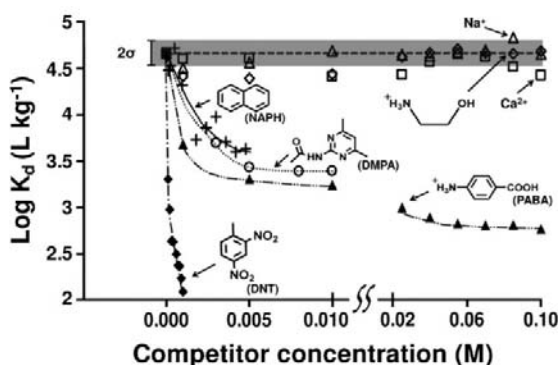
$$\begin{aligned} \alpha^+ &= \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+]K_{a1} + K_{a1}K_{a2}}; \\ \alpha^0 &= \frac{K_{a1}[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+]K_{a1} + K_{a1}K_{a2}}; \\ \alpha^- &= \frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}^+]^2 + [\text{H}^+]K_{a1} + K_{a1}K_{a2}} \end{aligned} \quad (4)$$

and  $K_d^+$ ,  $K_d^0$ , and  $K_d^-$  ( $\text{L kg}^{-1}$ ) are the respective distribution ratios as fitting parameters. A term for  $\text{SMT}^\pm$  is ignored. An assumption of eq 3 is that  $K_d^+$  and  $K_d^-$  are pH-independent, which is not necessarily valid if surface charge plays a major role. We show later that surface charge plays a secondary role at best. Equation 3 also neglects concentration dependence, which is likely small over the relatively narrow experimental range ( $1.5$ – $36 \mu\text{g L}^{-1}$ ) we used. Through fit to eqs 3 and 4 ( $r^2 = 0.977$ ), we obtain  $\log K_d^0 = 6.04$  (0.02),  $\log K_d^+ = 5.50$  (0.05), and  $\log K_d^- = 4.91$  (0.03) (further details in the Supporting Information).

Sorption from aqueous solution is controlled, in part, by the disruption of the cohesion of water caused by solvation of apolar molecular surface—i.e., the hydrophobic effect. While there is no unambiguous way to quantify the hydrophobic effect, the  $\log K_{ow}$  is a widely used surrogate for the free energy component of sorption attributable to the hydrophobic effect because it represents partitioning from bulk water into a hydrocarbonaceous phase. Octanol may be a suitable phase for ionic compounds because it retains some ion solvation properties due to the presence of 23 mol % water. As reflected in  $\log K_{ow}$ ,  $\text{SMT}^+$  ( $-1.3$ ) and  $\text{SMT}^-$  ( $-2.09$ ) are much less hydrophobic than  $\text{SMT}^0$  (0.27).<sup>30</sup> Normalizing  $K_d^+$ ,  $K_d^0$ , and  $K_d^-$  by the respective  $K_{ow}$  gives the order in hydrophobicity-normalized affinity for the surface ( $\log K_d/K_{ow}$ ):  $\text{SMT}^-$  (7.00)  $>$   $\text{SMT}^+$  (6.80)  $>$   $\text{SMT}^0$  (5.77). Although  $K_{ow}$  depends on solution composition (they were determined in 10 mM ammonium phosphate), this order shows qualitatively at least that cation and anion sorb inherently more strongly than the neutral molecule when normalized for hydrophobicity and signifies that  $\text{SMT}^+$  and  $\text{SMT}^-$  likely undergo supplemental stabilization on the surface.

**Speciation of Adsorbed SMT in Different pH Regions.** After adjusting pH to allow  $\text{SMT}^+$ ,  $\text{SMT}^0$ , or  $\text{SMT}^-$  to predominate in solution, adsorption was measured as a function of the concentration of various cosolutes that potentially could suppress or enhance sorption. The total SMT added was kept constant and the final SMT concentration in solution varied over a fairly narrow range of 29–176  $\mu\text{g L}^{-1}$ . To gain further mechanistic insight, we also closely followed pH changes as  $\text{SMT}^0$  or  $\text{SMT}^-$  adsorption proceeded.



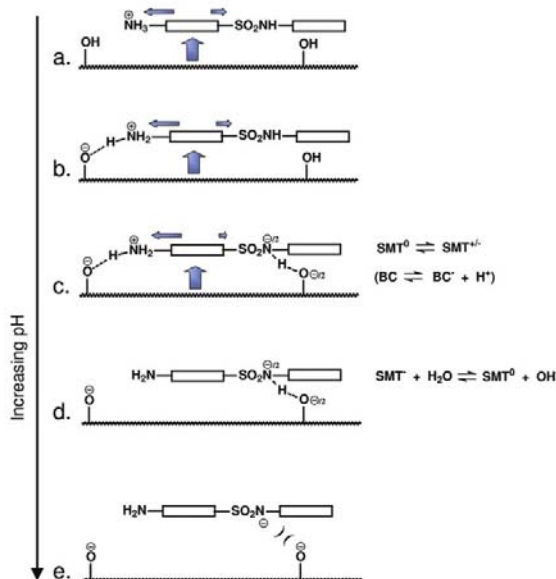


**Figure 3.** Effect of cosolutes on adsorption of sulfamethazine at pH 1: sodium, calcium, ethanolammonium, (4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)acetamide (DMPA), 2,4-dinitrotoluene (DNT), *p*-aminiumbenzoic acid (PABA), and naphthalene (NAPH). Solution composition: 0.5% methanol. DMPA, PABA, and NAPH concentrations were limited by their water solubility. Added sulfamethazine,  $1.1 \times 10^{-5}$  mol kg $^{-1}$ . The shaded band represents twice the standard deviation of five to eight samples measured in the absence of cosolute. Curves are for visual purposes only.

**Acidic Region.** At pH 1, SMT $^+$  comprises 97.0% of the total SMT in solution. (The dication resulting from protonation of the pyrimidinyl ring is negligible.) Experiments were designed to test cation exchange competition, ionic strength effects, and interaction of the two ring systems with the surface. Figure 3 shows that naphthalene (NAPH) and 2,4-dinitrotoluene (DNT)—neutral compounds bearing little structural similarity to SMT—are competitive with SMT $^+$  sorption. This is consistent with a contribution from nonionic and nonspecific driving forces to adsorption of SMT $^+$ .

Cation exchange of sulfonamide drugs with clays and organic matter at low pH has been invoked many times.<sup>8,11</sup> Figure 3 shows, however, that there is no competition by Ca $^{2+}$ , Na $^+$ , or ethanolammonium ion (HOCH $_2$ CH $_2$ NH $_3^+$ ) up to 0.1 M each (molar ratio cosolute: SMT,  $1.1 \times 10^4$ ). The effect of ionic strength is negligible from 0.1 M (background) to 0.4 M in the case of CaCl $_2$ . The absence of competition between SMT $^+$  and Ca $^{2+}$  and (especially) HOCH $_2$ CH $_2$ NH $_3^+$ , bolstered by the lack of ionic strength effect, argues against significant contribution of ordinary cation exchange to adsorption of SMT $^+$  on black carbon at pH 1. Indeed, the char surface at pH 1 likely contains few, if any, negatively charged sites because (a) the zeta potential is positive below pH 4.1 (Figure S1) and (b) pK $_a$  values for carboxyl groups on aromatic ring systems are generally above 3. The surface positive charge may be due to protonation of unsaturated C atoms or heterocyclic N atoms.<sup>31</sup>

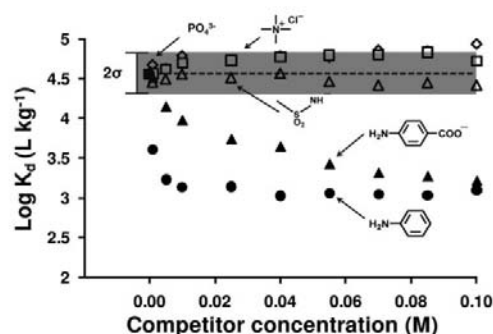
We propose that, rather than by cation exchange, SMT $^+$  adsorption is facilitated by  $\pi^+-\pi$  electron donor–acceptor (EDA) interactions, as depicted in Figure 4a.  $\pi-\pi$  EDA interactions are those that arise from attraction between oppositely polarized quadrupoles of arene systems orienting in a parallel–planar fashion.<sup>32–34</sup> In the present case, the charged *p*-aminosulfonamide ring is the acceptor and the graphene  $\pi$ -system the donor. The strong acceptor character of *p*-aminosulfonamide is attested by the high electronegativity of the -NH $_3^+$  and -SO $_2$ NH- groups (Hammett  $\sigma_{\text{meta}}$  1.13 and 0.55, respectively<sup>35</sup>). When the acceptor is positively charged and the charge lies within—or



**Figure 4.** Proposed evolution of SMT speciation on black carbon. Arrows indicate the direction and intensity of the electron flow of  $\pi^+-\pi$  EDA interactions. Intermediate structures show the (–)CAHB between the sulfonamide and surface oxylate group. Bottom structure shows electrostatic repulsion between the negative charges.

resonates with—an arene unit (e.g., a charged aromatic or heterocyclic aromatic amine), the  $\pi-\pi$  EDA complex is further stabilized by charge–quadrupole (“cation– $\pi$ ”) interaction, and the overall interaction is designated as  $\pi^+-\pi$  EDA.<sup>36–39</sup> Our previous studies,<sup>40,41</sup> supported now by other studies,<sup>42</sup> have established the  $\pi$ -donor character of the graphene surface of black carbon and carbon allotropes including graphite toward strong  $\pi$ -acceptors such as di- and trinitrotoluenes. We have observed  $\pi-\pi$  EDA and  $\pi^+-\pi$  EDA complexation between model compounds in nonaqueous solution spectroscopically and have correlated their free energy of complexation in solution with the hydrophobicity-normalized free energy of adsorption from water to graphite.<sup>39,41,43</sup>

To test the  $\pi^+-\pi$  EDA hypothesis, we contrasted the competitive effect of two uncharged compounds having similar affinity for the surface but opposite quadrupolarity: DNT, a strong  $\pi$ -acceptor by virtue of the withdrawing capability of the nitro groups; and NAPH, a weak  $\pi$ -donor due to the electron-rich, polarizable ring system. Figure S4 of the Supporting Information shows that the adsorption isotherms of DNT and NAPH on a wood charcoal and nonporous microcrystalline graphite essentially overlap, indicating the affinities of these two compounds for the graphene surface are identical. We predicted that their competitor strengths against SMT $^+$  would be similar if the competitive effect were due merely to nonspecific forces, whereas DNT would be a much stronger competitor than NAPH if the  $\pi$ -acceptor property of SMT $^+$  was critical. Of course, neither compound would compete for Coulombic interactions. Figure 3 shows that DNT is, by far, the stronger competitor, consistent with  $\pi^+-\pi$  EDA interactions of SMT $^+$  under competition from  $\pi-\pi$  EDA interactions of DNT.



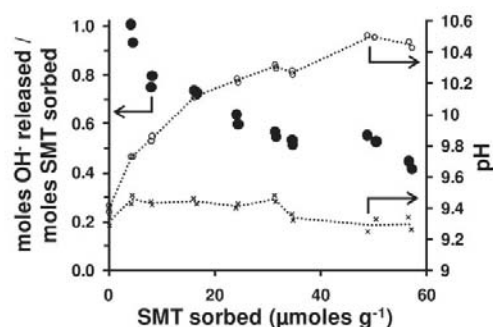
**Figure 5.** Effect of cosolutes on adsorption of sulfamethazine at pH 10.5: phosphate, tetramethylammonium, methylsulfonamide, *p*-aminobenzoate, and aniline. Solution composition: 0.5% methanol. Added sulfamethazine,  $3.6 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$ . The shaded band represents twice the standard deviation of five to eight samples measured in the absence of cosolute.

Further support for  $\pi^+ - \pi$  EDA interactions of  $\text{SMT}^+$  is given by the effects shown in Figure 3 of the structural analogues, *p*-aminobenzoic acid (PABA) and (4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-acetamide (DMPA) (see SMT structure, Figure 1). Both compounds are moderately competitive, suppressing  $\text{SMT}^+$  adsorption by a factor of about 10 at 0.01 M (Figure 3). PABA ( $\text{p}K_{\text{a}1} = 2.5$ ) is fully charged at pH 1 and expected to act as a  $\pi^+$ -acceptor due to the electronegativity of  $-\text{NH}_3^+$  ( $\sigma_{\text{meta}} = 1.13$ ) and  $-\text{CO}_2\text{H}$  ( $\sigma_{\text{meta}} = 0.37$ ) and the charge on the N; but it is perhaps a weaker acceptor than  $\text{SMT}^+$ . A fraction of DMPA ( $\text{p}K_{\text{a}} = 1.61$ ; for calculated value, see 44) is expected to be protonated on the ring N at pH 1. Since the pyrimidinyl ring of SMT is largely uncharged at pH 1 ( $\text{p}K_{\text{a}} = 0.27$ ; for calculated value, see ref 44), it is suggested that heterologous competition occurs between the charged pyrimidinyl ring existing in some DMPA molecules and the anilinium ring of  $\text{SMT}^+$ . Both PABA and DMPA are weaker competitors than DNP likely because, as cations, they experience a much weaker driving force for leaving the aqueous phase. Lacking a  $\pi$  system,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$  does not compete at all.

Ji et al.<sup>45</sup> recently proposed that sulfapyridine and sulfamethoxazole adsorption to graphite and MWNTs is facilitated by  $\pi - \pi$  EDA interactions, but instead involving the heterocyclic ring. The uncharged heterocyclic ring, however, will be far less  $\pi$ -electron deficient than the charged *p*-aminosulfonamide ring. Zhang et al.<sup>46</sup> speak about  $\pi - \pi$  EDA interactions also, but in a nonspecific way.

**Alkaline Region.** Experiments were carried out at pH 10.5, where SMT is 99.9% dissociated, in the presence of various solutes up to 0.1 M corresponding to a cosolute:SMT molar ratio of  $2.8 \times 10^4$  (Figure 5). The moderate competition exhibited by neutral aniline (suppression of  $K_{\text{d}}$  by a factor of  $\sim 20$ ) supports the involvement of nonspecific driving forces such as London–van der Waals and hydrophobic effects, if not direct interaction of the aniline moiety of  $\text{SMT}^-$  with the surface. Nevertheless, the intensity of adsorption of  $\text{SMT}^-$  as illustrated by Figure 2 is greater than one would expect for the anionic form of a hydrophilic molecule interacting with a negatively charged surface if van der Waals and hydrophobic effects were the sole driving force for sorption.

A possible contributing factor to the strong adsorption of  $\text{SMT}^-$  is anion exchange, but anion exchange seems unlikely at

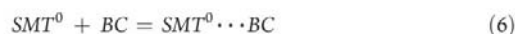
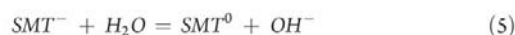


**Figure 6.** Stoichiometry of hydroxide release (closed circles) and pH (open circles, dotted line) as a function of adsorption of  $\text{SMT}^-$  by biochar. Solution composition: 0.5% methanol. The cross-hatch and dotted line represent the controls ( $\text{SMT}^-$  and water only) corresponding to the samples.

this pH because the biochar contains little N (a source of quaternary ammonium groups) and the pH is more than 6 units above the point of zero charge. Regardless, anion exchange is ruled out by the complete lack of competition by  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}^-$ , a structural analogue of the SMT arylsulfonamide group. Further evidence against anion exchange is the absence of competition by phosphate, as well as the absence of ionic strength effects up to 0.6 M in the case of phosphate (Figure 5). Coordination of  $\text{SMT}^-$  with metal ions—either direct coordination with structural metal ions of mineral impurities or through cation bridges between  $\text{SMT}^-$  and surface oxo-anion groups<sup>47–50</sup>—is ruled out, since phosphate and  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}^-$  surely would have disrupted such linkages. Assuming that the ion pair  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+\text{SMT}^-$  would sorb more favorably than  $\text{Na}^+\text{SMT}^-$  due to hydrophobic effects, the failure of tetramethylammonium chloride to enhance sorption may be taken as evidence that the counterion of  $\text{SMT}^-$  plays no significant role.

Figure 6 shows that hydroxide ion is released as  $\text{SMT}^-$  sorbs. The stoichiometry at any final pH is determined by summing the moles of  $\text{OH}^-$  appearing in solution and the moles of  $\text{OH}^-$  consumed by the biochar due to its buffering capability measured independently by titration<sup>22</sup> (Supporting Information). As SMT concentration increases from 3 to  $58 \mu\text{mol g}^{-1}$  (Figure 6), the pH increases from 9.5 to 10.5, and the  $\text{OH}^-/\text{SMT}_{\text{adsorbed}}$  stoichiometry declines from 1.0 to 0.4 (mol mol $^{-1}$ ). Note that the pH remained unchanged in the controls without biochar, since the spike stock of SMT had been adjusted to the same initial pH (9.5) as the bulk liquid phase.

Results similar to these were found previously for adsorption of aromatic carboxylate ions to biochars,<sup>22</sup> and we believe the results for  $\text{SMT}^-$  can be interpreted similarly. In the previous study<sup>22</sup> we attributed the release of  $\text{OH}^-$  to proton exchange of  $\text{RCO}_2^-$  with water, resulting in its adsorption as the neutral molecule. The analogous reaction for  $\text{SMT}^-$  is



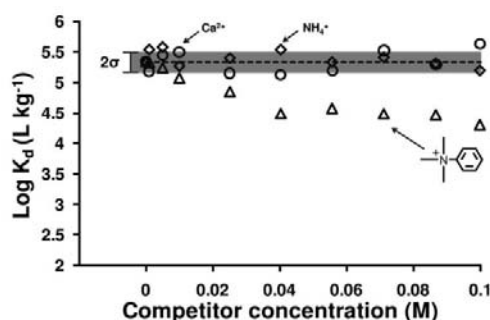
For the overall reactions 5 and 6 to be favorable the free energy penalty of the proton exchange step (eq 5) has to be compensated for by the free energy of the adsorption step (eq 6). The standard free energy of proton exchange is given by

$\Delta G_{\text{H}^+\text{exch}}^0 = RT \ln K_{a2} - RT \ln K_{a\text{w}} = -37.7 + 79.9 = +42.2$  kJ mol<sup>-1</sup>, where  $K_{a\text{w}}$  is the acid dissociation constant of water. The question immediately arises whether the increase in hydrophobicity due to the conversion of SMT<sup>-</sup> to SMT<sup>0</sup> is sufficient compensation. As an approximation, we may assume the  $K_{\text{ow}}$  to be an index of hydrophobicity. Accordingly, the corresponding free energy change associated with the hydrophobic effect is  $\Delta \Delta G_{\text{hydroph}}^0 \approx -RT \ln (K_{\text{ow}}^0 / K_{\text{ow}}^-) \approx -10.4$  kJ mol<sup>-1</sup>. This number could be in error, as  $K_{\text{ow}}$  of ions is sensitive to aqueous composition. However, it is to be noted that each power of 10 increase in  $K_{\text{ow}}^0 / K_{\text{ow}}^-$  corresponds to just  $-5.7$  kJ mol<sup>-1</sup>.

On this basis the increase in hydrophobicity ( $-10.4$  kJ mol<sup>-1</sup>) is, thus, insufficient to overcome the proton exchange penalty. This suggests an additional driving force is required for adsorption of the nascent SMT<sup>0</sup>. In view of the competition experiments that eliminate other possibilities, we postulate that the additional driving force is the formation of a H-bond of unusual strength with a surface carboxylate or phenolate group—e.g.,  $[\text{RSO}_2\text{N}(\text{R}') \cdots \text{H} \cdots \text{O}_2\text{C-surf}]^-$ . This type of H-bond, known as a negative charge-assisted H-bond, (-)CAHB, owes its exceptional strength to the small  $\Delta pK_a$  ( $\leq \sim 4$ ) between the H-donor (SMT<sup>0</sup>) and the H-acceptor (a surface oxo-anion such as carboxylate or phenolate). The small  $\Delta pK_a$  allows close sharing of the proton and confers appreciable covalent character on the H-bond.<sup>51,52</sup> While insufficient data exist to calculate the free energy of H-bond formation  $\Delta G_{(-)\text{CAHB}}^0$  between a sulfonamide group and a carboxylate group, we note that  $\Delta G_{(-)\text{CAHB}}^0$  ranges from about  $-56$  kJ mol<sup>-1</sup> for hydrogen dicarboxylate conjugate pairs,  $[\text{RCO}_2 \cdots \text{H} \cdots \text{O}_2\text{CR}]^-$  ( $\Delta pK_a \sim 0$ ), to about  $-50$  kJ mol<sup>-1</sup> for the acetate/phenol pair,  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{O}_2\text{CCH}_3]^-$  ( $\Delta pK_a = 5.2$ ). Thus, it is likely that  $\Delta G_{(-)\text{CAHB}}^0$  between SMT<sup>0</sup> and a surface carboxylate, together with the gain in hydrophobicity by converting SMT<sup>-</sup> to SMT<sup>0</sup>, compensates for the proton exchange penalty. In this regard, it is noteworthy that adsorption of carboxylate ions on graphite, which has no oxygen functionality, is not accompanied by hydroxide release.<sup>22</sup> As the pH and loading increase, proton exchange of SMT<sup>-</sup> becomes energetically more costly at a faster pace than placing a charge on the surface.<sup>22</sup> Thus, adsorption of the anionic form SMT<sup>-</sup> grows from 0% of the total SMT adsorption at pH 9.5 to 40% at pH 10.5, accounting for the decline in stoichiometry. Competition for SMT adsorption by PABA anion (Figure 5)—a steric and electronic analogue of the *p*-aminobenzenesulfonamide group—is consistent with formation of a (-)CAHB, but not necessarily confirmatory.

In summary to this point, we propose that in the alkaline region SMT adsorbs wholly or partly by proton exchange with water followed by interaction of the resulting neutral molecule augmented by a strong (-)CAHB between the sulfonamide moiety and a surface oxyanion. London–van der Waals and hydrophobic effects likely play a role, recalling that aniline is competitive. However, this role cannot be dominant, recalling that  $K_d$  is many orders of magnitude greater than  $K_{\text{ow}}$ . H-bonding between the amino and/or heterocyclic N and surface moieties may contribute, as well, but only if they are not out-competed by those with water. Zhang et al.<sup>46</sup> discuss H-bond involvement in sulfamethoxazole sorption by MWNTs but only in a general way and without experimental support.

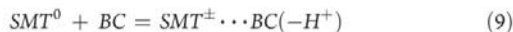
**Region around pH 5.** At initial pH 5.0–5.2, SMT<sup>0</sup> reaches maximum percentage of total SMT in solution (99.3%). Adsorption at pH 5.0–5.2 was conducted as a function of CaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, or trimethylphenylammonium (TMPA<sup>+</sup>) chloride concentration up to 0.1 M (Figure 7), where the molar cosolute:SMT ratio is about  $1 \times 10^4$ .



**Figure 7.** Effect of cosolutes on adsorption of sulfamethazine at pH 5.0–5.2: calcium, ammonium, and trimethylphenylammonium. Solution composition: 0.5% methanol. Added sulfamethazine,  $1.2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. The shaded band represents twice the standard deviation of five to eight samples measured in the absence of cosolute.

Adsorption was unaffected by Ca<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ions and little affected by ionic strength up to 0.3 M in the case of CaCl<sub>2</sub>. However, it was suppressed by as much as  $\sim 8$ -fold by TMPA<sup>+</sup>. Figure S6 (Supporting Information) demonstrates that the pH decreases progressively from 5.5 to 4.8 upon adsorption. Calculated in the same manner as described above in the high-pH case (Supporting Information), the stoichiometry of proton release is appreciable but nonstoichiometric;  $\sim 15$ –27% of adsorption is accompanied by proton release.

Adsorption of SMT occurring solely as the neutral molecule (eq 6) is inconsistent with the competitive effect of TMPA<sup>+</sup> and the release of protons induced by adsorption. Other possible reactions are



Reactions 7–10 are written as being facilitated by development of a positive charge on SMT. Richter et al.<sup>11</sup> proposed that a cationic form of sulfathiazole undergoes cation exchange on dissolved Leonardite humic acid up to pH  $\sim 7.7$ . In reaction 7, SMT<sup>0</sup> undergoes proton exchange with water, forming adsorbed SMT<sup>+</sup> and releasing OH<sup>-</sup>. The proton-transfer component of reaction 7 is strongly disfavored ( $\text{SMT}^0 + \text{H}_2\text{O} = \text{SMT}^+ + \text{OH}^-$ ;  $\Delta G^0 = RT \ln K_{a1} - RT \ln K_{a\text{w}} = +65.7$  kJ mol<sup>-1</sup>), however. Richter et al.<sup>11</sup> did not report whether sorption of sulfathiazole to dissolve humic acid was accompanied by OH<sup>-</sup> release. In our case, reaction 7 is ruled out because the pH decreases with adsorption (Figure S6).

Reaction 8 illustrates proton transfer ( $-\text{N}^+\text{H} \cdots \text{O}^-$ ) from an acidic surface functional group (most likely,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ) to the amino N. While proton transfer alone is unfavorable by at least 15 kJ mol<sup>-1</sup> ( $RT \ln 10^{(pK_{a,\text{surf}} - pK_a)}$ ) at 293 K because  $pK_{a1}$  is less than the  $pK_{a,\text{surf}}$  of acidic groups at pH 5, it is augmented by the H-bond that forms (of “moderate” strength in the Gilli classification).<sup>51,52</sup> Reaction 9 involves tautomerization of SMT<sup>0</sup> to the zwitterion in the adsorbed state. The free energy

of SMT<sup>±</sup> lies 15.7 kJ mol<sup>-1</sup> above that of SMT<sup>0</sup> in water;<sup>8</sup> thus, reaction 9 requires supplemental surface stabilization to compensate for zwitterion formation. In reaction 10, SMT<sup>0</sup> undergoes tautomerization to the adsorbed zwitterion and, in addition, prompts the charcoal to release a proton. This reaction may thus account for the observed drop in pH (Figure S6). Proton release declines with loading (Figure S6) presumably because reaction 10 is disfavored with increasing [H<sup>+</sup>].

Reactions 6 and 8–10 are all supported by the data and may take place concurrently. Our pH results suggest that reaction 10 accounts for 27% of adsorption at pH 5.4, declining to 15% at pH 4.8, and reactions 6, 8, and 9 for the remainder. On the basis of our findings at pH 1, we suggest that the additional stabilization of the cationic forms of SMT needed to overcome the unfavorable surface or internal proton-transfer step, as the case may be, is achieved through formation of a  $\pi^+-\pi$  EDA bond of the positively charged *p*-aminosulfonamide ring system with the graphene surface (Figure 4). The  $\pi^+-\pi$  EDA bond of SMT<sup>±</sup> is expected to be weaker than the  $\pi^+-\pi$  EDA bond of SMT<sup>+</sup> due to the lower electron-withdrawing ability of the negatively charged sulfonamide group. Further stabilization of the cationic form of SMT would be gained by release of a proton from the solid (reaction 10) to provide a negative site (Figure 4c) that can interact electrostatically with the positive charge. Competition by TMPA<sup>+</sup>, a strong  $\pi^+$ -acceptor itself, is consistent with both  $\pi^+-\pi$  EDA and charge pairing, while lack of competition by 0.1 M Ca<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> suggests that charge pairing is of lesser importance than  $\pi^+-\pi$  EDA.

Figure 4 summarizes the change in SMT speciation on the surface as a function of pH. With increasing pH starting from 1, SMT progressively sorbs as (a) the cation augmented by  $\pi^+-\pi$  EDA forces and then (b) charge pairing; as (c) the zwitterion stabilized by a (-)CAHB with the sulfonamide group; or as (d) the neutral molecule stabilized by (-)CAHB; and—at very high pH—as (e) the anion, which is destabilized by charge repulsion. We also witness proton exchange with the surface internally or with water that is compensated energetically by these interactions. Not shown are van der Waals forces, ordinary H-bonding and solvophobic effects, which operate to one degree or another in all cases. Our mechanism does not require the two rings of SMT to simultaneously lie flat (stack) on the surface. While the rings are not coplanar in the gas phase, there is a degree of free rotation about the Ar–S–N–Ar bonds that would allow coplanarity without much steric energy cost. Moreover, in an irregular slit pore, non-coplanar rings could separately stack with different walls that were themselves not parallel—planar.

We have identified new details in the sorption behavior of sulfonamide compounds to biochar, which is likely representative of interactions with natural particles. These include the formation of  $\pi^+-\pi$  EDA interactions with polyaromatic surfaces; the formation apparently of strong H-bonds with surface oxyl groups, (-)CAHB; the significant contribution of the zwitterionic form of the compound to sorption at intermediate pHs; and the involvement of proton exchange phenomena to facilitate these interactions, leading to release of hydroxide or hydrogen ion to solution. In essence, both the pK<sub>a1</sub> and the pK<sub>a2</sub> of sulfamethazine increase, and the zwitterionic form is stabilized in the adsorbed state relative to the solution state. While the behavior of sulfonamides towards black carbon in these terms appears to be different than towards OC, further work may reveal there is a lot in common.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

**S Supporting Information.** Figures showing  $\zeta$  potential curve (Figure S1), sorption isotherm of SMT at pH 5.0–5.2 (Figure S2), uptake rate profile at pH 5.0–5.2 (Figure S3), isotherms of 2,4-dinitrotoluene and naphthalene on a charcoal and graphite (Figure S4), titration curve of Agrichar, and the stoichiometry of H<sup>+</sup> release (Figure S6), and text describing the source/purity of chemicals and detailed sorption methodology, analytical methodology, and the method for calculating OH<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> stoichiometry (incorporating Figure S5) as well as the appropriate references. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: (203) 974-8518; fax: (203) 974-8502; e-mail: joseph.pignatello@ct.gov.

## ■ ACKNOWLEDGMENT

This research was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project CTQ2010-20156), the U.S. Department of Agriculture, NIFA, and the National Science Foundation CBET 0853682. M.T. thanks Universitat de Barcelona for an APIF grant. The authors also thank Charisma Lattao for assistance and BEST Energies for the biochar.

## ■ REFERENCES

- (1) Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci. (Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.)* **2003**, *166* (2), 145–167.
- (2) Kemper, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* **2008**, *8* (1), 1–13.
- (3) Halling-Sorensen, B.; Sengelov, G.; Tjornelund, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**, *42* (3), 263–271.
- (4) Thiele-Bruhn, S.; Beck, I. C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* **2005**, *59* (4), 457–465.
- (5) Sarmah, A. K.; Meyer, M. T.; Boxall, A. B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **2006**, *65* (5), 725–759.
- (6) Lin, C. E.; Chang, C. C.; Lin, W. C. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. 3. Citrate buffer as a background electrolyte. *J. Chromatogr., A* **1997**, *768* (1), 105–112.
- (7) ter Laak, T. L.; Gebbink, W. A.; Tolls, J. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25* (4), 904–911.
- (8) Gao, J. A.; Pedersen, J. A. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9509–9516.
- (9) Kahle, M.; Stamm, C. Time and pH-dependent sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to clay minerals and ferrihydrite. *Chemosphere* **2007**, *68* (7), 1224–1231.
- (10) Lertpaitoonpan, W.; Ong, S. K.; Moorman, T. B. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* **2009**, *76* (4), 558–564.
- (11) Richter, M. K.; Sander, M.; Krauss, M.; Christl, I.; Dahinden, M. G.; Schneider, M. K.; Schwarzenbach, R. P. Cation binding of antimicrobial sulfathiazole to Leonardite hmic acid. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 6632–6638.

- (12) Thiele-Bruhn, S.; Seibicke, T.; Schulten, H. R.; Leinweber, P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J. Environ. Qual.* **2004**, *33* (4), 1331–1342.
- (13) Langhammer, J. P. *Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld*, University of Bonn, Germany, 1989.
- (14) Kurwadkar, S. T.; Adams, C. D.; Meyer, M. T.; Kolpin, D. W. Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1370–1376.
- (15) Bialk, H. M.; Simpson, A. J.; Pedersen, J. A. Cross-coupling of sulfonamide antimicrobial agents with model humic constituents. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (12), 4463–4473.
- (16) Sakurai, H.; Ishimitsu, T. Microionization constants of sulpho-namides. *Talanta* **1980**, *27* (3), 293–298.
- (17) Skjemstad, J. O.; Reicosky, D. C.; Wilts, A. R.; McGowan, J. A. Charcoal carbon in US agricultural soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2002**, *66* (4), 1249–1255.
- (18) Lehmann, J.; Joseph, S., *Biochar for environmental management: Science and technology*; Earthscan: London and Sterling, VA, 2009; p xxxii, 416 pp.
- (19) Keiluweit, M.; Nico, P. S.; Johnson, M. G.; Kleber, M. Dynamic molecular structure of plant biomass-derived black carbon (biochar). *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 1247–1253.
- (20) Pignatello, J. J., Interactions of anthropogenic organic chemicals with natural organic matter and black carbon in environmental particles. In *IUPAC series on biophysico-chemical processes in environmental systems. Biophysico-chemical processes of anthropogenic organic compounds in environmental systems*; Huang, P. M., Ed.; Wiley: New York, 2011; Vol. 3, pp 3–50.
- (21) Liang, B.; Lehmann, J.; Solomon, D.; Kinyangi, J.; Grossman, J.; O'Neill, B.; Skjemstad, J. O.; Thies, J.; Luizao, F. J.; Petersen, J.; Neves, E. G. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2006**, *70* (5), 1719–1730.
- (22) Ni, J.; Pignatello, J. J.; Xing, B., Adsorption of aromatic carboxylate ions to charcoal black carbon is accompanied by proton exchange with water. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 9240–9248.
- (23) Braida, W.; Pignatello, J. J.; Lu, Y.; Ravikovich, P. I.; Neimark, A. V.; Xing, B. Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 409–417.
- (24) Zhu, D.; Kwon, S.; Pignatello, J. J. Adsorption of single-ring organic compounds to wood charcoals prepared under different thermo-chemical conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3990–3998.
- (25) Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* **1999**, *225* (1–2), 109–118.
- (26) Watanabe, N.; Bergamaschi, B. A.; Loftin, K. A.; Meyer, M. T.; Harter, T. Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 6591–6600.
- (27) Ji, L.; Chen, W.; Zheng, S.; Xu, Z.; Zhu, D. Adsorption of sulfonamide antibiotics to multiwalled carbon nanotubes. *Langmuir* **2009**, *25*, 11608–11613.
- (28) Zhang, D.; Pan, B.; Zhang, H.; Ning, P.; Xing, B. Contribution of different sulfamethoxazole species to their overall adsorption on functionalized carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3806–3811.
- (29) Schwarzenbach, R. P.; Gschwend, P. M.; Imboden, D. M. *Environmental Organic Chemistry*; Wiley: New York, 1993; p x, 681 pp.
- (30) Carda-Broch, S.; Berthod, A. Counter-current chromatography for the measurement of the hydrophobicity of sulfonamide amphoteric compounds. *Chromatographia* **2004**, *59* (1–2), 79–87.
- (31) Radovic, L. R.; Morena-Castilla, C.; Rivera-Utrilla, J. Carbon materials as adsorbents in aqueous solutions. In *Chemistry and Physics of Carbon: A Series of Advances*; Radovic, L. R., Ed.; Dekker: New York, 2001; Vol. 27, pp 227–405.
- (32) Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. The nature of pi–pi interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525–5534.
- (33) Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J. Aromatic interactions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, No. 5, 651–669.
- (34) Meyer, E. A.; Castellano, R. K.; Diederich, F. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42* (11), 1210–1250.
- (35) Gordon, A. J.; Ford, R. A. *The Chemist's Companion*; Wiley: New York, 1972.
- (36) Mecozzi, S.; West, A. P.; Dougherty, D. A. Cation-pi interactions in simple aromatics: Electrostatics provide a predictive tool. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2307–2308.
- (37) Mecozzi, S.; West, A. P.; Dougherty, D. A. Cation-pi interactions in aromatics of biological and medicinal interest: Electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (20), 10566–10571.
- (38) Wheeler, S. E.; Houk, K. N. Substituent effects in cation/ $\pi$  interactions and electrostatic potentials above the centers of substituted benzenes are due primarily to through-space effects of the substituents. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3126–3127.
- (39) Wijnja, H.; Pignatello, J. J.; Malekani, K. Formation of pi-pi complexes between phenanthrene and model pi-acceptor humic sub-units. *J. Environ. Qual.* **2004**, *33* (1), 265–275.
- (40) Zhu, D.; Kwon, S.; Pignatello, J. J. Adsorption of single-ring organic compounds to wood charcoals prepared under different thermo-chemical conditions. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3990–3998.
- (41) Sander, M.; Pignatello, J. J. Characterization of charcoal adsorption sites for aromatic compounds: insights drawn from single-solute and bi-solute competitive experiments. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1606–1615.
- (42) Chen, W.; Duan, L.; Zhu, D. Q. Adsorption of polar and nonpolar organic chemicals to carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 8295–8300.
- (43) Zhu, D. Q.; Pignatello, J. J. Characterization of aromatic compound sorptive interactions with black carbon (charcoal) assisted by graphite as a model. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 2033–2041.
- (44) Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A. A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: Estimation of more than 4300 ionization pK(a)s. *Quant. Struct.–Act. Relat.* **1995**, *14* (4), 348–355.
- (45) Ji, L. L.; Chen, W.; Zheng, S. R.; Xu, Z. Y.; Zhu, D. Q. Adsorption of sulfonamide antibiotics to multiwalled carbon nanotubes. *Langmuir* **2009**, *25*, 11608–11613.
- (46) Zhang, D.; Pan, B.; Zhang, H.; Ning, P.; Xing, B. Contribution of different sulfamethoxazole species to their overall adsorption on functionalized carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 3806–3811.
- (47) Dubus, I. G.; Barriuso, E.; Calvet, R. Sorption of weak organic acids in soils: Clofencet, 2,4-D and salicylic acid. *Chemosphere* **2001**, *45* (6–7), 767–774.
- (48) Nowara, A.; Burhenne, J.; Spittler, M. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1459–1463.
- (49) Clausen, L.; Fabricius, I. Atrazine, isoproturon, mecoprop, 2,4-D, and bentazone adsorption onto iron oxides. *J. Environ. Qual.* **2001**, *30* (3), 858–869.
- (50) MacKay, A. A.; Canterbury, B. Oxytetracycline sorption to organic matter by metal-bridging. *J. Environ. Qual.* **2005**, *34* (6), 1964–1971.
- (51) Gilli, G.; Gilli, P. Towards a unified hydrogen-bond theory. *J. Mol. Struct.* **2000**, *552*, 1–15.
- (52) Gilli, P.; Pretto, L.; Bertolasi, V.; Gilli, G. Predicting hydrogen-bond strengths from acid–base molecular properties. The pK<sub>a</sub> slide rule: Toward the solution of a long-lasting problem. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 33–44.

#### NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

This paper published ASAP October 25, 2011 with errors throughout the text. The correct version published October 28, 2011.

Environmental Science and Technology  
Supporting Information

**Speciation of an Ionizable Compound (Sulfamethazine) Adsorbed on  
Black Carbon (Biochar)**

MARC TEIXIDO,<sup>†</sup> JOSEPH J. PIGNATELLO<sup>‡,§,\*</sup>, JOSE L. BELTRAN,<sup>†</sup> MERCE GRANADOS,<sup>†</sup> AND JORDAN PECCIA<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Department of Environmental Sciences, Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven, Connecticut, U.S.A.

<sup>§</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Yale University, New Haven, CT 06520 USA

\*Corresponding author phone: (203) 974-8518; fax: (203) 974-8502;  
E-mail: [joseph.pignatello@ct.gov](mailto:joseph.pignatello@ct.gov)

Table of Contents

**Figure S1.** Streaming potential versus pH in 1 mM KCl for 100 and 500 mg Agrichar.

**Figure S2.** Isotherm of sulfamethazine on Agrichar at pH 5.0-5.2.

**Detailed Description of Sorption Methodology.**

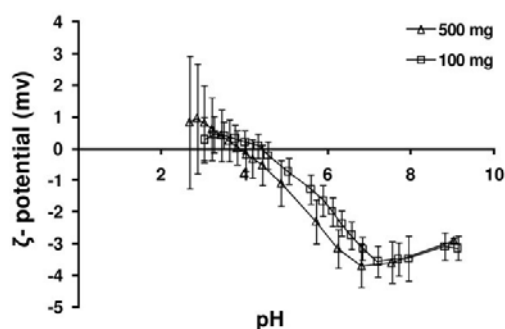
**Rate of SMT Sorption by Agrichar at pH 5.0-5.2 (Figure S3)**

**SMT Analyses.**

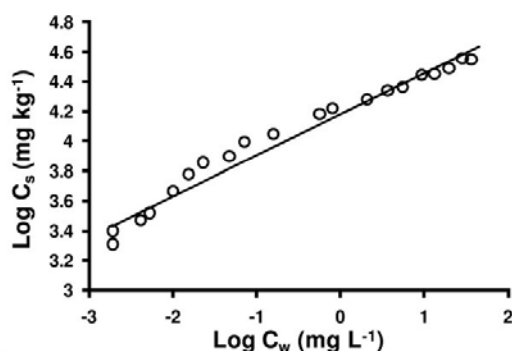
**Figure S4.** Isotherms of 2,4-dinitrotoluene and naphthalene on a wood charcoal and graphite.

**Calculation of OH<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> to adsorbed SMT stoichiometry (Figure S5)**

**Figure S6.** Stoichiometry of H<sup>+</sup> release and change in pH upon adsorption of SMT<sup>0</sup> by biochar.



**Figure S1.** Zeta potential versus pH in 1 mM KCl for 100 and 500 mg Agrichar. Zeta potential was determined using a *SurPAAS Electrokinetic Analyzer for Solid Samples* from Anton Paar® (Graz, Austria, EU). Samples were pre-equilibrated for 48 h in 1 mM KCl at a ratio of 0.5 mg/mL. Prior to the measurements, the liquid phase was renewed and then removed by filtration. The zeta potential was measured four times at each pH and the average and standard deviation calculated. The experiment was repeated the next day with good reproducibility.



**Figure S2.** Isotherm of sulfamethazine on Agrichar at pH 5.0-5.2 in 0.5% methanol, 1.5 mM NaN<sub>3</sub> and 10 mM CaCl<sub>2</sub> 20 °C and Freundlich fit.

**Detailed Description of Sorption Methodology.** Batch sorption was performed in glass vials with PTFE-lined septum screw-caps. Solution composition is specified for each type of experiment in the corresponding figure or table. When applicable, pH was adjusted with NaOH or HCl and ionic strength with NaCl. Initial experiments were carried out in the presence of 1.5 mM NaN<sub>3</sub> to inhibit aerobic microbial degradation. The water-to-solid ratio was adjusted to achieve  $\geq 20\%$  of SMT uptake; data below 20% were rejected. When methanol was used as a carrier solvent, the final methanol concentration was kept below 0.5% v/v. Prior to spiking with organic solutes biochar samples were pre-wetted in the experimental aqueous phase under gentle tumbling on a Rugged Rotator for 48 hours in the dark at  $20.0 \pm 0.2$  °C. After spiking with SMT and other components the samples tumbled for an additional 48 h under the same conditions. The samples were then centrifuged in a swinging bucket centrifuge at 1800 revolutions per minute (rpm) for 20 minutes at 20.0°C and the supernatant phase was sampled. A control (without sorbent) was run for every sample.

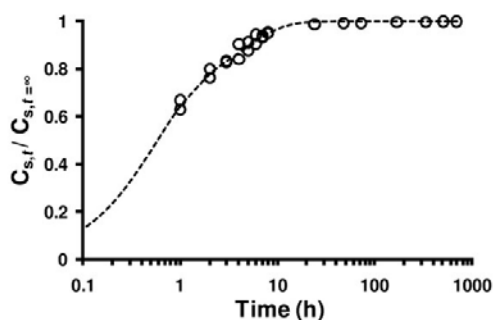
Confidence tests showed no significant loss of SMT to vial walls, and no effects of methanol carrier solvent on sorption below 0.6% methanol (v/v) for both the SMT<sup>0</sup> and SMT<sup>+</sup>. Spike-recovery tests with Agrichar were conducted by equilibrating 20 mg with 0.09 mg SMT (final SMT concentration, 1.75 mg L<sup>-1</sup>) at



pH 5 (where SMT<sup>0</sup> dominates) for 48 h. The solid was extracted with acetonitrile [1] at 60 °C for 2 h. Percent recovery was 84 (SD = 4, n = 10). The high recovery is indicative of physisorption. However, we cannot rule out a small degree of chemisorption.

### Rate of SMT sorption by Agrichar at pH 5.0-5.2.

The equilibration time was chosen to be 48 h based on the uptake rate profile (Figure S2). Uptake was determined in sacrificed samples at 2-8 hours; 1, 2, 3, 7, 14, 21 and 28 days. SMT initial spiking concentration was 3 mg l<sup>-1</sup>, solid-to-solution ratio was 4x10<sup>-4</sup> g ml<sup>-1</sup> and SMT<sup>0</sup> was the predominant specie.



**Figure S3.** Rate of SMT sorption onto Bestchar. Time zero concentration was 3 mg l<sup>-1</sup> and the solid-to-solution ratio was 4x10<sup>-4</sup> g ml<sup>-1</sup>. Curve is fit to eq S1.

The data were fit to a three-parameter, double exponential (“two compartment”) model [2]:

$$\frac{C_{S,t}}{C_{S,t=\infty}} = 1 - \left( F_{\text{fast}} e^{-k_{\text{fast}} t} + F_{\text{slow}} e^{-k_{\text{slow}} t} \right) \quad (\text{S1a})$$

where  $C_{S,t}$  is sorbed concentration at time  $t$ , and  $C_{S,t=\infty}$  the sorbed concentration at time infinity (equilibrium), and  $F_{\text{slow}}$  and  $F_{\text{fast}} (= 1 - F_{\text{slow}})$  the mass fractions and  $k_{\text{fast}}$  and  $k_{\text{slow}}$  [h<sup>-1</sup>] the first-order rate constants for transport into “fast” and “slow” compartments of the adsorbent, respectively.

The ratio  $C_{S,t}/C_{S,t=\infty}$  is related to the corresponding solution phase concentrations by

$$\frac{C_{s,t}}{C_{s,t=\infty}} = \frac{C_{w,0} - C_{w,t}}{C_{w,0} - C_{w,t=\infty}} \approx \frac{C_{w,0} - C_{w,t}}{C_{w,0}} \quad (\text{S1b})$$

since, experimentally,  $C_{w,0} \gg C_{w,t=\infty}$ .

The parameters from the best fit (shown in Figure S1) obtained by non-linear least squares regression to eq S1 were:

$$k_{\text{fast}} = 2.05 (0.25) \text{ h}^{-1}$$

$$k_{\text{slow}} = 0.242 (0.024) \text{ h}^{-1}$$

$$F_{\text{fast}} = 0.661 (0.034)$$

$$F_{\text{slow}} = 0.339 (0.034)$$

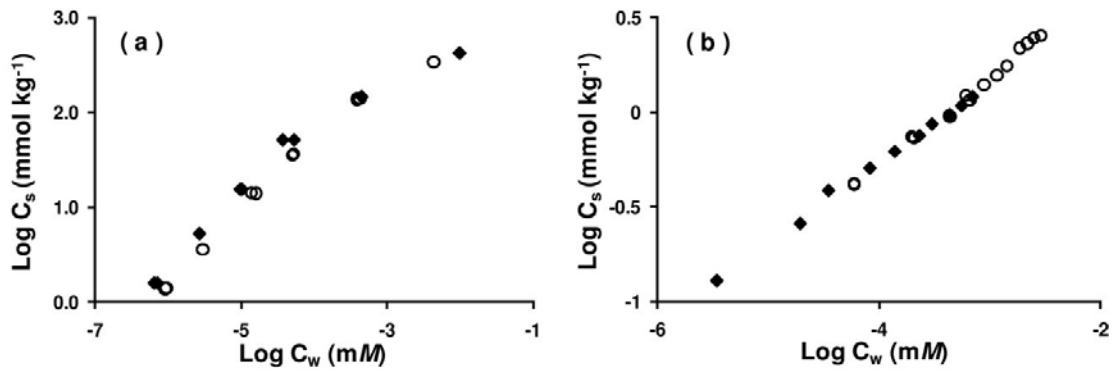
$$r^2 = 0.9818$$

Values in parentheses are the estimated standard error.

Although the concentration of SMT was still in decline when the experiment was stopped at 28 d, based on this model more than >99.7% of the final equilibrium uptake would be achieved within 48h. We make the reasonable assumption that any additional SMT needed to reach true equilibrium sorbs by the same mechanistic pathway(s) as the first 99.7%.

**SMT Analyses.** SMT was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) or liquid scintillation counting (LSC), depending on the experiment. HPLC analysis was performed on an Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) with a fluorimetric detector. A 1-mL sample collected as above was pre-column derivatized with fluorescamine ( $\geq 98\%$ , TLC; Sigma-Aldrich) as described in detail by Raich-Montiu et al. [1]. Sulfameter (Sigma-Aldrich) was added as internal standard to correct for possible fluorescence attenuation over the analysis period. The derivatized sample was then filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter (Whatman), rejecting the first drops coming from the filter, and 50  $\mu\text{L}$  injected onto a 5  $\mu\text{m}$  Supelco Discovery C-18, 250 mm long  $\times$  4mm i.d., column (Bellefonte, PA, USA) fitted with a 5  $\mu\text{m}$  Supelguard Discovery C-18 guard

column. The mobile phase was 0.01 M aqueous formic acid adjusted to pH 3.4 and the flow rate was 1 ml min<sup>-1</sup>. Excitation and emission wavelengths were set at 405 and 485 nm, respectively. External calibration curves were used to estimate sample concentrations from the integrated peak areas. The method limit of quantification was 0.2 µg L<sup>-1</sup> established on the basis of ten times the baseline standard deviation of the chromatographs of blank extracts and low-concentration standard solutions [3]. Analysis by LSC was performed by passing the supernatant aliquot through a 0.45 µm nylon filter, rejecting the first 1-2 mL, and mixing a known volume (1-3 mL) with 15 mL of Opti-fluor scintillation cocktail (Packard Bioscience, Meriden, CT, USA) and in a TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillation Counter (Perkin-Elmer, Downers Grove, IL, USA).

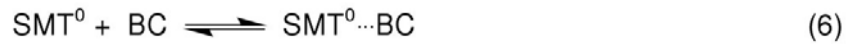
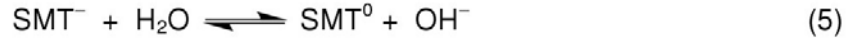


**Figure S4.** Isotherms of 2,4-dinitrotoluene (open circles) and naphthalene (closed diamonds) on a) maple wood charcoal and b) graphite. Data replotted from [4].

### Calculation of stoichiometry of OH<sup>-</sup> and H<sup>+</sup> with respect to adsorbed SMT

#### a) Alkaline Region

Adsorption of SMT<sup>-</sup> by biochar starting at pH 9.5 is accompanied by the release of hydroxide ion into solution (eq 5-6).



In order to determine the magnitude of OH<sup>-</sup> release, the buffering capacity of the biochar must be taken into account:

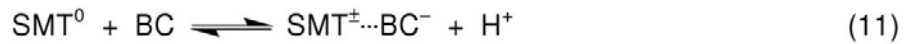


At a given pH, the amount of OH<sup>-</sup> released by SMT adsorption is the observed amount appearing in solution plus the amount consumed by the biochar at the final pH as determined in an independent titration experiment using the same equilibration period (48 h) and temperature (20 °C) as the sorption experiment. The titration curve was reported in Ni et al., (submitted). The alkaline region was fitted to a cubic polynomial, with weighting by the dependent variable, giving the following results:

$$y = 0.001490x^3 - 0.0412x^2 + 0.3901x - 1.251 \quad (r^2 = 0.9925)$$

#### b) Acidic Region.

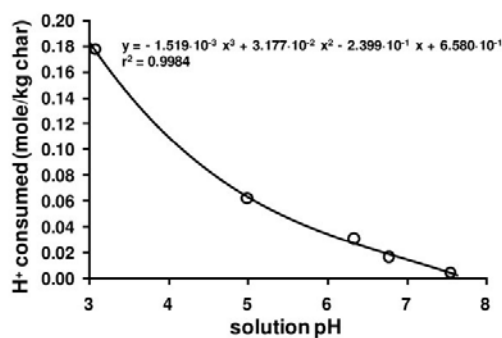
Adsorption of SMT<sup>0</sup> by biochar starting at pH 5 is accompanied by the release of protons into solution (eq 11).



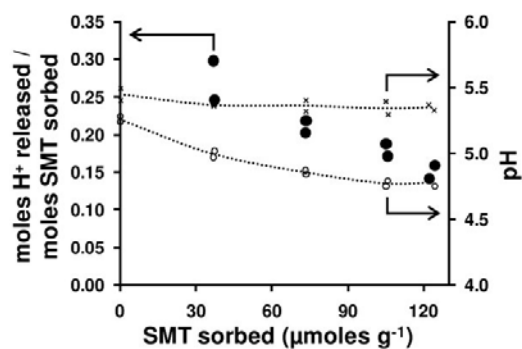
In order to determine the magnitude of H<sup>+</sup> release, the buffering capacity of the biochar must be taken into account:



At a given pH, the amount of  $H^+$  released by SMT adsorption is the observed amount appearing in solution plus the amount consumed by the biochar at the final pH as determined in an independent titration experiment using the same equilibration period (48 h) and temperature (20 °C) as the sorption experiment. The titration curve was reported in Ni et al., (submitted). The acidic region was fitted to a cubic polynomial. The fit is shown in Figure S5.



**Figure S5.** Titration curve of Agrichar in acidic region.



**Figure S6.** Stoichiometry of  $H^+$  release (closed circles) and change in pH (open circles, dotted line) upon adsorption of  $SMT^0$  by biochar. The crosshatch and dotted line represent the controls ( $SMT^0$  and water only) corresponding to the samples.

## REFERENCES

1. Raich-Montiu, J.; Folch, J.; Compano, R.; Granados, M.; Prat, M. D., Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *J Chromatogr A* **2007**, *1172*, (2), 186-93.
2. Cornelissen, G.; Rigterink, H.; van Noort, P. C. M.; Govers, H. A. J., Slowly and very slowly desorbing organic compounds in sediments exhibit Langmuir-type sorption. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2000**, *19*, (6), 1532-1539.
3. Long, G. L.; Winefordner, J. D., LIMIT OF DETECTION. *Analytical Chemistry* **1983**, *55*, (7), A712-&.
4. Zhu, D.; Pignatello, J. J., Characterization of aromatic compound sorptive interactions with black carbon (charcoal) assisted by graphite as a model. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 2033-2041.

## 4.2.2. Publicació 3. “Predicting contaminant adsorption in black carbon (biochar)-amended soil for the veterinary antimicrobial sulfamethazine”

Page 1 of 31

Environmental Science &amp; Technology

### PREDICTING CONTAMINANT ADSORPTION IN BLACK CARBON (BIOCHAR)-AMENDED SOIL FOR THE VETERINARY ANTIMICROBIAL, SULFAMETHAZINE

MARC TEIXIDÓ,<sup>†</sup> CARLES HURTADO,<sup>†</sup> JOSEPH J. PIGNATELLO,<sup>‡,§,\*</sup> JOSÉ L. BELTRÁN,<sup>†</sup> MERCÉ GRANADOS,<sup>†</sup> AND JORDAN PECCIA<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Departament de Química Analítica, Carrer Martí i Franqués, 1, 3<sup>a</sup> Planta 08028, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Department of Environmental Sciences, Connecticut Agricultural Experiment Station, 123 Huntington St., P.O. Box 1106, New Haven, Connecticut, 06504-1106, U.S.A.

<sup>§</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Yale University, New Haven, CT 06520, USA

\*Corresponding author phone: (203) 974-8518; fax: (203) 974-8502;

E-mail: [joseph.pignatello@ct.gov](mailto:joseph.pignatello@ct.gov)

---

#### ABSTRACT

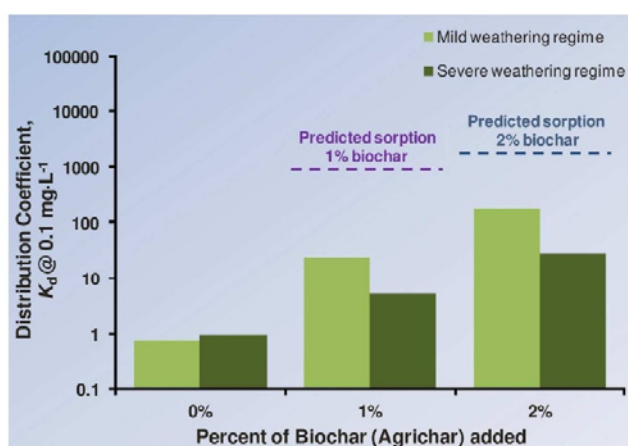
Commercial hardwood biochars ranging in N<sub>2</sub> specific surface area of 0.1 – 427 m<sup>2</sup>/g were added to an agricultural soil at 0, 1, or 2% levels to determine whether they would predictably reduce the pore water concentration of sulfamethazine (SMT). The soil and biochar-soil mixtures were pre-weathered under mild (2 d, 20 °C) or more severe (28 d, 40 °C) conditions before spiking. The carbon-normalized biochar-water distribution coefficient ( $K_{BC}$ ) of the biochars varied by a factor of up to 10<sup>4</sup>, depending on

1



biochar properties and SMT concentration. Except for the fast-pyrolysis biochar,  $K_{BC}$  greatly exceeded the soil organic carbon-water distribution coefficient  $K_{OC}$ . Sorption in the mixtures increased as expected with biochar and dose. However, sorption was dramatically over-predicted (by up to  $10^{2.5}$ ) by the sum of sorption to the individual components, indicating a strong weathering effect even under the mild conditions. The soil-subtracted weathered biochar-water isotherms were more linear, and the  $K_{BC}$  values approached or lay within the range of  $K_{OC}$  values reported for SMT in 19 soils. Biochars both in intimate contact with soil and placed in a membrane bag suspended in the solution showed reduced  $N_2$ -B.E.T. surface area after weathering, implicating fouling of the biochar surface by humic substances transferred through water. The results indicate that only highly surfaceous, carbonaceous biochars would be useful for stabilizing soil contaminated with compounds such as SMT. They also suggest that weathering may attenuate the contribution of native (environmental) black carbon to sorption of such compounds in soils and sediments.

TOC art:



2

## INTRODUCTION

Antimicrobials are used extensively in veterinary practices for promotion of growth and control of infectious diseases. Because they are poorly metabolized, their residues end up in soil where they may contribute to the proliferation of antimicrobial-resistant pathogens,<sup>1</sup> potentially affecting humans.<sup>2</sup> The subject of this study is sulfamethazine [SMT; 4-amino-*N*-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzenesulfonamide], a high-use sulfonamide antimicrobial.<sup>3</sup> SMT and other sulfonamides have been found at concentrations up to 900 mg kg<sup>-1</sup> in manure<sup>4</sup> and at parts-per-billion levels in soils and adjacent environmental compartments.<sup>5</sup>

SMT is highly hydrophilic even in neutral form, where it predominates between pH 3 and 7 (speciation diagram, Figure S1 in Supplemental Information section): [ $\log K_{ow}$ : uncharged molecule (SMT<sup>0</sup>), 0.27; cation (SMT<sup>+</sup>), -1.3; anion (SMT<sup>-</sup>), -2.09].<sup>6</sup> For agricultural surface soils, the soil-water distribution coefficients ( $K_d$ ) for SMT range from 0.32 to 22 L kg<sup>-1</sup>, and the organic carbon (OC)-water distribution coefficients ( $\log K_{OC}$ ) range from 1.59 to 3.02 (Table S1). The  $\log K_{OC}$  in a pig manure is 2.28.<sup>7</sup> These values suggest that SMT is highly mobile and bioavailable in soil. Indeed, SMT has been found in groundwater after fertilization with liquid manure.<sup>8</sup>

If SMT cannot be prevented from entering soil, it is of interest to find ways to minimize its leaching, run-off and bioavailability. One way to stabilize the contaminant is by addition of a strong adsorbent to the soil. A potentially suitable adsorbent is charcoal produced from various organic wastes (biochar). Biochar has attracted interest as an

soil amendment at levels up to 5%-10% by weight (~100 t/ha) in potting mixtures, landscapes, gardens and agricultural fields to improve soil fertility and reduce greenhouse gas emissions.<sup>9</sup> Lately they have been of interest as stabilizing agents of contaminated soil.<sup>10-13</sup> Related pyrogenic substances, known as environmental black carbon (BC), occur naturally in soils from fires and fossil fuel soot deposition, in some soils comprising up to a third of total OC. The presence of environmental or added BC in soil and sediment can have important consequences for the efficacy of pesticides,<sup>14-15</sup> leaching, microbial degradation, and dermal and gastrointestinal bioavailability of soil-borne contaminants.

The environmental BC component is thought to dominate sorption and sorption nonlinearity of organic chemicals in soils and sediments, especially at low chemical concentrations. The equilibrium distribution of contaminants among soil compartments has been modeled<sup>16-19</sup> by equations similar to the following,

$$S_{\text{mix}} = S_{\text{soil}} \cdot f_{\text{soil}} + S_{\text{BC}} \cdot f_{\text{BC}} \quad (1)$$

where  $S_{\text{mix}}$ ,  $S_{\text{soil}}$ , and  $S_{\text{BC}}$  are the sorbed concentrations, respectively, of the mixture, the non-BC soil components, and the carbon-normalized BC component; and  $f_{\text{soil}}$  and  $f_{\text{BC}}$  are the mass fractions, respectively, of non-BC soil and BC in the mixture. Sorption to the non-BC soil is often assumed to be dominated by NOM, in which case  $S_{\text{soil}} = S_{\text{OC}} \cdot f_{\text{OC}}$  where  $f_{\text{OC}}$  is the mass fraction of OC in the soil. When the BC source is unknown, application of eq 1 is hampered by the lack of generally-accepted methodology for quantifying  $f_{\text{BC}}$ , absence of an appropriate reference standard for BC, lack of clarity

about which sorption isotherm model to apply to each component, and inability to predict the effect of environmental weathering on the intrinsic adsorbent strength of BC.<sup>20</sup>

In soil and sediment, BC surfaces are potentially altered over time by abiotic or biotic oxidation and the deposition of NOM, ions and minerals. Oxidation of BC or AC has been shown to suppress adsorption.<sup>21-23</sup> Reduction of the efficiency of activated carbon (AC) in water purification applications by dissolved NOM or microbial biomass ("fouling") is well known and is attributed to blockage of adsorption sites and/or pore entrances.<sup>22, 24-25</sup> A few studies have addressed the effects of weathering of AC or BC in soil and sediment.<sup>10-13, 26-29</sup> Many were concerned primarily with net impacts on practical function (remediation, pesticide efficacy), rather than the root causes of weathering. The majority of studies observed sorption attenuation after weathering, if only modest. Yet the findings are mixed and depend greatly on compound, soil, and type of carbon added. Field-weathering of ACs in soil or sediment up to 32 mo lowered the  $K_{AC}$  of spiked PCBs and PAHs from ~0 to 1.4 log units.<sup>26</sup> By contrast, pre-aging 5% AC in soil under specified microbiological, chemical or physical treatments did not affect  $K_{AC}$  of d<sub>10</sub>-pyrene.<sup>27</sup> Kwon et al.<sup>28</sup> observed a 2.3-fold decline of benzene  $K_d$  in a wood charcoal-soil-water mixture pre-weathered at 45 °C for 1 mo. They also showed that adsorption of apolar aromatic compounds to the raw charcoal was suppressed by dissolved soil humic acid or when the charcoal was co-flocculated with the humic acid by adding aluminum salts.<sup>29</sup> Based on parallel reductions in N<sub>2</sub> surface area in each case, they attributed sorption attenuation to competition and pore blockage by humic

substances.<sup>28-29</sup> Hale et al.<sup>27</sup> observed a decrease of 0.36 - 1.75 log units in  $K_{BC}$  for d<sub>10</sub>-pyrene in 5% biochar-soil mixtures following microbiological, thermal or physical pretreatment. Diuron sorption in a wheat straw ash-amended soil was attenuated by weathering and also by soil substances extractable by 5 mM CaCl<sub>2</sub>.<sup>11</sup> However, 2 years of weathering in the field decreased simazine sorption in a biochar-amended soil only slightly, and actually increased its mineralization.<sup>10</sup> Weathering of pine biochars (350 and 700 °C) had little effect on phenanthrene sorption in one soil, but decreased it 3-fold in another soil.<sup>12</sup>

In this study we determined whether addition to a soil of commercial biochars could predictably reduce pore water concentrations of SMT after mild or more severe weathering. Recently we reported a detailed mechanistic study of SMT sorption to one of the biochars over a wide pH range.<sup>30</sup> Little is currently known about the potential role of BC in the sorption of ionizable compounds like SMT. Such an assessment, taking into account possible natural sorption attenuation, is crucial for assessing hazard and devising remediation strategies for these compounds.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** Procurement and handling of Agrichar®, Soil Reef®, Pure Black™, and CQuest® biochars is detailed in the SI section. Table 1 lists feedstock, production conditions, proximate and ultimate analyses, pore/surface characteristics and pH.

The soil is a Mollisol (typic Hapludoll)<sup>31</sup> from the 0 – 20 cm horizon of an agricultural field in St. Joan de les Abadesses, Catalonia, Spain (42°14'10" N, 2°17'12" E). It was air dried (48 h) and then sieved (2 mm). It has 19.6% clay-, 28.9% silt-, and 51.5% sand-size particles, 2.62% OC (Walkley-Black method<sup>32</sup>), cation exchange capacity of 13.8 meq 100g<sup>-1</sup> (ammonium acetate<sup>33</sup>), and pH of 7.42 (1:5 w/w of 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.5 mM NaN<sub>3</sub>). The non-clay minerals (73.5% of total mineral content) are dominated by quartz, with small amounts of plagioclase, calcite, potassium feldspar and dolomite; the clay minerals (26.5%) are dominated by illite/mica, with smaller amounts of kaolinite, chlorite and smectite (XRD, Table S2).

Pore/surface analysis was determined by N<sub>2</sub> (77 K) and CO<sub>2</sub> (273 K) adsorption on an Autosorb-1 (Quantachrome) after outgassing at 200 °C for biochars or 150 °C for soil and biochar-soil mixtures.<sup>23, 34</sup>

**Sorption Experiments.** The batch sorption methodology based on our previous study<sup>30</sup> is given here briefly and in more detail in the SI section. Biochar, soil or their mixtures were combined with 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 1.5 mM NaN<sub>3</sub> background solution and pH-adjusted with HCl to 5.0 – 5.2 (biochar alone) or left unadjusted (soil and mixtures). The (flooded) solids were then gently agitated over a 48 h pre-wetting period at 20.0 ± 0.2 °C prior to adding SMT (≥ 99%; Sigma–Aldrich) concentrate in methanol. Sorption equilibration time was 48 h based on previous data with Agrichar.<sup>30</sup> SMT was quantified in the supernate by liquid chromatography. Confidence tests showed no significant “bottle” losses or effects of methanol.<sup>30</sup>

Soil alone and biochar-soil mixtures were subjected to "mild" or "severe" weathering conditions before adding SMT. Mild refers to the conditions of the pre-wetting step described above, which are the mildest possible as restricted by our sorption protocol. Severe refers to pre-incubation of the flooded solids for 28 days at  $40.0 \pm 0.2$  °C with manual shaking twice per day, followed by an additional 48 h at 20 °C to allow system relaxation to the isotherm conditions before adding SMT. (Loss of water was negligible.) Forty °C was chosen to simulate advanced environmental weathering. We did not try to distinguish the individual effects of time and temperature. To determine weathering effects on biochar surface area, in some experiments under otherwise identical conditions, biochars were segregated from the soil by packing 1.5 g into a bag made from two 40 mm × 80 mm × 0.9 mm sheets of nonwoven polypropylene fabric sewn shut with cotton thread, and submerging the bag in the soil-water mixture.

**Sorption data analysis.** Data were fit to the Freundlich (eq 2), Langmuir (eq 3) and Langmuir-Freundlich (eq 4) models.

$$S = K_F \cdot C_w^N \quad (2)$$

$$S = S_L^{\max} \frac{K_L C_w}{1 + K_L C_w} \quad (3)$$

$$S = S_{LF}^{\max} \frac{(K_{LF} C_w)^\alpha}{1 + (K_{LF} C_w)^\alpha} \quad (4)$$

where  $S$  is sorbed ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) and  $C_w$  is solute concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ). In equation 2,  $K_F$  is the capacity-affinity parameter and  $N$  an exponent.<sup>35</sup> In eq 3,  $S_L^{\max}$  is the capacity and  $K_L$

the affinity parameter. In eq 4,  $S_{LF}^{\max}$  is capacity,  $K_{LF}$  the affinity coefficient, and  $\alpha$  an exponent.<sup>36-37</sup> The value of  $S$  was calculated by mass balance from  $C_w$  and total SMT mass added. The parameters were estimated by nonlinear regression weighted by the dependent variable (Solver in MS Excel<sup>TM</sup>).<sup>38</sup> The best model in each case was selected based on the minimum Root Mean Square Error (RMSE). Other models (Dual-Mode, two-site Langmuir, modified Langmuir, and Brunauer–Emmett–Teller<sup>39-40</sup>) were substantially inferior.

The distribution coefficient ( $K_d$ , L kg<sup>-1</sup>), a function of concentration, is defined as the ratio between  $S$  and  $C_w$ . To establish  $K_d$  curves,  $S$  was calculated via eqs 2, 3 or 4.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Properties of the Biochars.** The properties of the biochars vary widely (Table 1). CQuest stands in contrast to the others by having the lowest C, highest H/C ratio, highest ash, highest volatile C, lowest surface area, and lowest porosity. This is likely due to the pyrolysis time and temperature, which was shorter/lower for CQuest (seconds at 450 – 500 °C) than the others (hours at 600 °C). Pyrolysis time and temperature control the degree of carbonization, microporosity and fused ring size of the polyaromatic platelets.<sup>41</sup> Nitrogen-surface area is less than CO<sub>2</sub>-surface area because N<sub>2</sub> diffusion is hindered at low temperature.<sup>34</sup> The long outgassing time required for CQuest and the extremely slow equilibration with N<sub>2</sub> at low pressure ( $p/p_0 = 10^{-6}$ - $10^{-4}$ ) for PureBlack and CQuest suggest some pore clogging by volatile C, and could explain the greater range in N<sub>2</sub> than CO<sub>2</sub> surface areas.<sup>29, 42</sup>



**Isotherms for the Individual Sorbents.** At the adjusted pH of 5.0 - 5.2 used for the biochar isotherms,  $SMT^0$  reaches its maximum value of 99.7% of total SMT ( $pK_{a1}$ , 2.28;  $pK_{a2}$ , 7.42; speciation diagram in Figure S1). The traditional isotherm plots ( $C_w$  vs  $S$ ) are shown in Figure S2. Based on RMSE the Freundlich model (eq 2) universally fits best (Table S3). To facilitate discussion of trends and comparisons,  $K_{BC}$  is plotted as a function of  $C_w$  in Figure 1. Sorption among the biochars is seen to vary greatly in magnitude and concentration-dependence. The  $K_{BC}$  varies by as much as  $10^4$  at low-concentration, and consistently over the entire concentration range along the order: CQuest < Pure Black < Soil Reef < Agrichar. The degree of linearity ( $N$ ) ranges from 0.275 to 0.775 along the reverse order. Adsorption by the fast-pyrolysis biochar CQuest stands out as being markedly less intense and more linear than the others.

As given in Table S4,  $\log K_{BC}$  calculated by the Freundlich model at an environmentally relevant value of  $C_w = 0.1 \text{ mg L}^{-1}$  correlates well with %C ( $r = +0.941$ ,  $p < 0.1$ ), inversely with %H ( $r = -0.996$ ,  $p < 0.01$ ), and inversely with H/C ratio ( $r = -0.989$ ,  $p < 0.02$ ), but poorly with percent ash ( $r = -0.763$ ,  $p > 0.2$ ).  $\log K_{BC}(0.1)$  further correlates with  $N_2$  B.E.T. surface area ( $r = 0.909$ ,  $p < 0.1$ ),  $CO_2$  micropore surface area ( $r = 0.880$ ,  $p < 0.2$ ), and  $CO_2$  microporosity ( $r = 0.870$ ,  $p < 0.2$ ). (The corresponding linear correlations of  $K_{d,BC}(0.1)$  with each of those properties are universally poorer, even when expected theoretically, such as with surface area or pore volume.) Taken together, the trends indicate that biochar affinity for SMT increases with the degree of carbonization and micropore development in the biochar, consistent with other studies.<sup>43-45</sup> Maximum monolayer coverage may be calculated from the Freundlich

capacity at SMT<sup>0</sup> water solubility (500 mg L<sup>-1</sup>) and planar molecular area<sup>46</sup> (75.54 Å<sup>2</sup>). Relative to CO<sub>2</sub> micropore surface area (Table 1), the estimated monolayer coverage is: Pure Black (1.3%) ~ CQuest (1.4%) < Soil Reef (4.7%) < Agrichar (22%). These values are below 100% in part because CO<sub>2</sub> is smaller. Nevertheless, the trend is roughly the same as the trend in  $K_{BC}(0.1)$ , revealing that the greater the sorption affinity, the more efficiently the surface is utilized. As volatile C content (Table 1) follows the reverse trend, it is plausible that substances in the volatile C component reduce SMT surface coverage efficiency relative to CO<sub>2</sub>.

The isotherm for the St. Joan soil was best fit by the Langmuir-Freundlich model. The  $K_{d,soil}$  ranged from 0.31 to 0.83 L kg<sup>-1</sup> depending on concentration. It is believed that the NOM fraction dominates sorption of SMT in soils of moderate OC content.<sup>47-49</sup> The calculated  $K_{OC}$  curve for St. Joan soil is shown in Figure 1, where it is compared with the mean and range of  $K_{OC}$  values reported for other soils (Table S1) divided into two groups based on soil pH. The mean  $K_{OC}$  for the pH 4.9 – 5.8 group is slightly greater compared to the pH 6.7 – 8 group, possibly due to greater ionization of SMT<sup>0</sup> to SMT<sup>-</sup> in the latter. The  $K_{OC}$  for St. Joan soil (pH 7.42) is just below the range reported for the pH 6.7 – 8 group.

The  $K_{BC}$  for Agrichar, Soil Reef and PureBlack are greater than the  $K_{OC}$  for St. Joan soil at all SMT concentrations. Furthermore, at liquid-phase concentrations less than ~1 mg L<sup>-1</sup> — the upper end of the range found in groundwater near large-scale animal feed lots<sup>5</sup> — the  $K_{BC}$  for Agrichar, Soil Reef and PureBlack exceed the mean  $K_{OC}$  reported for all soils. By contrast,  $K_{BC}$  for CQuest is comparable to the  $K_{OC}$  for St. Joan

soil over the entire range in SMT concentrations, and is below the mean  $K_{OC}$  from the literature. Thus, at environmentally realistic levels of SMT, Agrichar, Soil Reef and PureBlack are expected to strongly enhance sorption of SMT when added to soils, whereas CQuest is expected not to.

Knowing the effect of pH on sorption to the biochars is important because SMT undergoes partial ionization ( $pK_{a2}$  7.42) between the pH of the biochar isotherms (pH 5 – 5.2) and the pH of the soil alone or biochar-soil mixtures (pH 7 – 8). In our previous study<sup>30</sup> at a single concentration (20-30  $\mu\text{g/L}$ ) we saw a 2-fold decrease between 5 and 8 for Agrichar, the one shown later to give the strongest sorption enhancement in biochar-soil mixtures. Therefore, we constructed additional isotherms for that biochar at pH 5.21, 5.98, 7.10 and 7.94 (Figure S3). The isotherms show, first, that sorption intensity varies little ( $\leq 0.23$  log units) between pH 5.21 and 7.94, despite SMT undergoing up to 77% dissociation over that range. Second, the isotherms cross over at  $\log C_w$  of  $-1.0$  to  $-0.7$ ; sorption decreases with pH above that range, and increases with pH below that range. The crossover signifies a shift in mechanism as dissolved SMT ionizes. The SI section presents further data analysis and discussion that attributes the small variation with pH and the isotherm crossover to substantial interaction of the anionic species through strong ionic hydrogen bonding with surface carboxyl and/or phenoxyl groups, as consistent with our previously study.<sup>30</sup>

**Isotherms of SMT in Weathered Biochar-Amended Soil.** For soil-biochar mixtures the Langmuir-Freundlich model fit best based on the RMSE in nearly all cases (Table S5). (The Freundlich and Langmuir models were marginally better for the unamended soils and the 2% Agrichar-soil under mild weathering.) Figure 2 plots  $K_d$  as a function of  $C_w$ , comparing soil alone and the 2% biochar-soil mixture under both weathering regimes. The analogous plots for the 1% mixture are shown in Figure S5. The corresponding conventional isotherms ( $S$  vs  $C_w$ ) are in Figure S6. Sorption in the mixtures was enhanced compared to the soil alone in relation to the amount of biochar added: 1% < 2% (except for CQuest under mild weathering, where 1% ~ 2%). Sorption enhancement in the mixtures followed the same order as sorption to the biochars: CQuest  $\leq$  PureBlack < Soil Reef < Agrichar. Agrichar gave the greatest enhancement, up to  $10^3$ -fold. These results show that biochar addition can decrease the pore water concentration of SMT in soil through sorption enhancement.

Weathering had no effect on sorption to the soil alone. However, in the mixtures sorption was clearly attenuated between the mild and severe weathering regimes. Weathering also decreased the nonlinearity of the isotherms, as is evident visually in both Figures 2 and S5.

**Predicting Sorption Enhancement by the Biochars and Quantifying the Weathering Effect.** The weathering effect can be quantified by comparing the observed sorption with sorption calculated by assuming total sorption is the sum of two independent, non-interacting domains, biochar and soil, neither of which undergo

weathering. Substituting the Langmuir-Freundlich model used for the soil and the Freundlich model used for the biochar into eq 1 gives:

$$S_{\text{mix,pred}} = \left( S_{\text{LF,soil}}^{\text{max}} \cdot \frac{(K_{\text{LF,soil}} \cdot C_w)^{\alpha_{\text{soil}}}}{1 + (K_{\text{LF,soil}} \cdot C_w)^{\alpha_{\text{soil}}}} \right) \cdot f_{\text{soil}} + (K_{\text{F,BC}} \cdot C_w^{N_{\text{BC}}}) \cdot f_{\text{BC}} \quad (5)$$

In the case of Agrichar we can use the model in eq 1S (SI section) that takes into account pH-dependent speciation:

$$S_{\text{mix,pred}} = \left( S_{\text{LF,soil}}^{\text{max}} \cdot \frac{(K_{\text{LF,soil}} \cdot C_w)^{\alpha_{\text{soil}}}}{1 + (K_{\text{LF,soil}} \cdot C_w)^{\alpha_{\text{soil}}}} \right) \cdot f_{\text{soil}} + \left[ K_{\text{F}}^0 \cdot [\text{SMT}^0]^{N_{\text{BC}}} + \frac{S_{\text{L,BC}}^{\text{max}} \cdot K_{\text{L,BC}}^- [\text{SMT}^-]}{1 + K_{\text{L,BC}}^- [\text{SMT}^-]} \right] \cdot f_{\text{BC}} \quad (6)$$

Substituting into eq 5 or 6 the appropriate parameters for the individual biochar and soil isotherms (Table S3 and S5), and the pH-dependent parameters for Agrichar (SI section), results in the predicted  $K_{\text{d,mix}}$  curve for the 2% biochar mixtures in each panel of Figure 2. The corresponding curves for 1% biochar are in Figure S5. First, note that the pH correction for Agrichar is small. It is reasonable to expect that the pH correction is small also for the other three biochars, although this will depend on pH adsorption edges for each biochar. Second, for each biochar except CQuest, the predicted  $K_{\text{d,mix}}$  is greater than the observed  $K_{\text{d,mix}}$ , more so as SMT concentration declines, more so as weathering becomes more severe, and more so for 1% than 2% biochar.

Thus, models that assume no cross-effect between biochar and soil over-predict experimental data, even for the mild weathering conditions. Sorption after severe weathering in the 2% Agrichar was from  $10^{1.2}$  to  $10^{1.9}$  times lower than predicted, and in

the 1% Agrichar was  $10^{1.3}$  to  $10^{2.5}$  times lower than predicted, depending on solute concentration. Soil Reef and Pure Black gave similar results except that they were even more susceptible than Agrichar to mild weathering. Even at the 2% levels, Soil Reef and Pure Black would be considered poorly effective at reducing SMT pore water concentration. No weathering occurred for CQuest, the weakest biochar sorbent; in fact, addition of CQuest resulted in slightly greater sorption than predicted at both levels and for both weathering regimes. The reason for this slight weathering enhancement is unclear.

Attributing all weathering effects in the mixture to the biochar component permits calculation of the intrinsic  $K_{BC}$  for weathered biochar after subtracting out the contribution of the soil:

$$K_{BC} = \frac{K_{d,mix}}{f_{BC}} - \frac{f_{soil}}{f_{BC}C_w} \left( S_{LF,soil}^{max} \cdot \frac{(K_{LF,soil} \cdot C_w)^{q_{soil}}}{1 + (K_{LF,soil} \cdot C_w)^{q_{soil}}} \right) \quad (7)$$

Plots of  $K_{BC}$  vs.  $C_w$  are shown in Figure 3 for the 2% mixture and in Figure S7 for the 1% mixture, along with those for the raw biochar from Figure 1. Compared to the raw biochar, weathering suppresses the intrinsic  $K_{BC}$  by as much as  $10^{2.5}$ -fold, depending on the biochar, SMT concentration, biochar concentration, and the weathering regime. Suppression of  $K_{BC}$  by weathering increases as SMT concentration decreases. This has the effect of increasing the linearity of the isotherm systematically with degree of weathering (raw  $\rightarrow$  mild  $\rightarrow$  severe). Suppression of  $K_{BC}$  by weathering is greater for biochar at the lower than at the higher concentration. This implies that the weathering agent is limited. The fast-pyrolysis biochar CQuest was an exception to the above

trends. Both the intrinsic  $K_{BC}$  and the linearity for CQuest actually increased slightly with weathering.

Biochar-soil mixtures without SMT were subjected to the severe weathering conditions in order to determine the effect on  $N_2$ -B.E.T. surface area (Table 2). Weathering had no significant effect on soil surface area (footnotes to Table 2). Except for CQuest, weathering generally caused a reduction in biochar surface area. Weathering reduced the surface area of each mixture relative to that calculated for the non-weathered mixture from the sum of the surface areas of the components (entries 1-4). Compared to the raw biochar (entry 5), weathering decreased the intrinsic surface area of the biochar in the mixture calculated by assigning all weathering to the biochar (entries 6 and 7). Biochars segregated in a membrane bag suspended in the soil slurry at the biochar-soil ratio of 2% lost appreciable surface area compared to the raw biochar (entry 8 vs 5). However, the segregated biochars lost less surface area than the biochars weathered in intimate contact with the soil slurry at the same 2% ratio (entry 8 vs entry 7). This is consistent with a fouling mechanism in which substances from the soil are transferred to the biochar surface through the aqueous phase, if it is assumed that mass transfer to biochar particles inside the bag is hindered. Biochars weathered in intimate contact with soil lost more surface area in the 1% than in the 2% biochar-soil mixtures (entries 6 and 7). This is also consistent with a fouling mechanism if one assumes that foulant availability from the soil source is limited—i.e., foulant coverage is greater when less biochar is present. Whether this limitation is kinetic or thermodynamic is undetermined. The results for CQuest were not as reliable due to its low raw surface

area; both intimate and segregated mixtures of CQuest even experienced slight increases in surface area with weathering, which is concordant with the slight increase in sorption (Figures 2 and S5).

**Environmental Implications.** The results indicate that it is possible to appreciably reduce the pore water concentration—therefore, the mobility and bioavailability—of SMT in soils that have received contaminated manure by amending the soil with biochar at levels of a few percent, provided the biochar is highly adsorptive to begin with. This would provide extra value to biochar as a soil amendment above its reputed values as fertilizer and carbon sink. Enhancement of SMT sorption depends dramatically on the biochar source. Adsorbent strength is favored by conditions of slow compared to fast pyrolysis, and correlates with surface area, porosity, percent carbon, and inversely with H/C ratio. This information is useful in tailoring biochars for contaminant immobilization purposes.

The weathering effect on SMT adsorption in biochar-amended soil is dramatic and manifested very quickly. For Soil Reef and PureBlack weathering quickly reduces the intrinsic  $K_{BC}$  to values approaching  $K_{OC}$  for the St. Joan soil and within, or even below, the range of  $K_{OC}$  values reported for agricultural soils (bars in Figure 3). In those cases, a comparable degree of enhancement might be achieved by adding a comparable amount of carbon from a traditional source, such as compost or biosolids. The results also show that a strong weathering effect may occur within the timeframe



typical of most sorption experiments (i.e., a few days). Thus, in a weathering study, the appropriate “non-weathered” control isotherm should be the one calculated by the sum of the individual component isotherms, not the experimental isotherm of the freshly-made mixture, as most studies have used.

In light of these and previous findings,<sup>19, 29, 50-51</sup> the most likely cause of the weathering effect is fouling of the BC by transfer of NOM from soil through soil solution to the BC surface where it competes with SMT for adsorption sites or render some fraction of sites unavailable by blocking pore entrances. The decrease in BC surface area after weathering supports a mechanism in which the foulant transfers through the aqueous phase because the decrease was observed even when the biochar was separated from the solids. While pore water cations are reported to be competitive against some organic adsorbates on carbonaceous surfaces,<sup>52-53</sup> SMT adsorption by Agrichar was unaffected by  $\text{Ca}^{2+}$  addition up to 0.1 mole/L.<sup>30</sup> Thus, metal cation competition is ruled out. Fouling by mineral precipitates is also a possibility but unlikely given the short timeframe. Sorption could also be attenuated by air- or microbial oxidation of the biochar surface. Studies indicate that polar sites attract water clusters that crowd out organic solutes.<sup>21-22</sup> Although surface oxidation may be important over the long term, in the present case major weathering takes place within a few days in an azide-poisoned medium. Because the baseline case is the sum of the individual component isotherms constructed under the same conditions as the “mild” weathering case, it is unlikely that oxidation contributed to the weathering effect we see under the mild regime, although oxidation could have contributed under the severe regime. Hale

et al.<sup>27</sup> found no significant change in elemental composition, surface area, or cation exchange capacity of a corn stover biochar alone subjected to specific biological, chemical or physical weathering conditions (except a change occurred in cation exchange capacity at 120 °C), despite finding up to 56-fold decline in  $K_{BC}$  for pyrene in the biochar-soil mixture after pre-weathering under the same conditions.

With the caveat that comparisons among different studies are tenuous because the sorbents and conditions vary, sorption of SMT to the biochars of this study seems to be more strongly affected by weathering than does sorption of other compounds to other biochars: e.g., benzene<sup>28</sup>, chlorinated aromatics<sup>29</sup>, PAHs<sup>27, 29</sup>, atrazine<sup>13</sup>, simazine<sup>10</sup>, and diuron.<sup>11, 13</sup> Further studies are needed to establish structure-property relationships. As humic substances consist of relatively large molecules, they may compete better against larger than smaller solute molecules.<sup>29</sup> Humic substances may also compete more favorably against compounds with which they share similar specific electronic interactions at the surface, such as hydrogen bonding.<sup>30</sup>

Among the slow-pyrolysis wood biochars is the first consistent evidence of the trend toward greater sorption linearity with weathering. A previous study<sup>12</sup> was inconclusive, as it found that phenanthrene sorption by pine biochar-amended soils became more linear with weathering for the soil having the lowest OC, but less linear for the two other soils. Assuming organic matter fouling, the increase in sorption linearity that accompanies weathering of biochar can be explained by classical competition theory: competitive pressure from a co-solute on a principal solute will diminish with increasing principal solute concentration, having the effect of flattening the solute's

isotherm.<sup>54</sup> A change in sorption linearity is critical information for achieving accurate predictive modeling of chemical fate in biochar-amended soil.

We conclude that weathering must be an important consideration in efforts to anticipate the impacts of biochar amendment on adsorption of organic compounds, and possibly other functions of biochar that depend on pore/surface characteristics. Further research is clearly needed to sort out the effects of solute structure, BC properties, chemical makeup of soil organic matter, relative fouling ability of soil organic matter vs. manure organic matter, and the effects of weathering over much longer periods than we employed here. We believe caution should be used when attempting to quantitatively apportion sorption to the BC fraction of soil unless weathering is taken into account. If our results can be extrapolated to other charcoals and other compounds, it is possible that the contribution to sorption by environmental BC is lower than commonly believed owing to the buildup of humic films on the BC surface. There is growing evidence to support that conclusion. We recently showed that sorption of NMR relaxation probe compounds was non-selective for the aromatic fraction of a high-organic matter soil despite the presence of 8% by count 'opaque' particles of charcoal in the sample.<sup>55</sup> Our results here also signal caution in the use of pre-combustion at 375 °C to burn off OC as a means of estimating the sorption potential of the original environmental BC. For any environmental BC that may survive volatilization under those pre-combustion conditions,<sup>56</sup> the burning off of humic coatings will undo the weathering effect, resulting in artificially high adsorption and misleading information.

## ACKNOWLEDGEMENTS

20

This research was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project CTQ2010-20156) and the U.S. Department of Agriculture, National Institute of Food and Agriculture. We thank Universitat de Barcelona for the APIF research grant for M.T., Charisma Lattao for her assistance, and the biochar companies for the samples.

### SUPPORTING INFORMATION

Further details are available on literature  $K_d$  and  $K_{OC}$  for soils; structure and speciation diagram of SMT; sources of biochars; soil mineralogy; sorption and analytical methodology; isotherms for biochars, soil and mixtures; model fitting parameters; pH effect on the Agrichar isotherm; correlations between  $K_{BC}$  and biochar properties; distribution coefficient ( $K_{d,soil}$  and  $K_{d,mix}$ ) vs. solute concentration for the soil and 1% biochar-amended soil;  $K_{BC}$  for the raw and weathered biochar at the 1% level; and Langmuir-Freundlich coefficients for biochar-amended soils. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES

1. Schmitt, H.; van Beelen, P.; Tolls, J.; van Leeuwen, C. L., Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. *Environ Sci Technol* **2004**, *38*, (4), 1148-53.
2. Heuer, H.; Schmitt, H.; Smalla, K., Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* **2011**, *14*, (3), 236-43.
3. Sarmah, A. K.; Meyer, M. T.; Boxall, A. B., A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **2006**, *65*, (5), 725-59.
4. Migliore, L.; Civitareale, C.; Brambilla, G.; Cozzolino, S.; Casoria, P.; Gaudio, L., Effects of sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L. and *Rumex acetosella* L.). *Agriculture Ecosystems & Environment* **1997**, *65*, (2), 163-168.
5. Kemper, N., Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* **2008**, *8*, (1), 1-13.
6. Carda-Broch, S.; Berthod, A., Countercurrent chromatography for the measurement of the hydrophobicity of sulfonamide amphoteric compounds. *Chromatographia* **2004**, *59*, (1-2), 79-87.
7. Thiele-Bruhn, S.; Aust, M. O., Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Arch Environ Contam Toxicol* **2004**, *47*, (1), 31-9.
8. Hamscher, G.; Pawelzick, H. T.; Hoper, H.; Nau, H., Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure. *Environ Toxicol Chem* **2005**, *24*, (4), 861-8.
9. Lehmann, J.; Joseph, S., *Biochar for environmental management : science and technology*. Earthscan: London ; Sterling, VA, 2009.
10. Jones, D. L.; Edwards-Jones, G.; Murphy, D. V., Biochar mediated alterations in herbicide breakdown and leaching in soil. *Soil Biology & Biochemistry* **2011**, *43*, (4), 804-813.
11. Yang, Y.; Sheng, G., Pesticide adsorptivity of aged particulate matter arising from crop residue burns. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, (17), 5047-51.
12. Zhang, H.; Lin, K.; Wang, H.; Gan, J., Effect of *Pinus radiata* derived biochars on soil sorption and desorption of phenanthrene. *Environ Pollut* **2010**, *158*, (9), 2821-5.
13. Martin, S. M.; Kookana, R. S.; Van Zwieten, L.; Krull, E., Marked changes in herbicide sorption-desorption upon ageing of biochars in soil. *J Hazard Mater* **2012**, *231-232*, 70-8.
14. Knauer, K.; Sobek, A.; Bucheli, T. D., Reduced toxicity of diuron to the freshwater green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in the presence of black carbon. *Aquat Toxicol* **2007**, *83*, (2), 143-8.
15. Yu, X. Y.; Ying, G. G.; Kookana, R. S., Reduced plant uptake of pesticides with biochar additions to soil. *Chemosphere* **2009**, *76*, (5), 665-71.
16. Accardi-Dey, A.; Gschwend, P. M., Assessing the combined roles of natural organic matter and black carbon as sorbents in sediments. *Environ Sci Technol* **2002**, *36*, (1), 21-29.

17. Accardi-Dey, A.; Gschwend, P. M., Reinterpreting literature sorption data considering both absorption into organic carbon and adsorption onto black carbon. *Environ Sci Technol* **2003**, *37*, (1), 99-106.
18. Xia, G. S.; Ball, W. P., Adsorption-partitioning uptake of nine low-polarity organic chemicals on a natural sorbent. *Environ Sci Technol* **1999**, *33*, (2), 262-269.
19. Cornelissen, G.; Gustafsson, O.; Bucheli, T. D.; Jonker, M. T.; Koelmans, A. A.; van Noort, P. C., Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, (18), 6881-95.
20. Xing, B.; Senesi, N.; Huang, P. M., *Biophysico-chemical processes of anthropogenic organic compounds in environmental systems*. Wiley: Hoboken, N.J., 2011; p 3-50.
21. Müller, E. A.; Hung, F. R.; Gubbins, K. E., Adsorption of Water Vapor–Methane Mixtures on Activated Carbons. *Langmuir* **2000**, *16*, (12), 5418-5424.
22. Li, Q.; Snoeyink, V. L.; Mariaas, B. J.; Campos, C., Elucidating competitive adsorption mechanisms of atrazine and NOM using model compounds. *Water Res* **2003**, *37*, (4), 773-84.
23. Zhu, D.; Kwon, S.; Pignatello, J. J., Adsorption of single-ring organic compounds to wood charcoals prepared under different thermochemical conditions. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, (11), 3990-8.
24. Kilduff, J. E.; Wigton, A., Sorption of TCE by humic-preloaded activated Carbon: Incorporating size-exclusion and pore blockage phenomena in a competitive adsorption model. *Environ Sci Technol* **1998**, *33*, (2), 250-256.
25. Newcombe, G.; Drikas, M.; Hayes, R., Influence of characterised natural organic material on activated carbon adsorption: II. Effect on pore volume distribution and adsorption of 2-methylisoborneol. *Water Research* **1997**, *31*, (5), 1065-1073.
26. Oen, A. M.; Janssen, E. M.; Cornelissen, G.; Breedveld, G. D.; Eek, E.; Luthy, R. G., In situ measurement of PCB pore water concentration profiles in activated carbon-amended sediment using passive samplers. *Environ Sci Technol* **2011**, *45*, (9), 4053-9.
27. Hale, S. E.; Hanley, K.; Lehmann, J.; Zimmerman, A.; Cornelissen, G., Effects of chemical, biological, and physical aging as well as soil addition on the sorption of pyrene to activated carbon and biochar. *Environ Sci Technol* **2011**, *45*, (24), 10445-53.
28. Kwon, S.; Pignatello, J. J., Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): pseudo pore blockage by model lipid components and its implications for N<sub>2</sub>-probed surface properties of natural sorbents. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, (20), 7932-9.
29. Pignatello, J. J.; Kwon, S.; Lu, Y., Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): attenuation of surface activity by humic and fulvic acids. *Environ Sci Technol* **2006**, *40*, (24), 7757-63.
30. Teixido, M.; Pignatello, J. J.; Beltran, J. L.; Granados, M.; Peccia, J., Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon (biochar). *Environ Sci Technol* **2011**, *45*, (23), 10020-7.
31. Soil Survey Staff; U.S. Department of Agriculture; Natural Resources Conservation Service, Keys to Soil Taxonomy. In 11th ed ed.; United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service: Washington, 2010.
32. Jackson, M. L., *Soil chemical analysis*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1958.
33. Reeuwijk, L. P. v., *Procedures for soil analysis*. 2nd ed.; International Soil Reference and Information Centre: Wageningen, The Netherlands, 1987.

34. Braida, W. J.; Pignatello, J. J.; Lu, Y.; Ravikovitch, P. I.; Neimark, A. V.; Xing, B., Sorption hysteresis of benzene in charcoal particles. *Environ Sci Technol* **2003**, *37*, (2), 409-17.
35. Essington, M. E., Soil and Water chemistry. An integrative Approach. *CRC Press, New York*. **2004**.
36. Sips, R., On the structure of a catalyst surface.2. *Journal of Chemical Physics* **1950**, *18*, (8), 1024-1026.
37. Sharma, S.; Agarwal, G. P., Interactions of proteins with immobilized metal ions: a comparative analysis using various isotherm models. *Anal Biochem* **2001**, *288*, (2), 126-40.
38. Kinniburgh, D. G., General -purpose adsorption-isotherms. *Environ Sci Technol* **1986**, *20*, (9), 895-904.
39. Xia, G.; Pignatello, J. J., Detailed sorption isotherms of polar and apolar compounds in a high-organic soil. *Environ Sci Technol* **2001**, *35*, (1), 84-94.
40. Hinz, C., Description of sorption data with isotherm equations *Geoderma* **2001**, *102*, (3-4), 405-406.
41. Cao, X.-Y., Pignatello, J. J., Li, Y., Chappell, M. A., Lattao, C., Chen, N., and Mao, J. -D., Characterization of wood chars produced at different temperatures using advanced <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Environ Sci Technol* **2012**, Under review.
42. Xing, B. S.; Pignatello, J. J., Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinyl chloride) and soil organic matter. *Environ Sci Technol* **1997**, *31*, (3), 792-799.
43. Yu, X.; Pan, L.; Ying, G.; Kookana, R. S., Enhanced and irreversible sorption of pesticide pyrimethanil by soil amended with biochars. *Journal of Environmental Sciences-China* **2010**, *22*, (4), 615-620.
44. Chen, B. L.; Zhou, D. D.; Zhu, L. Z., Transitional adsorption and partition of nonpolar and polar aromatic contaminants by biochars of pine needles with different pyrolytic temperatures. *Environ Sci Technol* **2008**, *42*, (14), 5137-5143.
45. Cao, X.; Ma, L.; Gao, B.; Harris, W., Dairy-manure derived biochar effectively sorbs lead and atrazine. *Environ Sci Technol* **2009**, *43*, (9), 3285-91.
46. Allen, F. H., The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr B* **2002**, *58*, (Pt 3 Pt 1), 380-8.
47. Białk-Bielińska, A.; Maszkowska, J.; Mroziak, W.; Bielawska, A.; Kołodziejewska, M.; Palavinskas, R.; Stepnowski, P.; Kumirska, J., Sulfadimethoxine and sulfaguanidine: Their sorption potential on natural soils. *Chemosphere* **2012**, *86*, (10), 1059-1065.
48. Thiele-Bruhn, S.; Seibicke, T.; Schulten, H. R.; Leinweber, P., Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J Environ Qual* **2004**, *33*, (4), 1331-42.
49. Lertpaitoonpan, W.; Ong, S. K.; Moorman, T. B., Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* **2009**, *76*, (4), 558-64.
50. Xing, B. S.; Pignatello, J. J.; Gliotti, B., Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environ Sci Technol* **1996**, *30*, (8), 2432-2440.
51. Cornelissen, G.; Gustafsson, O., Effects of added PAHs and precipitated humic acid coatings on phenanthrene sorption to environmental Black carbon. *Environ Pollut* **2006**, *141*, (3), 526-31.
52. Chen, G.-C.; Shan, X.-Q.; Wang, Y.-S.; Wen, B.; Pei, Z.-G.; Xie, Y.-N.; Liu, T.; Pignatello, J. J., Adsorption of 2,4,6-trichlorophenol by multi-walled carbon nanotubes as affected by Cu(II). *Water Research* **2009**, *43*, (9), 2409-2418.
53. Chen, J.; Zhu, D.; Sun, C., Effect of heavy metals on the sorption of hydrophobic organic compounds to wood charcoal. *Environ Sci Technol* **2007**, *41*, (7), 2536-41.

54. Sander, M.; Pignatello, J. J., Characterization of charcoal adsorption sites for aromatic compounds: insights drawn from single-solute and bi-solute competitive experiments. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, (6), 1606-15.
55. Lattao, C.; Cao, X.; Li, Y.; Mao, J.; Schmidt-Rohr, K.; Chappell, M. A.; Miller, L. F.; dela Cruz, A. L.; Pignatello, J. J., Sorption selectivity in natural organic matter studied with nitroxyl paramagnetic relaxation probes. *Environ Sci Technol* **2012**, *46*, (23), 12814-22.
56. Nguyen, T. H.; Brown, R. A.; Ball, W. P., An evaluation of thermal resistance as a measure of black carbon content in diesel soot, wood char, and sediment. *Org. Geochem.* **2004**, *35*, (3), 217-234.



**Table 1.** Physicochemical properties of biochars.

	Agrichar	Soil Reef	Pure Black	CQuest
Feedstock	Hardwood litter (Eucalyptus spp.)	Hardwood chips	Mixed hardwoods	Hardwood sawdust
Method of production	Slow pyrolysis, 600 °C	Slow pyrolysis, 600 °C	Slow Pyrolysis; temp. unknown	Fast pyrolysis, 450-500 °C
C, % dry weight <sup>a</sup>	91.7	77.4	80.9	70.5
H, % dry weight <sup>a</sup>	0.9	2.0	2.6	3.3
Atomic H/C	0.116	0.303	0.385	0.555
Ash, % dry weight <sup>a</sup>	1.4	7.9	3.1	10.9
volatile C, % of volatile plus fixed C <sup>b</sup>	6.5	14.4	20.7	31.0
N <sub>2</sub> -B.E.T. surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	427	338	46.6	<0.1
CO <sub>2</sub> GCMC cumulative surface area, 0-1.4 nm (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	614	578	392	157
CO <sub>2</sub> cumulative porosity (0-1.4 nm) (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	0.18	0.17	0.11	0.045
pH <sup>e</sup>	7.9	7.9	7.55	6.3

<sup>a</sup> Galbraith Laboratories, Inc., Knoxville, TN, USA. Ash content was residue after combustion at 900°C.

<sup>b</sup> Hazen Research, Inc., Golden, CO, USA.

<sup>c</sup> Based on Brunauer-Emmett-Teller fit of the N<sub>2</sub> adsorption isotherm at 77 K. CQuest gave unrealistic parameters.

<sup>d</sup> Based on Grand Canonical Monte Carlo Density Functional Theory analysis of the CO<sub>2</sub> isotherm at 273 K.

<sup>e</sup> Solid-to-pure water ratio 1:20 (w/v), after gentle mixing for 48 h.

**Table 2.** Surface area ( $N_2$  B.E.T;  $m^2 g^{-1}$ ) of non-weathered and weathered biochars in 1% and 2% biochar-soil mixtures.<sup>a</sup>

Entry	System	Agrichar	Soil Reef	Pure Black	CQuest
1	non-weathered 1% mixture <sup>b</sup>	7.65	6.76	3.85	3.39
2	weathered 1% mixture	5.39	4.13	3.94	3.57
3	non-weathered 2% mixture <sup>b</sup>	11.9	10.1	4.28	3.35
4	weathered 2% mixture	8.6	4.87	3.67	4.02
5	non-weathered biochar	427	338	46.6	<0.1 <sup>c</sup>
6	biochar weathered in intimate contact with soil in 1% mixture (calc.) <sup>d</sup>	185 ± 15	59 ± 15	39 ± 15	3 ± 15
7	biochar weathered in intimate contact with soil in 2% mixture (calc.) <sup>d</sup>	254 ± 8	68 ± 8	9 ± 8	25 ± 8
8	biochar weathered in membrane bag suspended in 2% mixture	355	137	3.46	1.55

<sup>a</sup> Estimated uncertainty, ± 5% of values, unless specified.

<sup>b</sup> Calculated from the specific surface areas of the non-weathered biochar and non-weathered St. Joan soil ( $3.42 m^2 g^{-1}$ ).

<sup>c</sup> B.E.T. parameters were unrealistic in this case.

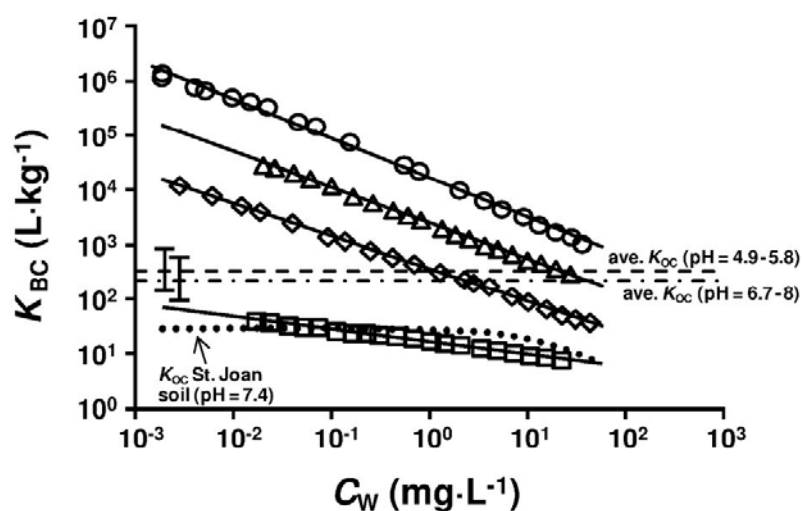
<sup>d</sup> Calculated after assigning all weathering effects to the biochar component by:

$S_{BC,wea} = [S_{mix,wea} - (1 - f_{BC})S_{soil,wea}] / f_{BC}$ , where  $S_{xx,wea}$  is the specific surface area of the weathered biochar, mixture, or soil alone ( $3.73 m^2 g^{-1}$ ), and  $f_{BC}$  is the fraction of biochar present in the mixture.

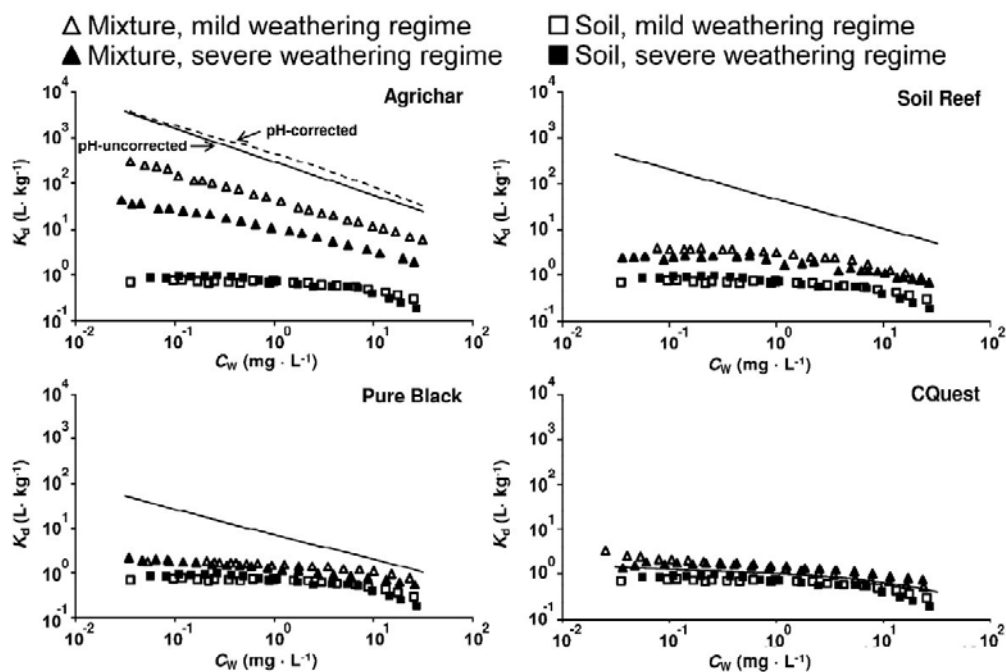
**Figure 1.** Carbon-normalized biochar-water distribution coefficients ( $K_{BC}$ ) at pH = 5 – 5.2 plotted against aqueous SMT concentration for Agrichar (circles), Soil Reef (triangles), PureBlack (diamonds) and CQuest (squares). Solid lines correspond to the Freundlich model fits (Table S3). Dashed line and dot-dashed line represent mean  $K_{OC}$  reported for 14 soils at pH 4.9 – 5.8 and for 19 soils at pH 6.7 – 8 (Table S1), with bars indicating the range. Dotted line is the  $K_{OC}$  curve for St. Joan soil at pH = 7.3 - 7.4.

**Figure 2.** Distribution coefficients of SMT for soil alone ( $K_{d,soil}$ ) and 2% biochar-amended soils ( $K_{d,mix}$ ) vs. solute concentration. Solid line is the predicted  $K_{d,mix}$  assuming no weathering from eq 5. Dashed line is the pH-corrected predicted  $K_{d,mix}$  from eq 6.

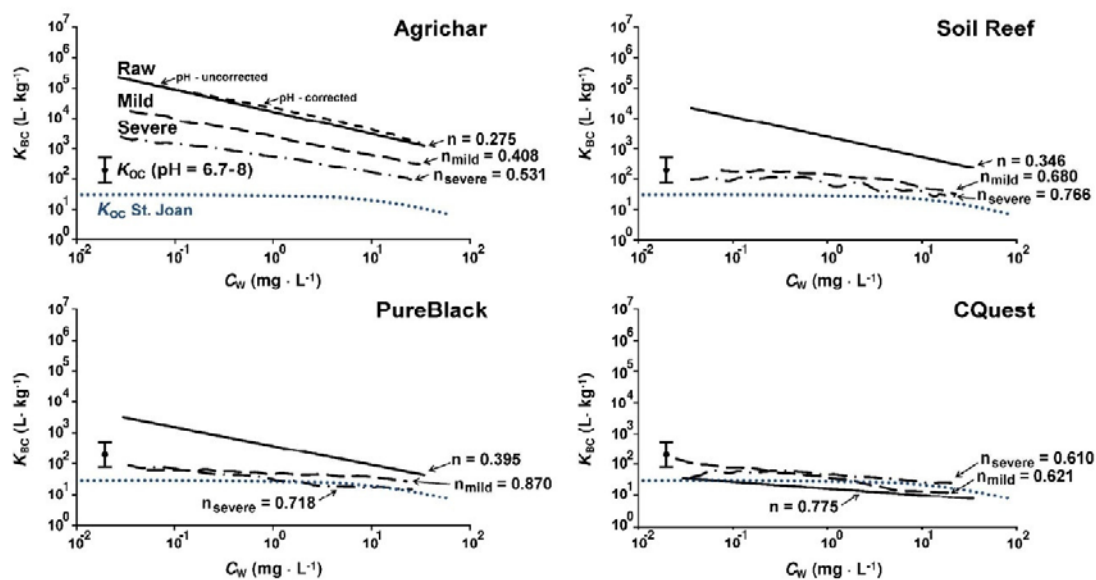
**Figure 3.** Carbon-normalized intrinsic adsorption coefficient ( $K_{BC}$ ) of sulfamethazine for raw and weathered biochars. Weathering was conducted in 2% biochar-soil mixtures under mild or severe conditions. Raw (solid lines) are taken from Figure 1, and weathered are calculated by eq 7. For Agrichar, short-dash line is raw corrected for pH. The bar shows the mean and range of literature  $K_{OC}$  values for agricultural fields (Table S1). The blue dotted curve is  $K_{OC}$  for St. Joan soil.



**Figure 1.** Carbon-normalized biochar-water distribution coefficients ( $K_{BC}$ ) at pH = 5 – 5.2 plotted against aqueous SMT concentration for Agrichar (circles), Soil Reef (triangles), PureBlack (diamonds) and CQuest (squares). Solid lines correspond to the Freundlich model fits (Table S2). Dashed line and dot-dashed line represent mean  $K_{OC}$  reported for 14 soils at pH 4.9 – 5.8 and for 19 soils at pH 6.7 – 8 (Table S1), with bars indicating the range. Dotted line is the  $K_{OC}$  curve for St. Joan soil at pH = 7.3 - 7.4.



**Figure 2.** Distribution coefficients of SMT for soil alone ( $K_{d,soil}$ ) and 2% biochar-amended soils ( $K_{d,mix}$ ) vs. solute concentration. Solid line is the predicted  $K_{d,mix}$  assuming no weathering from eq 5. Dashed line is the pH-corrected predicted  $K_{d,mix}$  from eq 6.



**Figure 3.** Carbon-normalized intrinsic adsorption coefficient ( $K_{\text{BC}}$ ) of sulfamethazine for raw and weathered biochars. Weathering was conducted in 2% biochar-soil mixtures under mild or severe conditions. Raw (solid line) are taken from Figure 1, and weathered are calculated by eq 7. For Agrichar, short-dash line is raw corrected for pH. The bar shows the mean and range of literature  $K_{\text{OC}}$  values for agricultural fields (Table S1). The blue dotted curve is  $K_{\text{OC}}$  for St. Joan soil.



Environmental Science and Technology  
Supporting Information Section

**PREDICTING CONTAMINANT ADSORPTION IN BLACK CARBON  
(BIOCHAR)-AMENDED SOIL FOR THE VETERINARY ANTIMICROBIAL,  
SULFAMETHAZINE**

MARC TEIXIDÓ,<sup>†</sup> CARLES HURTADO,<sup>†</sup> JOSEPH J. PIGNATELLO<sup>‡,§,\*</sup>, JOSÉ L.  
BELTRÁN,<sup>†</sup> MERCÈ GRANADOS,<sup>†</sup> AND JORDAN PECCIA<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Departament de Química Analítica, Carrer Martí i Franqués, 1, 3<sup>a</sup> Planta  
08028, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>‡</sup>Department of Environmental Sciences, Connecticut Agricultural Experiment  
Station, 123 Huntington St., P.O. Box 1106, New Haven, Connecticut, 06504-  
1106, U.S.A.

<sup>§</sup>Department of Chemical and Environmental Engineering, Yale University, New  
Haven, CT 06520, USA

\*Corresponding author phone: (203) 974-8518; fax: (203) 974-8502;

E-mail: [joseph.pignatello@ct.gov](mailto:joseph.pignatello@ct.gov)

---

18 pages including this page



## Table of Contents

**Figure S1.** Chemical structure and speciation of sulfamethazine (SMT).

### Procurement of Biochars

### Soil mineralogy (X-Ray powder diffraction analysis)

### Sorption Methodology and Analyses

**Figure S2.** SMT sorption isotherms on different biochars at pH 5.

### Dependence of Sorption by Agrichar on pH

**Figure S3.** Agrichar sorption isotherms at different pH values and the simultaneous fit to a four-term dual speciation model (eq 1S). Sorbed concentration is referenced to elemental carbon.

**Figure S4.** Species contributions to sorption of SMT by Agrichar at pH 7.94.

**Figure S5.** Distribution coefficient ( $K_{d,soil}$  and  $K_{d,mix}$ ) vs. solute concentration of SMT for the soil and 1% biochar-amended soil.

**Figure S6.** Langmuir-Freundlich model fits of SMT sorption isotherms for the soil and biochar-amended soils.

**Figure S7.** Intrinsic sorption coefficient ( $K_{BC}$ ) of SMT in the raw and the weathered biochar-amended soil at the 1% level.

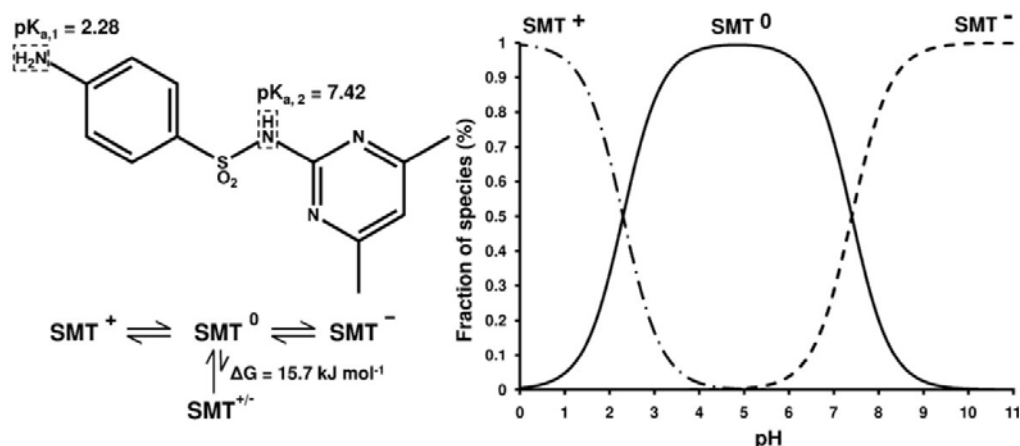
**Table S1.** Distribution coefficients ( $K_d$ ) and organic-carbon normalized sorption coefficients ( $K_{OC}$ ) for SMT in soils reported in the literature.

**Table S2.** Soil mineralogy: global semi-quantitative results for the soil minerals.

**Table S3.** Regression Freundlich parameters for SMT sorption on the biochars at pH = 5.0 – 5.2. Standard deviations are given in parentheses.

**Table S4.** Linear and semi-log correlations of SMT sorption ( $K_{d,BC}$  at pH = 5.0 – 5.2 calculated by the Freundlich model at  $C_w = 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and biochar physicochemical properties.

**Table S5.** SMT Langmuir-Freundlich coefficients ( $K_{LF}$ ,  $S_{LF}^{max}$  and  $\alpha$ ) for biochar-amended soils with their standard deviations.



**Figure S1.** Left: Chemical structure of sulfamethazine (SMT), acidity constants reported in literature<sup>1</sup> and the equilibria between species. Right: SMT speciation diagram as a function of pH.

### Procurement of Biochars

Agrichar® was a gift from BEST Energies Australia, Somersby, Australia. Soil Reef® was a gift from EcoTechnologies Group, LLC, Berwyn, PA, USA. Pure Black™, originally purchased from BuyActivatedCharcoal.com, Crawford, NE, USA, was a gift from Prof. Nicholas Basta (Ohio State University). CQuest® was purchased from Dynamotive Energy Systems Corp., McLean, VA, USA. Agrichar and CQuest were powdery and used as received; the others were gently crushed to pass a 2mm sieve. Biochar and air-dry soil in a 1% or 2% (w/w) ratio were pre-blended on a roller mixer for 24 h.

### X-ray powder diffraction

Qualitative and semi-quantitative phase analyses were performed by X-ray powder diffraction. Both powder and oriented aggregate samples were prepared and analyzed. From the powder sample a semi-quantification of the non-clay minerals was achieved and a ratio 82/18 Quartz/Illite was determined. The oriented aggregates were analyzed as prepared, after treatment in ethylene glycol and after thermal treatment at 550 °C. Four kinds of clay minerals were identified and a semi-quantification between them was carried out. A final global

semi-quantitative analysis of clay and non-clay minerals was then obtained (Table S2).

### **Sorption Methodology and SMT Analyses**

Sorption of SMT ( $\geq 99\%$ ; Sigma–Aldrich) was determined in batch in 10 mM  $\text{CaCl}_2$  and 1.5 mM  $\text{NaN}_3$  background solution using a solids-to-liquid ratio to ensure  $\geq 20\%$  SMT uptake:  $4 \times 10^{-4}$  (Agrichar and Soil Reef),  $1 \times 10^{-2}$  (Pure Black),  $1 \times 10^{-1}$  (CQuest),  $4 \times 10^{-2}$  (Agrichar-soil mixtures) and  $6 \times 10^{-1}$  (other biochar-soil mixtures and soil alone).

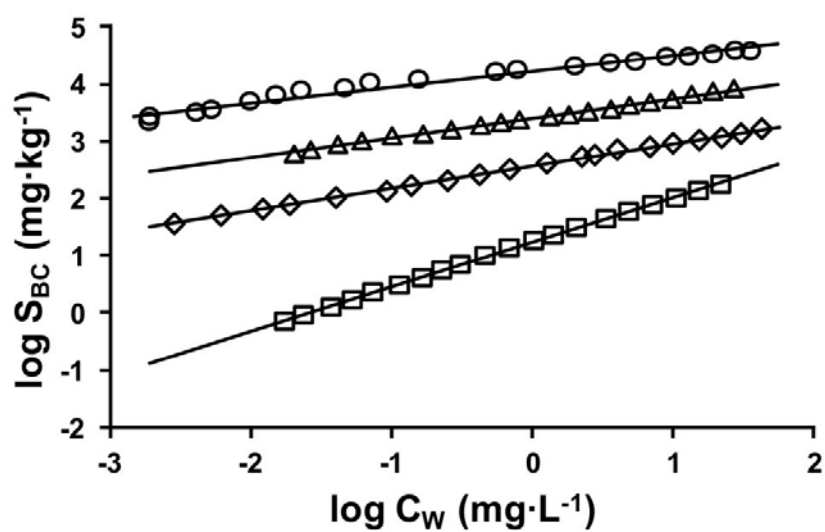
The initial pH was adjusted to 5.0 – 5.2 with HCl for biochar alone, but left unadjusted for soil and soil-biochar mixtures. The solids were pre-wetted by flooding with 70% or more of the final background solution volume and gently agitated for 48 h at  $20.0 \pm 0.2$  °C in a rotary mixer, prior to adding SMT in a small volume of methanol (final methanol content, 0.5% v/v). A parallel sorbent-free control was run with each sample. Vials were gently mixed at  $20.0 \pm 0.2$  °C for 48 h.

The pH changed only slightly, if at all, during sorption equilibration. The final pH is the one used in calculations. The average final pH for St. Joan soil alone was, mild (7.51), severe (7.49). The average final pH for the 1% mixtures was (mild; severe): Agrichar (7.07; 7.09), Soil Reef (7.46 7.64), PureBlack (7.46; 7.59), and CQuest (7.54; 7.66). The average final pH for the 2% mixtures was (mild; severe): Agrichar (7.43; 7.11), Soil Reef (7.53; 7.68), PureBlack (7.56; 7.65), and CQuest (7.61; 7.99).

At termination of an experiment reaction vials were centrifuged and the (now clear) supernatant filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ). SMT was quantified in the supernatant by liquid chromatography (LC) on an Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) using ultraviolet detection (UV; 268 nm) or fluorescence (FL; 405 nm excitation, 485 nm emission) detection, depending on the concentration range, and employing external calibration. The columns were a 5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4mm Supelco Discovery C-18 column (Bellefonte, PA, USA), or a 5  $\mu\text{m}$ , 250 $\times$ 4mm Merck LiChrospher 100 RP-18 (Darmstadt, Germany, EU). The samples were

filtered (0.45  $\mu\text{m}$  nylon filter). For the UV method, 50  $\mu\text{L}$  was injected into the mobile phase consisting of 80% 10 mM acetic acid/ammonium acetate (pH 4.5) and 20% acetonitrile flowing at 1  $\text{ml min}^{-1}$ . For the FL method, a pre-column derivatization method was used.<sup>2</sup> A 1-mL aliquot was mixed with 1 mL  $\text{HCO}_2\text{H}/\text{HCO}_2\text{Na}$  buffer (pH 3.4), and then combined with 2 mL 0.2% fluorescamine ( $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich) in acetonitrile. Sulfameter (Sigma-Aldrich) was added as internal standard to correct for fluorescence attenuation, and the mixture left to stand for  $\geq 2$  h in the dark. After filtering, 50  $\mu\text{L}$  were injected to the chromatographic system. Mobile phase consisted of a 30:70 (v/v) of 10 mM aqueous  $\text{HCO}_2\text{H}/\text{HCO}_2\text{Na}$  (pH 3.4) and acetonitrile at 1  $\text{ml min}^{-1}$ . The limit of quantification (10-times baseline noise) was 13 or 0.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  for UV or FL, respectively.

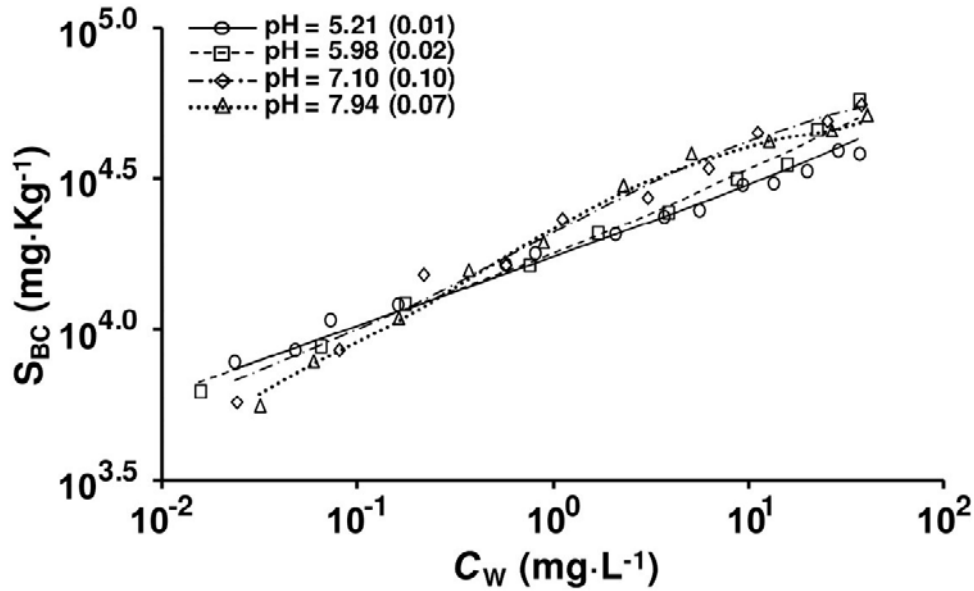
Confidence tests showed  $< 1\%$  “bottle” losses and  $\leq 3.5\%$  effects on sorption by up to 0.6% methanol.



**Figure S2.** Sorption isotherms of SMT at pH = 5.0 - 5.2 on Agrichar (circle), Soil Reef (triangle), PureBlack (diamond) and CQuest (square).  $S_{BC}$  is the carbon-normalized sorbed concentration by the biochar, and  $C_W$  is the liquid-phase concentration. Solid lines correspond to Freundlich fits.

### Dependence of Sorption by Agrichar on pH.

Sorption to Agrichar between pH 5 and 8 is shown in Figure S3.



**Figure S3.** Agrichar sorption isotherms at different pH values and the simultaneous fit to a four-term dual speciation model (eq 1S). Sorbed concentration is referenced to carbon.

The isotherms were fit to a two-term model, the first dependent on the concentration of  $\text{SMT}^0$  in solution and the second dependent on the concentration of  $\text{SMT}^-$  in solution. The first was chosen to obey the Freundlich equation, congruent with our experience with all four biochars at pH 5 where  $\text{SMT}^0$  dominates the speciation in water (Figure S1). The second term was chosen to obey the Langmuir equation. Total sorption is thus given by,

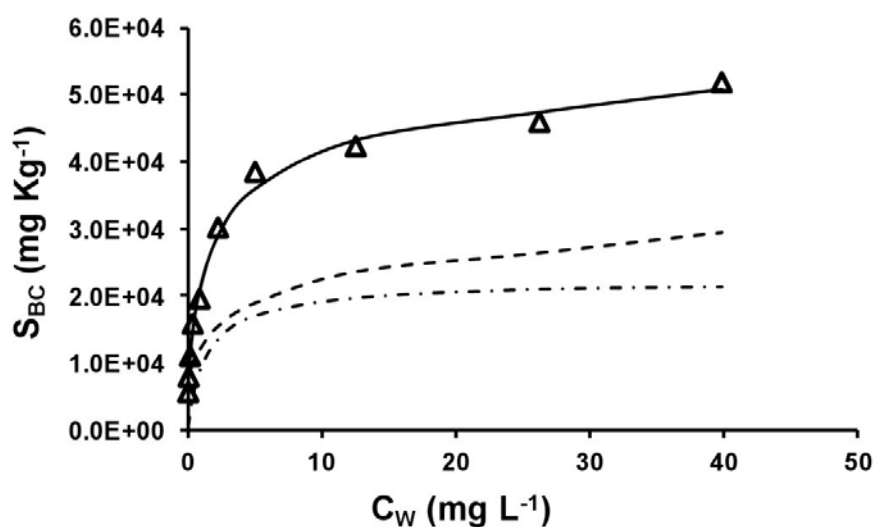
$$S_{BC} = K_{F,BC}^0 \cdot [\text{SMT}^0]^{N_{BC}^0} + \frac{S_{L,BC}^{\max-} \cdot K_{L,BC}^- \cdot [\text{SMT}^-]}{1 + K_{L,BC}^- \cdot [\text{SMT}^-]} \quad (1S)$$

$$\text{where } [\text{SMT}^0] = C_w \cdot \frac{[\text{H}^+]}{K_{a2} + [\text{H}^+]} \quad \text{and} \quad [\text{SMT}^-] = C_w \cdot \frac{K_{a2}}{K_{a2} + [\text{H}^+]}$$

and where  $K_{\text{F,BC}}^0$  and  $N_{\text{BC}}^0$  are the Freundlich affinity and exponential parameters corresponding to  $\text{SMT}^0$ ;  $S_{\text{L,BC}}^{\text{max}-}$  and  $K_{\text{L,BC}}^-$  are the Langmuir maximum capacity and affinity parameters, respectively; and  $K_{a2}$  is the second acidity constant of SMT ( $10^{-7.42}$ ).

A simultaneous optimization of eq 1S for all four parameters at all pH, with 50 data total, gave (standard error):  $\log K_{\text{F,BC}}^0 = 4.21(0.02)$ ,  $N_{\text{BC}}^0 = 0.260(0.011)$ ,  $\log S_{\text{L,BC}}^{\text{max}-} = 4.29(0.03)$  and  $K_{\text{L,BC}}^- = 1.69(0.41)$  and  $r^2 = 0.980$ . As a check, we separately fit the isotherm at pH 5.21 to the Freundlich equation (20 data;  $\log K_{\text{F,BC}}^0 = 4.22(0.02)$ ;  $N_{\text{BC}}^0 = 0.275(0.015)$ ;  $r^2 = 0.980$ ) and then used the resulting parameters as constants in eq 1S in a simultaneous optimization of the isotherms at the other pHs (30 data;  $\log S_{\text{L,BC}}^{\text{max}-} = 4.22(0.03)$ ;  $K_{\text{L,BC}}^- = 2.41(0.68)$ ;  $r^2 = 0.980$ ). Figure S3 displays the simultaneous fit using the four-parameter fit to the eq 1S. The goodness of fit for both approaches and the reasonable agreement of the parameters between the two approaches supports a mechanism in which sorption can be modeled as being contributed separately by two processes.

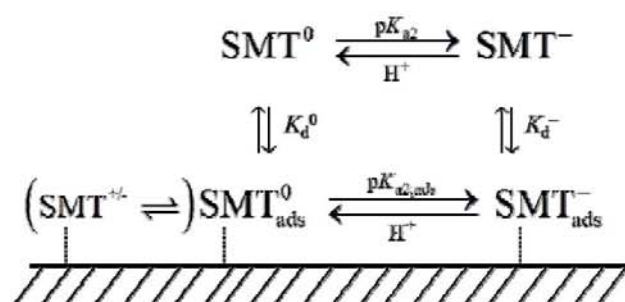
At pH 7.94 the  $\text{SMT}^0$  term of eq 1S contributes slightly more than the  $\text{SMT}^-$  term (Figure S4).



**Figure S4.** Species contributions to total carbon-referenced sorption of SMT to Agrichar at pH 7.94: data (open triangles), fit to dual-speciation model (eq 1S, solid curve), calculated contribution of  $SMT^0$  term (dashed curve), and calculated contribution of  $SMT^-$  term (dashed-dot curve).

In our previous study<sup>3</sup> we postulated that adsorption occurs according to the depiction in Scheme 1. We showed that up to pH  $\sim 9.5$  adsorbed SMT exists predominantly as the neutral form,  $SMT^0_{ads}$  (possibly also the zwitterion,  $SMT^{+/-}_{ads}$ ). Above pH  $\sim 9.5$ ,  $SMT_{ads}$  exists as a mixture of  $SMT^0_{ads}$  and  $SMT^-_{ads}$ , the two species becoming roughly equal in concentration by about pH 9.8 – 9.9. This suggests that the  $pK_{a2,ads}$  of SMT is about 2.3 – 2.4 units greater than  $pK_{a2}$  of SMT in solution (7.42). Thus, at pH 7.94,  $SMT^-$  in solution generates mainly  $SMT^0_{ads}$  on the surface. In solution we observed an increase in pH simultaneous with adsorption, consistent with proton-transfer to  $SMT^-_{ads}$  to form  $SMT^0_{ads}$ , as shown.<sup>3</sup>



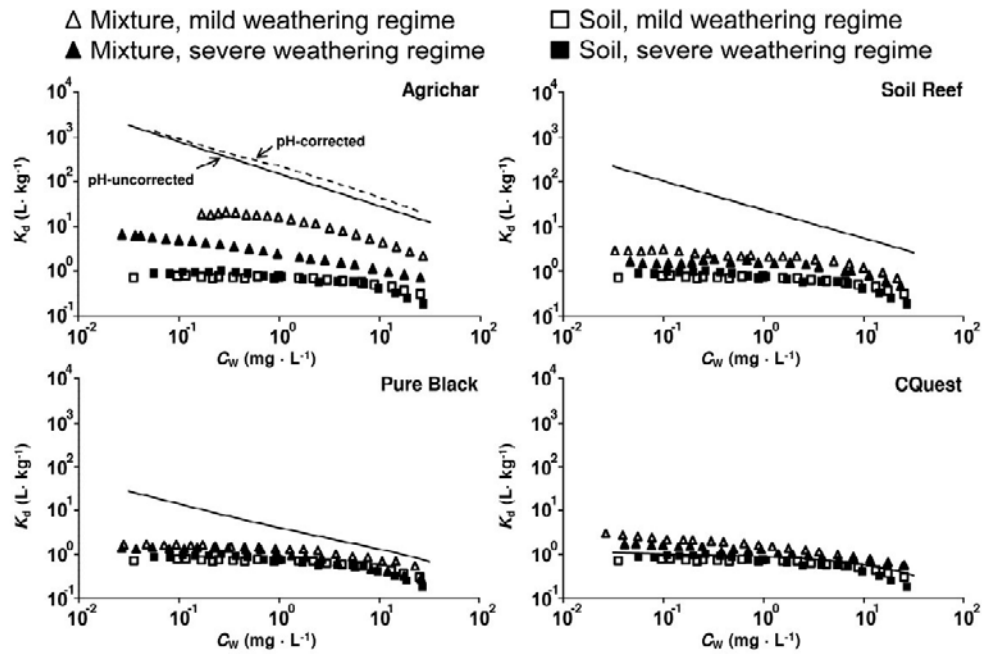


Scheme 1.

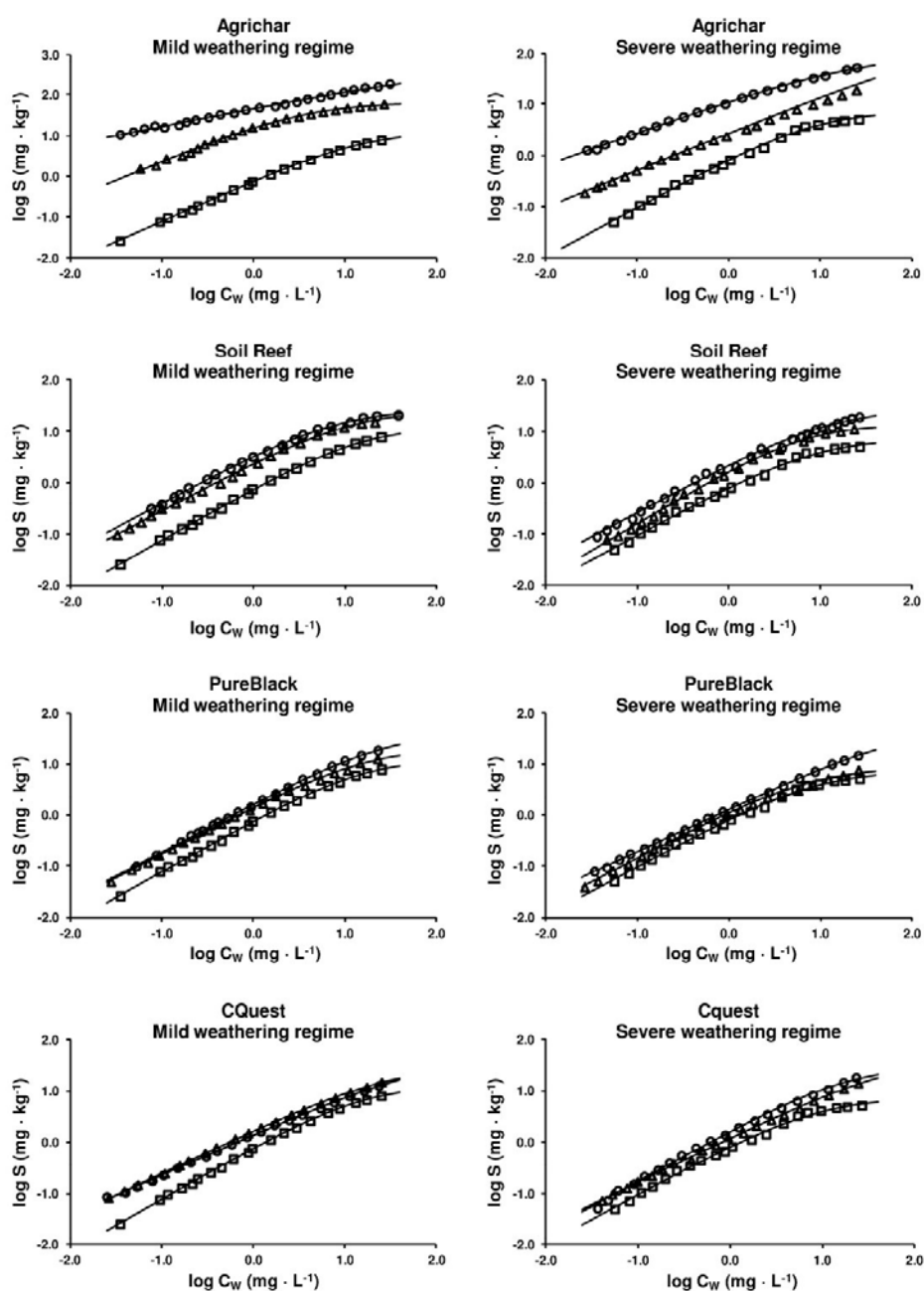
Adsorption of SMT is augmented by formation of exceptionally strong ionic hydrogen bonds between the sulfonamide group and carboxylate and/or phenolate groups on the BC surface that have intrinsic  $\text{p}K_a$  values comparable to  $\text{p}K_{a2}$ . This reaction can be written,



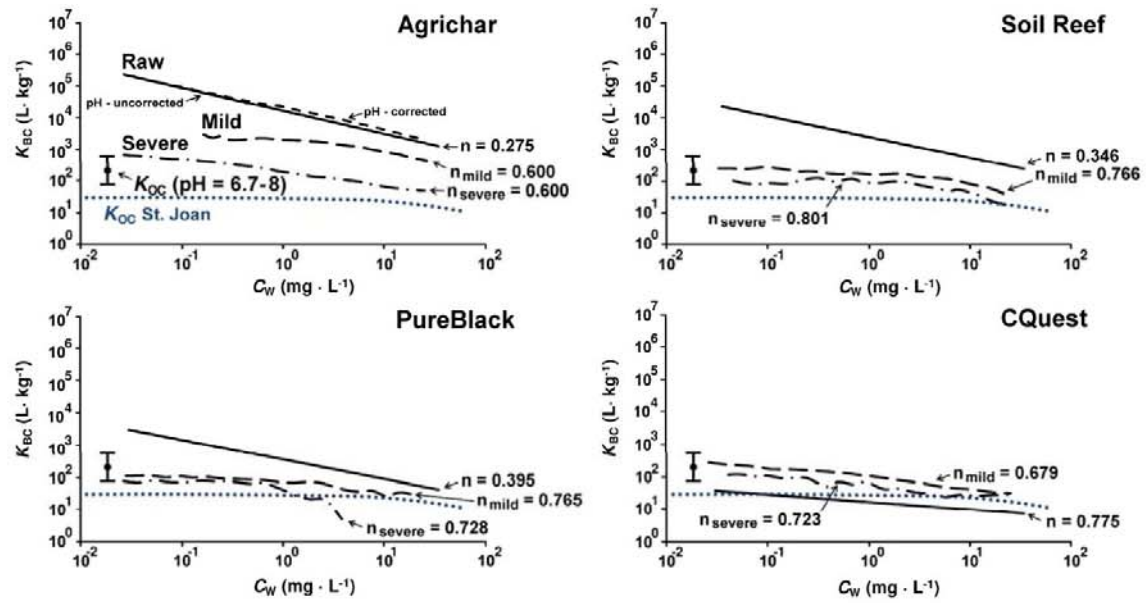
Our results here are consistent with that hypothesis.



**Figure S5.** Distribution coefficients of SMT for soil alone ( $K_{d,soil}$ ) and 1% biochar-amended soils ( $K_{d,mix}$ ) vs. solute concentration. Solid line is the predicted  $K_{d,mix}$  assuming no weathering from eq 5. Dashed line is the pH-corrected predicted  $K_{d,mix}$  from eq 6.



**Figure S6.** SMT sorption isotherms for the biochar-amended soils. Square, triangle and circle symbols represent 0, 1 and 2% levels, respectively. S refers to SMT concentration in the total solids. Solid lines correspond to the Langmuir-Freundlich model fits (eq 4). Equilibrium pH values are given in Figures 2 and S5.



**Figure S7.** Elemental carbon-normalized intrinsic adsorption coefficient ( $K_{d,BC}$ ) of sulfamethazine for raw and weathered biochars. Weathering was conducted in 1% biochar-soil mixtures under conditions of mild or severe exposure. Raw are taken from Figure 1, and weathered are calculated by eq 7. For Agrichar, short-dash line is raw corrected for pH. The bar shows the mean and range of literature  $K_{OC}$  values for agricultural fields (Table S1). The blue dotted curve is  $K_{OC}$  for St. Joan soil.

**Table S1.** Reported soil-water distribution coefficients ( $K_d$ ) and organic-carbon normalized sorption coefficients ( $K_{oc}$ ) for SMT in soils. The table only includes soils having a pH ranging from 4.9 to 5.8 and from 6.7 to 8.

Reference Number	pH	OC (%)	$K_d$ (L·kg <sup>-1</sup> )	$K_{oc}$ (L·kg <sup>-1</sup> )
4	5.5	0.1	0.58	579
	5.5	1.4	1.22	90
	5.5	2.2	2.52	115
	5.5	2.7	3.77	140
	5.5	3.8	3.91	103
5	5.3	1.0	4.60	460
	5.6	1.0	3.9	390
	5.6	1.1	4.50	409
	5.4	2.1	22	1048
	5.7	2.1	17	810
6	5.8	0.7	1.20	174
	5.2	2.5	3.10	125
	4.9	1.0	2.00	208
	4.9	1.22	1.00	82
4	7	0.1	0.64	640
	7	1.4	0.98	70
	7	2.2	1.98	90
	7	2.7	2.55	94
	7	3.8	2.84	75
	8	0.1	0.32	320
	8	1.4	0.55	39
	8	2.2	1.33	60
	8	2.7	1.38	51
	8	3.8	1.70	45
5	7.4	1.0	2.50	250
	6.7	2.1	14	667
	7.2	2.1	10	476
	7.7	2.1	9.80	467
	7.2	1.1	4.00	364
	7.3	1.1	3.10	282
6	6.9	1.1	1.00	82
7	7	1.6	2.40	149
8	7.5	1.6	0.79	49.1

**Table S2.** Soil mineralogy: global semi-quantitative results for the soil minerals.

Clay minerals (%)		Non-clay minerals (%)	
Illite/mica	12.7	Quartz	58
Kaolinite	6.4	Plagioclase	6
Chlorite	4.8	Calcite	5
Smectite	2.4	Potassium feldspar	3
		Dolomite	1.5

**Table S3.** Regression Freundlich parameters for SMT sorption on the biochars at pH = 5.0 – 5.2. Standard deviations are given in parentheses.

Sample	Number of data	Log $K_F$	N	$r^2$
Agrichar	20	4.22 (0.02)	0.275 (0.015)	0.980
Soil Reef	20	3.40 (0.12)	0.346 (0.010)	0.992
PureBlack	20	2.56 (0.11)	0.395 (0.010)	0.995
CQuest	20	1.23 (0.17)	0.775 (0.017)	0.997

**Table S4.** Linear and semi-log correlation coefficients ( $r$ ) between SMT sorption ( $K_{d,BC}$  at pH = 5.0 – 5.2 calculated by the Freundlich model at  $C_w = 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and biochar physicochemical properties from Table 1.

Physicochemical property	$r$ for correlation between $K_{d,BC}$ and property	$r$ for correlation between $\log K_{d,BC}$ and property
C, % dry weight	+0.8735 <sup>a</sup>	+0.9414 <sup>b</sup>
H, % dry weight	-0.8553 <sup>a</sup>	-0.9962 <sup>e</sup>
Atomic H/C ratio	-0.8213 <sup>a</sup>	-0.9887 <sup>d</sup>
Ash, % dry weight	-0.6777 <sup>ns</sup>	-0.7633 <sup>ns</sup>
Volatile C, % of volatile plus fixed	-0.7537 <sup>ns</sup>	-0.9686 <sup>c</sup>
N <sub>2</sub> -B.E.T surface area (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	+0.7111 <sup>ns</sup>	+0.9087 <sup>b</sup>
CO <sub>2</sub> GCMC cumulative surface area, 0-1.4 nm (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	+0.5732 <sup>ns</sup>	+0.8796 <sup>a</sup>
CO <sub>2</sub> cumulative porosity (0-1.4 nm) (cm <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> )	+0.5588 <sup>ns</sup>	+0.8703 <sup>a</sup>

Significance levels: <sup>ns</sup> not significant, <sup>a</sup>  $p < 0.2$ , <sup>b</sup>  $p < 0.1$ , <sup>c</sup>  $p < 0.05$ , <sup>d</sup>  $p < 0.02$  and <sup>e</sup>  $p < 0.01$ .

1 **Table S5.** SMT Langmuir-Freundlich coefficients for biochar-amended (1% or 2%) St. Joan soil with their standard deviations.

Soil	Parameters	Mild weathering regime				Severe weathering regime			
		0%	1%	2%		0%	1%	2%	
<b>Agrichar</b>	$K_{LF}$	0.064 (0.004)	0.282 (0.023)	0.004 (0.006)	0.11 (0.03)	0.018 (0.07)	0.038 (0.012)		
	$\alpha$	1.008 (0.02)	0.925 (0.034)	0.454 (0.038)	0.97 (0.09)	0.72 (0.03)	0.639 (0.027)		
	$S_{LF}^{max}$	12.7 (0.4)	65.6 (1.9)	620 (290)	7.4 (0.8)	48.9 (8.4)	99.2 (11)		
	$r^2$	0.9997	0.9974	0.9913	0.9892	0.9982	0.9979		
<b>Soil Reef</b>	$K_{LF}$	0.064 (0.004)	0.085 (0.023)	0.123 (0.014)	0.11 (0.03)	0.15 (0.01)	0.08 (0.02)		
	$\alpha$	1.008 (0.02)	0.946 (0.072)	0.955 (0.047)	0.97 (0.09)	1.06 (0.04)	0.95 (0.1)		
	$S_{LF}^{max}$	12.7 (0.4)	26.0 (3)	27.1 (1.2)	7.4 (0.8)	14.2 (0.6)	26.9 (3.9)		
	$r^2$	0.9997	0.9942	0.9967	0.9892	0.9982	0.9896		
<b>Pure Black</b>	$K_{LF}$	0.064 (0.004)	0.058 (0.020)	0.032 (0.005)	0.11 (0.03)	0.13 (0.05)	0.011 (0.003)		
	$\alpha$	1.008 (0.02)	0.937 (0.075)	0.951 (0.023)	0.97 (0.09)	0.94 (0.13)	0.84 (0.02)		
	$S_{LF}^{max}$	12.7 (0.4)	21.5 (3.5)	44.6 (3.5)	7.4 (0.8)	8.6 (1.4)	58.4 (9.1)		
	$r^2$	0.9997	0.9935	0.9994	0.9892	0.9776	0.9995		
<b>CQuest</b>	$K_{LF}$	0.064 (0.004)	0.029 (0.007)	0.012 (0.003)	0.11 (0.03)	0.015 (0.006)	0.05 (0.02)		
	$\alpha$	1.008 (0.02)	0.836 (0.033)	0.788 (0.02)	0.97 (0.09)	0.86 (0.04)	0.98 (0.09)		
	$S_{LF}^{max}$	12.7 (0.4)	32.5 (3.9)	46.23 (6.7)	7.4 (0.8)	44.5 (9.8)	30.5 (6.2)		
	$r^2$	0.9997	0.9987	0.9995	0.9892	0.9985	0.9924		



## References

1. Lin, C. E.; Chang, C. C.; Lin, W. C., Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis .3. Citrate buffer as a background electrolyte. *J. Chromatogr. A* **1997**, *768*, (1), 105-112.
2. Raich-Montiu, J.; Folch, J.; Compano, R.; Granados, M.; Prat, M. D., Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1172*, (2), 186-93.
3. Teixido, M.; Pignatello, J. J.; Beltran, J. L.; Granados, M.; Peccia, J., Speciation of the ionizable antibiotic sulfamethazine on black carbon (biochar). *Environ Sci Technol* **2011**, *45*, (23), 10020-7.
4. Lertpaitoonpan, W.; Ong, S. K.; Moorman, T. B., Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* **2009**, *76*, (4), 558-64.
5. Kurwadkar, S. T.; Adams, C. D.; Meyer, M. T.; Kolpin, D. W., Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, (4), 1370-1376.
6. Langhammer, J. P. Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Univ. of Bonn, Bonn, **1989**.
7. Thiele-Bruhn, S.; Seibicke, T.; Schulten, H. R.; Leinweber, P., Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J Environ Qual* **2004**, *33*, (4), 1331-42.
8. Thiele-Bruhn, S.; Aust, M. O., Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Arch Environ Contam Toxicol* **2004**, *47*, (1), 31-9.

### 4.2.3. Discussió dels resultats

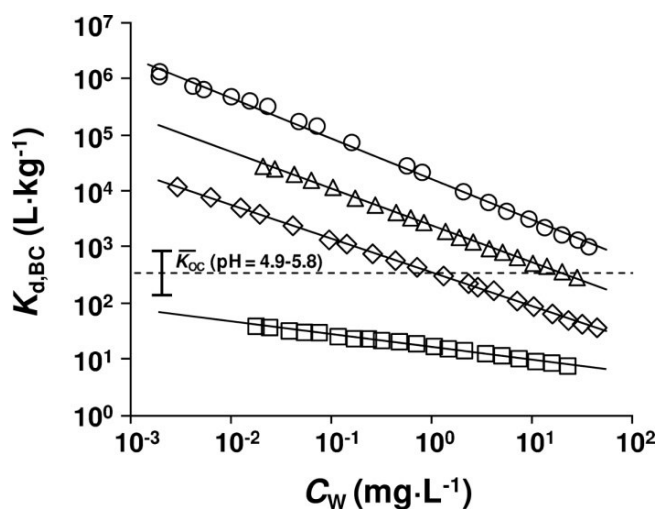
#### Sorció de SMT en el sistema biochar-aigua

S'ha estudiat la sorció de SMT en quatre biochars diferents (Agrichar, Soil Reef, PureBlack i CQuest). Aquests materials, que provenen de diferents tipus de biomassa i han estat processats en condicions de piròlisi diferents presenten un interval de propietats fisicoquímiques (Taula 3.2, pàgina 94).

Les isoterms de sorció de SMT en els sistemes biochar-aigua s'han obtingut a pH 5, on predomina l'espècie neutra de la SMT. En la Figura 4.3 es representen el valors de  $K_{d,BC}$  en funció de  $C_w$ . En aquesta figura els valors de  $K_d$  s'han normalitzat al contingut de carboni de cada biochar ( $K_{d,BC}$ ) per poder comparar amb els valors de  $K_{OC}$  de SMT en sòls que es troben en la bibliografia.

$$K_{d,BC} = \frac{100 \cdot K_d}{C(\%)} \quad (4.6)$$

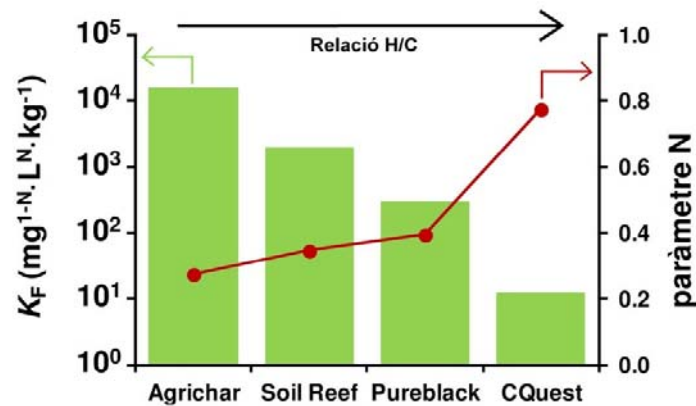
Els valors de  $K_{d,BC}$  oscil·len entre  $10^1$  i  $10^6$  en funció del biochar i de la concentració de SMT. L'Agrichar, amb una superfície específica més elevada, és el que proporciona una retenció més efectiva de SMT. La Figura 4.3 mostra com  $K_{d,BC}$  disminueix amb la  $C_w$ . A més, la figura també mostra com Agrichar, Soil Reef i Pureblack, per sota d'una  $C_w$  de SMT d'1 mg L<sup>-1</sup>, poden presentar una sorció de SMT més elevada que la mitjana de 14 valors de  $K_{OC}$  procedents de la bibliografia corresponents a sòls de pH 5 [46-48]. Per contra, el CQuest presenta una sorció molt inferior a la dels altres biochars i els valors de  $K_{OC}$  bibliogràfics.



**Figura 4.3.**  $K_{d,BC}$  en funció de  $C_w$  en diferents biochars (pH 5 – 5.2). Símbols: cercles (Agrichar), triangles (Soil Reef), rombes (PureBlack) i quadrats (CQuest). Les línies sòlides representen els ajustos de cada isoterma al model de Freundlich. Les línies discontinües representen la mitjana dels valors de  $K_{OC}$  corresponents a sòls a pH 5 de la bibliografia.

Les dades experimentals s'han ajustat al model de Freundlich (equació 2.3), que ha demostrat que la intensitat de la sorció ( $K_F$ ) augmenta en funció del grau de carbonització (relació H/C) i la superfície específica del material (Figura 4.4). Així doncs, la magnitud de la sorció de SMT en aquests materials segueix el següent ordre: Agrichar > Soil Reef > PureBlack > CQuest (que coincideix amb el grau de carbonització), indicant que la retenció de SMT es veu afavorida per la porositat del material.

Pel que fa a la linealitat de les isoterms, aquesta disminueix en augmentar el grau de carbonització (Figura 4.4). Tal com s'ha comentat en la introducció, la no linealitat es pot atribuir a interaccions específiques entre la  $SMT^0$  i setis actius en la superfície del biochar. Per tant, el sorbent presenta una saturació progressiva a mesura que augmenta  $C_w$ , indicant que cada cop es més difícil per a les molècules de sorbat trobar aquest tipus de setis disponibles. Aquesta pèrdua de linealitat fa que la magnitud de la sorció disminueixi significativament en augmentar la  $C_w$ . Per exemple en el cas de l'Agrichar, aquest presenta una disminució de la sorció de fins a 3 ordres de magnitud en variar la  $C_w$  de  $10^{-3}$  a  $10^2 mg L^{-1}$ .



**Figura 4.4.** Resultats de l'ajust de les dades a l'equació de Freundlich per a cada biochar estudiat.

Alguns autors han observat que en augmentar el grau de carbonització d'un carbó, la sorció de compostos orgànics experimenta una transició, que va des d'una sorció menys intensa i una isoterma de comportament més lineal (simulant la "partició" que s'observa en la matèria orgànica, setis menys específics) cap a una sorció més intensa i no lineal (sorció en superfície en uns setis més específics) [49-51]. Aquest fet s'explica per l'existència de dues fases en aquests materials, una més carbonitzada i una menys carbonitzada, on la proporció d'aquestes depèn de les condicions de piròlisi [52]. Es considera que els biochars amb un alt contingut de H (relació H/C > 0.55), encara conserven una alta quantitat de residus orgànics vegetals de caràcter més alifàtic en la seva estructura i presenten una sorció de característiques semblants a la matèria orgànica del sòl (relativament baixa en magnitud i amb un paràmetre N proper a la unitat) [53]. En canvi, si les condicions de piròlisi han estat suficientment intenses, el biochar presenta una estructura més carbonitzada, rígida, microporosa i aromàtica que es tradueix en una sorció més elevada i una isoterma de caràcter no lineal [54-55]. En aquests últim cas, el biochar presenta una sorció amb les mateixes característiques que altres materials de carboni naturals, com el negre de carboni o el carbó [56-57]. En el cas de l'Agrichar (relació H/C = 0.116), la sorció sembla tenir lloc majoritàriament en el domini més carbonitzat de la superfície. En l'altre extrem es trobaria el CQuest (relació H/C = 0.555), amb una sorció semblant a la matèria orgànica. Soil Reef i PureBlack (relació H/C = 0.303 i 0.385, respectivament) presenten situacions intermèdies.

D'acord amb aquests resultats, els biochars produïts mitjançant una piròlisi més lenta (grau de carbonització superior i un desenvolupament dels porus més important), semblen

els sorbents més efectius per retenir SMT. Així doncs, amb la finalitat d'elucidar els mecanismes de sorció implicats en la retenció de SMT es va escollir estudiar a fons l'Agrichar.

### Mecanisme de sorció de SMT en el sistema Agrichar-aigua

Els experiments preliminars de sorció en Agrichar a pH 5 van confirmar que per a considerar que s'ha arribat a l'equilibri són suficients 48 hores. El posterior ajust de les dades a un model cinètic exponencial amb dos compartiments de sorció, adaptat del model de desorció de contaminants en sediments desenvolupat per Cornelissen *et al.* [58], ha demostrat que unes 2/3 parts de la SMT en solució es sorbeixen de manera ràpida (en setis més accessibles) i la resta ho fa d'una manera més lenta (setis menys accessibles).

L'estudi de la sorció en funció del pH i el posterior ajust de les dades a un model que considera la contribució de cadascuna de les espècies a la sorció ( $K_d^+$ ,  $K_d^0$  i  $K_d^-$ ) [59], ha demostrat que l'espècie neutra ( $SMT^0$ ) és la més fortament retinguda en l'Agrichar amb un  $\log K_{d,SMT^0} = 6.04$  (Taula 4.1). D'altra banda, les espècies aniònica i catiònica també presenten una sorció força considerable ( $\log K_{d,SMT^+} = 5.50$ ,  $\log K_{d,SMT^-} = 4.91$ ). Aquestes evidències semblen indicar que les interaccions de tipus hidrofòbic, així com les forces de vdW, juguen un paper clau en el procés de sorció de  $SMT^0$ . En el cas de les espècies iòniques hi ha d'haver intervenció d'altres mecanismes que donin lloc a una sorció tan elevada. Les dades normalitzades dels valors de  $K_d$  amb el seu corresponent  $K_{OW}$  (Taula 4.1) indiquen que tant l'espècie catiònica com l'aniònica podrien presentar algun tipus d'estabilització en superfície.

**Taula 4.1.** Contribució a la sorció en Agrichar de cadascuna de les espècies de SMT en solució.

	SMT <sup>+</sup>	SMT <sup>0</sup>	SMT <sup>-</sup>
Log $K_{d, Agrichar}$	5.50 (0.05)	6.04 (0.02)	4.91 (0.03)
Log $K_{OW}$ <sup>1</sup>	-1.30	0.27	-2.09
Log $K_{d, Agrichar} / K_{OW}$	6.80	5.77	7.00

<sup>1</sup> Carda- Broch *et al.* [60].

La magnitud de la sorció de les tres espècies de SMT en Agrichar és superior als valors observats per altres sorbents estudiats en la bibliografia, excepte pel carbó actiu (Taula 4.2). Aquest fet podria estar relacionat amb la superfície específica més elevada d'aquest últim en comparació amb la del biochar. Si ens centrem en la sorció de l'espècie neutra, aquesta pot ser fins a 5 – 6 ordres de magnitud superior a l'observada en argiles de referència (montmorillonita i caolinita) i sòls. A més, si comparem els valors obtinguts amb la sorció d'altres espècies neutres de la mateixa família (sulfatiazole, sulfametoxazole i sulfapiridina), trobem que la sorció d'Agrichar és entre 3 i 4 ordres de magnitud superior a les determinades en àcids húmics, nanotubs de carboni (CNT: *carbon nanotubes*), grafit i altres sorbents d'origen orgànic (compost i fems).

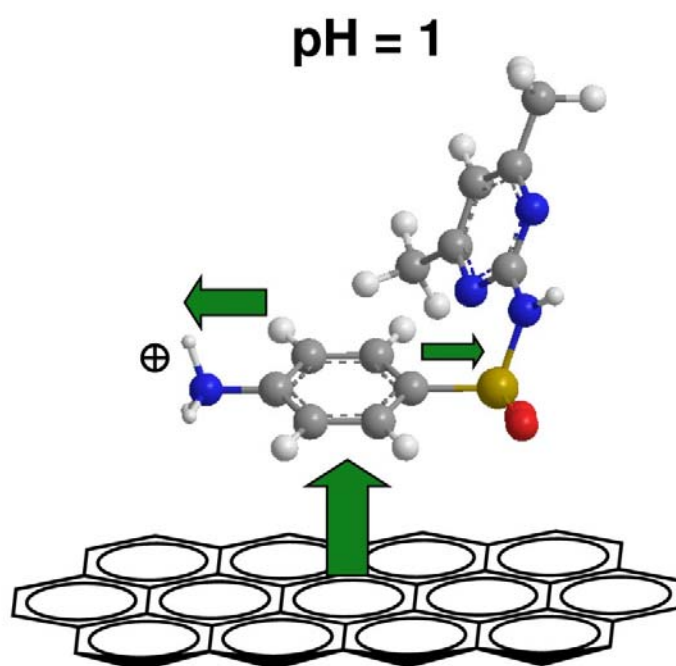
**Taula 4.2.** Recull de dades bibliogràfiques sobre la sorció de les diferents espècies de sulfametazina (SMT), sulfatiazole (STZ), sulfametoxazole (SMX) i sulfapiridina (SPY).

Sorbat	Sorbent	Log $K_d^+$	Log $K_d^0$	Log $K_d^-$	Referència
SMT	Agrichar	5.50 (0.05)	6.04 (0.02)	4.91 (0.03)	Aquesta tesi
	Argila de ref.	2.86 – 3.51	0.36 – 1.35	–	[61]
	Sòl	0.16 – 0.98	-0.35 – 0.50	-0.60 – 0.09	[46]
STZ	Àcid húmic	4.68	2.34 – 3.30	0.97	[62-63]
	Compost	3.55	1.81	0.88	[63]
	Fem	2.81	1.82	1.13	[63]
SMX	CTN	–	3.60 – 3.99	2.50	[64-65]
	Carbó actiu	–	7.20	6.85	[66]
	Grafit	–	2.60	1.60	[65]
SPY	CTN	–	4.50	–	[65]
	Grafit	–	3.00	–	[65]

Els experiments de sorció en presència de competidors, a pH 1, 5 i 10.5, han servit per entendre i elucidar els principals mecanismes de sorció que tenen lloc entre cada espècie de SMT i l'Agrichar.

L'experiment de competició realitzat a pH 1, on la  $SMT^+$  representa un 97 % de la SMT en solució, ha posat de manifest que la força iònica o bescanvi catiònic no influeixen en la sorció. Aquest fet està d'acord amb la càrrega positiva de l'Agrichar a pH àcid (el punt isoelèctric és a pH = 4.1, segons les mesures de potencial  $\zeta$ ). D'altra banda, a pH 1 és

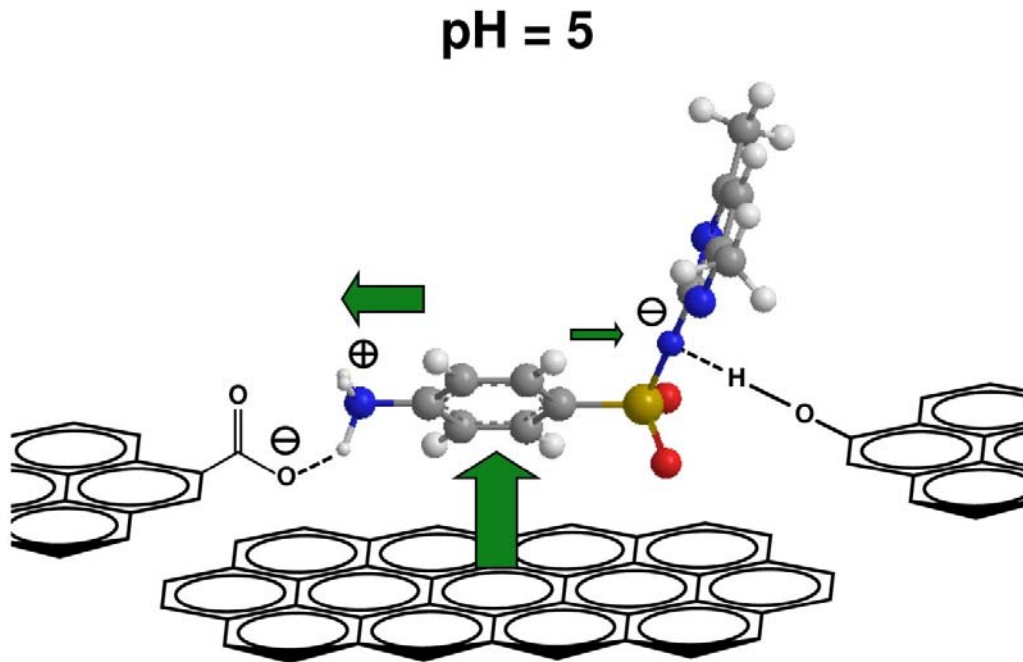
clau l'existència d'un sistema  $\pi$  en l'estructura del competidor per tal de dificultar la sorció de la  $\text{SMT}^+$ . La major competició del naftalè (amb un lleuger caràcter de donador  $\pi$ ) en comparació amb el 2,4-dinitrotuè (amb un fort caràcter acceptor  $\pi$ ), ha evidenciat que les interaccions  $\pi$ - $\pi$  EDA són fonamentals en la sorció de la  $\text{SMT}^+$  (Figura 4.5). De fet, en aquest cas es tracta d'una interacció tipus  $\pi^+$ - $\pi$  EDA, ja que involucra un sistema catiònic (el grup amino de la SMT està protonat), amb una energia d'enllaç fins i tot superior a la de tipus  $\pi$ - $\pi$  EDA [67].



**Figura 4.5.** Interacció  $\pi^+$ - $\pi$  EDA involucrada en el mecanisme de sorció de  $\text{SMT}^+$  en Agrichar a pH 1.

Els experiments de competició a pH 5, on la  $\text{SMT}^0$  predomina en solució (99.3 %) i la superfície del biochar presenta càrrega negativa neta, han suggerit que la presència d'un sistema  $\pi$  en l'estructura del competidor (com el trimetilfenilamoni) pot disminuir significativament la sorció de  $\text{SMT}^0$ . Aquest fet indica que a més de les interaccions hidrofòbiques i de vdW, les interaccions de tipus  $\pi$ - $\pi$  EDA també podrien tenir un rol important a aquest pH. Per la seva banda, la lleugera disminució del pH en afegir  $\text{SMT}^0$  s'atribueix a que aproximadament un 30 % de la sorció ve acompanyada de l'alliberament d'un protó a la solució. Aquest fet es pot justificar si es considera que la  $\text{SMT}^0$  pot esdevenir  $\text{SMT}^{+/-}$ , mitjançant una reacció de tautomerització de baix cost energètic, i interaccionar mitjançant  $\pi^+$ - $\pi$  EDA (Figura 4.6). En aquest escenari, algun grup funcional

de la superfície del biochar podria perdre algun protó i establir la càrrega positiva del grup amino de la SMT. Per la seva banda, la càrrega negativa del grup sulfonamido podria ser estabilitzada per punts d'hidrogen amb grups no ionitzats de la superfície (p.ex. fenols).

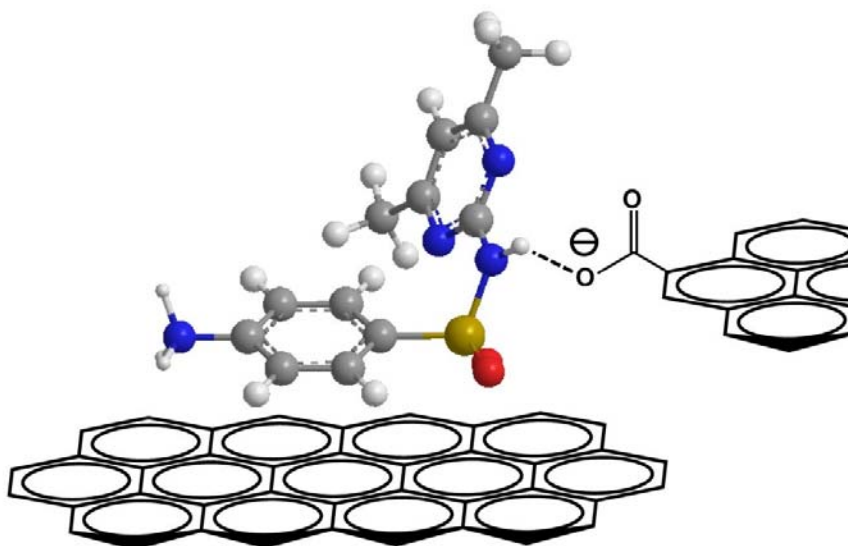


**Figura 4.6.** Interaccions tipus  $\pi^+ - \pi$  EDA i pont hidrogen involucrades en el mecanisme de sorció de  $SMT^{+/-}$  (tautòmer de la  $SMT^0$ ) en Agrichar a pH 5.

L'experiment de competició a pH 10.5, on el 99.9% de la SMT es troba en forma aniònica i la superfície del biochar presenta càrrega negativa neta, ha permès descartar que la sorció es produeixi mitjançant bescanvi aniònic, formació d'un parell iònic i/o coordinació amb metalls presents en forma d'impureses en la superfície del biochar. D'altra banda, l'estudi de la variació del pH en afegir  $SMT^-$  ha posat de manifest que el pH augmenta amb la quantitat de SMT addicionada al sistema (pràcticament cada mol de  $SMT^-$  que és retingut allibera 1 mol de  $OH^-$ ). Per tant, es dedueix que la  $SMT^-$  capta un protó de la solució i un cop neutra ( $SMT^0$ ) s'adsorbeix en el biochar (Figura 4.7). L'estudi també justifica la formació de punts d'hidrogen amb els grups funcionals d'oxigen ionitzats en la superfície del biochar (fenols, carboxils, etc.).

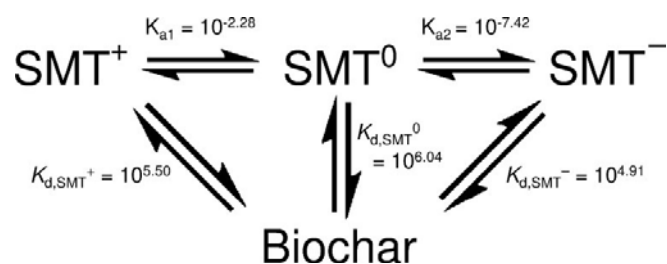


pH = 10.5



**Figura 4.7.** Interacció per pont d'hidrogen involucrada en el mecanisme de retenció de SMT<sup>-</sup> en Agrichar a pH 10.5.

Aquests mecanismes de sorció donen lloc, des del punt de vista macroscòpic, a una disminució del  $pK_{a1}$  aparent i un augment del  $pK_{a2}$  aparent de la SMT. Aquest fet està d'acord amb els coeficients de distribució de les diferents espècies de SMT ( $K_{d, SMT^+}$ ,  $K_{d, SMT^0}$  i  $K_{d, SMT^-}$ ), on la més elevada és la de l'espècie neutra, i per tant quedant més estabilitzada aquesta forma Figura 4.8. Aquest efecte també l'han descrit altres autors estudiant la sorció de sulfonamides en materials orgànics i sòls [63, 68].



**Figura 4.8.** Diferents equilibris de la SMT en un sistema biochar-aigua.

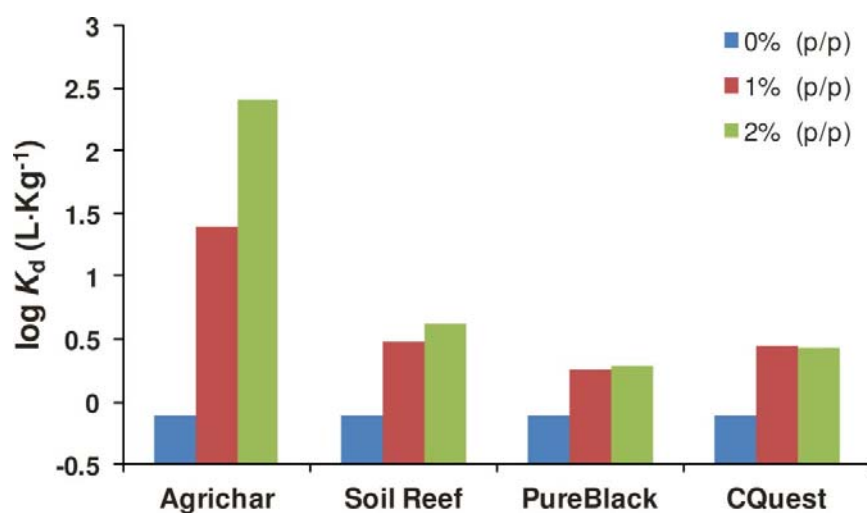
Durant els últims anys, alguns treballs han apuntat que la sorció d'hidrocarburs aromàtics en sorbents de carboni podria estar facilitada per les interaccions  $\pi$ - $\pi$  EDA [69-71]. Pel que fa a la sorció de sulfonamides en aquests tipus de sorbents, aquest estudi complementa els pocs treballs publicats fins al dia d'avui [65, 72]. Zhang *et al.* [64]

proposen que tant l'espècie catiònica com la neutra del sulfametoxazole poden utilitzar el seu caràcter  $\pi$  acceptor per interaccionar amb el caràcter  $\pi$  donador d'un CNT amb un alt contingut de grups hidroxil. En la mateixa línia, Ji *et al.* [65], també afirmen que la sorció de sulfametoxazole en CNT es regeix per una combinació de forces de vdW i interaccions  $\pi$ - $\pi$  EDA. No obstant, cal tenir en compte que aquests estudis basen les seves conclusions a partir de les isoterms de sorció i de les propietats físico-químiques dels sorbents.

### **Mescles sòl-biochar (sistema sòl+biochar-aigua)**

Un cop caracteritzada la sorció de SMT en biochar, s'han dut a terme estudis sobre la sorció d'aquest fàrmac en un sòl esmenat amb biochar (mescles sòl-biochar). Els experiments s'han realitzat amb el sòl S4, les propietats del qual es troben detallades en la Taula 3.1 (pàgina 92). D'aquesta manera, és possible comprovar l'efecte que pot produir en la sorció d'un sòl afegir diferents quantitats de biochar, així com també determinar l'efecte que poden produir els diferents components del sòl en la capacitat de sorció del propi biochar. Les dades experimentals en aquests sistemes s'han ajustat amb el model de Langmuir-Freundlich [20].

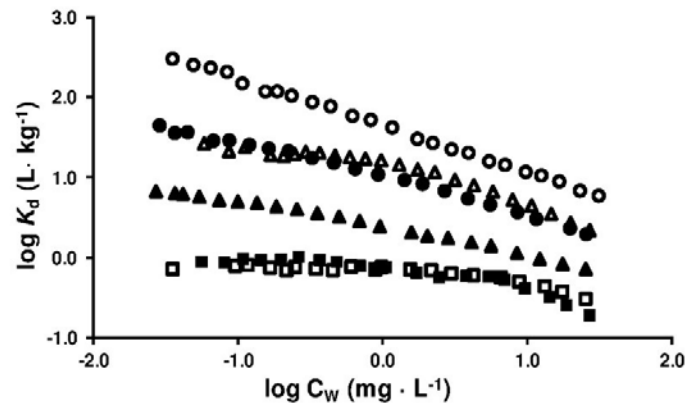
Les isoterms de sorció de SMT en mescles sòl-biochar al 1 i 2 % (p/p) acabades de preparar, han demostrat que és possible augmentar la sorció de SMT. La Figura 4.9 mostra l'efecte de l'addició dels diferents biochars sobre la sorció de SMT en un sòl esmenat. En aquesta figura destaca l'augment de la sorció, d'uns 3 ordres de magnitud, que produeix l'addició d'Agrichar.



**Figura 4.9.** Efecte de l'addició de biochar (0, 1 i 2 %) sobre la sorció de SMT en un sòl natural (Sòl S4, Taula 3.1, pàgina 92). Valors de  $\log K_d$  calculats a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

En addicionar biochar a un sòl es poden donar canvis biològics, físics i químics al llarg del temps [73-76]. Aquests canvis són coneguts com l'efecte desgast (*weathering* o *aging*) [77]. Un dels principals és l'atenuació de la sorció amb el temps per part de les mescles sòl-biochar. D'altra banda, aquesta disminució de la sorció dels sorbats depèn de les propietats fisicoquímiques de sòl, biochar, sorbats i condicions ambientals [78], però s'explica majoritàriament per un recobriment de la superfície del biochar per part de la matèria orgànica o altres contaminants presents en el sòl. Aquest procés s'anomena incrustació o *fouling* [79]. En aquesta tesi s'ha posat de manifest que el temps de contacte entre biochar i sòl és determinant en la capacitat de sorció de les mescles.

Les isoterms d'Agrichar i Soil Reef de les mescles desgastades durant un mes han mostrat un descens significatiu de la sorció (fins a 1 ordre de magnitud). En el cas de PureBlack, la disminució és pràcticament imperceptible, mentre que en el cas del CQuest fins i tot s'arriba a observar un lleuger augment de la sorció. Les mesures de superfície específica han posat de manifest que la superfície específica de les mescles més desgastades disminueixen (amb l'excepció del CQuest), el que fa pensar que la matèria orgànica dissolta provinent del sòl, recobreix el biochar, i disminueix la seva capacitat de sorció [79]. A tall d'exemple es mostra l'efecte produït en desgastar les mescles sòl-Agrichar (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Isotermes de sorció de les mesclades desgastades (28 dies a 40 °C, símbols plens) i poc desgastades (2 dies a 20 °C, símbols buits) sòl-Agrichar al 0 % (□), 1 % (Δ) i 2 % (○).

Per tal de quantificar la variació en la capacitat de sorció de biochar dins el sistema sòl-biochar, s'ha calculat el valor de  $K_{d,intrínsec}$  de cada biochar, que resulta de sostreure la contribució del sòl a la sorció observada per la mescla. Aquest valor permet comparar el canvi que experimenta la sorció intrínseca del biochar al entrar en contacte amb el sòl. Els resultats han mostrat com Agrichar, Soil Reef i PureBlack veuen reduïda significativament la seva sorció intrínseca per l'efecte desgast. En el cas particular del Soil Reef el  $K_{d,intrínsec}$  pot disminuir fins a  $10^{2.5}$  vegades a  $C_w$  baixes ( $<100 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Per tant, l'efecte desgast produeix que la magnitud de la sorció per part del biochar, tendeixi als valors de  $K_{OC}$  observats per la matèria orgànica del sòl. D'altra banda, una altra conclusió que es pot extreure d'aquest treball és que el desgast, a part de disminuir la sorció, augmenta la linealitat de la majoria d'aquests sistemes (exceptuant CQuest). Aquests fet pot estar relacionat amb la substitució de setis de biochar pels de la matèria orgànica dissolta, provocant que la isoterma de sorció esdevingui més lineal.

En resum, aquest estudi ha indicat que la utilització de determinats tipus de biochars (de piròlisi lenta, altament carbonitzats i amb una superfície específica prou important) podria augmentar la retenció de SMT en el sòl. Per tant, els futurs estudis s'haurien de realitzar en biochars amb aquestes característiques fisicoquímiques. D'altra banda, aquest treball també ha demostrat que caldria tenir en compte l'efecte desgast a l'hora de modelitzar i predir la sorció d'aquests sistemes a llarg termini.

### 4.3. Tractament de dades d'isotermes de sorció

Tal com s'ha esmentat en el capítol d'introducció d'aquesta tesi, el procés de sorció controla destí final d'un contaminant en el medi ambient. Per tant, una bona modelització de la sorció és essencial per tal d'estimar el transport i avaluar el risc ambiental que representa [80]. Així doncs, la selecció de la equació de sorció és una etapa crítica per tal d'aconseguir prediccions de transport acurades [20].

Les dues isotermes més emprades en els estudis de sorció en el sòl són les equacions de Langmuir (equació 2.2) i Freundlich (equació 2.3) [81-82]. Històricament, la determinació dels paràmetres d'aquests models, a partir de les dades experimentals ( $C_W$  i  $C_S$ ), s'ha realitzat mitjançant la linealització de les equacions i el posterior anàlisi de les dades per mínims quadrats ordinaris. En les equacions següents s'indiquen les formes linealitzades del model de Langmuir i Freundlich (equacions 4.7 i 4.8, respectivament).

$$\frac{1}{C_S} = \frac{1}{b} \cdot \frac{1 + K_L \cdot C_W}{K_L \cdot C_W} = \frac{1}{b} + \frac{1}{b \cdot K_L} \cdot \frac{1}{C_W} \quad (4.7)$$

$$\log(C_S) = \log(K_F) + N \cdot \log(C_W) \quad (4.8)$$

No obstant, quan les equacions contenen tres o més paràmetres, l'ajust a les dades experimentals implica la utilització d'un mètode de regressió no lineal per mínims quadrats (NLLS) [83]. D'altra banda, existeixen estudis que no recomanen la linealització de les equacions de la isoterma, sempre i quan sigui possible, ja que poden donar resultats deficients [84-86]. En aquesta línia, en la bibliografia es troben diferents alternatives per tal de resoldre aquests sistemes, com l'eina Solver integrada en el full de càlcul MS-Excel [87], programes de càlcul específics (ISOFIT [88]) i programari general de tipus matemàtic/estadístic com Origin [89] (OriginLab Corp., Northampton, MA, EUA), Matlab [90] (Mathworks, Natick, MA, EUA) o Sigma Plot [91] (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

En general, els mètodes de mínims quadrats no lineals es basen en la minimització d'una funció objectiu ( $U$ ), que depèn d'un conjunt de paràmetres a optimitzar (com per exemple, els paràmetres de l'equació de sorció).  $U$  es defineix com la suma dels quadrats dels errors residuals ( $e$ ), calculats com les diferències entre una magnitud mesurada (p. ex.,

$C_{S,exp,i}$ ), i els valors calculats a partir d'un cert model avaluat (p. ex.,  $C_{S,calc,i}$ ). D'altra banda, es recomana la utilització de pesos estadístics ( $w_i$ ) en la funció objectiu [19]:

$$U = \sum_{i=1}^n w_i \cdot (e_i)^2 = \sum_{i=1}^n w_i \cdot (C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i})^2 \quad (4.9)$$

On  $C_{S,exp,i}$  i  $C_{S,calc,i}$  indiquen les concentracions experimentals i calculades en fase sòlida per a cada punt experimental  $i$ , sent  $n$  el nombre total de punts. Els valors de  $C_{S,calc,i}$  es determinen a partir de les concentracions de solut en la fase líquida ( $C_{W,exp,i}$ ) i els paràmetres corresponents al model d'isoterma que es planteja. Per exemple, en una isoterma de tipus Freundlich, els valors de  $C_{S,calc,i}$  es calculen segons:

$$C_{S,calc,i} = K_F \cdot C_{W,exp,i}^N \quad (4.10)$$

En una regressió per NLLS, el sistema es considera resolt quan s'assoleix el valor mínim de la funció objectiu ( $U_{min}$ ). Així, els paràmetres optimitzats es determinen com els corresponents a  $U_{min}$ . Per tal de decidir quina isoterma descriu millor el comportament d'un sistema determinat, cal provar diferents models de sorció, i escollir el que presenta un funció objectiu inferior. A més, cal tenir en compte altres consideracions estadístiques, com el nombre total de paràmetres que defineixen una isoterma o els errors estimats dels paràmetres optimitzats. Generalment, aquest és el procediment habitual per tal de determinar i optimitzar els paràmetres que descriuen una isoterma de sorció.

En aquest treball s'ha desenvolupat una funció que calcula les concentracions teòriques de solut a l'equilibri en les fases sòlida i líquida ( $C_{W,calc}$  i  $C_{S,calc}$ ), a partir de les condicions experimentals del sistema ( $M_S$ ,  $V_W$  i  $C_0$ ) per a un determinat model de sorció (juntament amb els seus corresponents paràmetres). Aquest càlcul s'aconsegueix mitjançant la resolució iterativa del balanç de massa per a cada punt experimental de la isoterma. Així, la funció objectiu a minimitzar es pot definir en base als residuals en  $C_W$ ,  $C_S$ , tots dos simultàniament, o altres combinacions, com el valor de  $K_d$  en cada punt del sistema estudiat.

Per tal de resoldre els balanços de massa per a cada punt i facilitar la seva utilització, s'ha desenvolupat una funció definida per l'usuari (*user-defined function*) en el full de càlcul MS-Excel. Aquesta funció conté els models de sorció més habituals com a equacions

predefinides. A més, també es poden introduir models de sorció de forma literal en cas que l'usuari consideri que cap de les predefinides es correspon amb les seves dades experimentals.

La posterior optimització dels paràmetres de l'equació es pot dur a terme mitjançant l'aplicació de l'eina Solver inclosa a MS-Excel, o bé es pot utilitzar una macro d'Excel, també desenvolupada en aquest treball, i que es basa en l'algorisme iteratiu de Gauss-Newton modificat per Levenberg-Marquardt.

Per tal de comprovar el bon funcionament d'aquest nou procediment, la funció i la macro desenvolupades en aquesta tesi s'han aplicat a diferents conjunts de dades de sorció descrits en la bibliografia. També s'ha comprovat que el procediment funciona correctament en diferents versions d'Excel, corresponents a les versions MS-Office 2003, 2007 i 2010 per MS-Windows, i MS-Office 2011 per Apple MacOSX. Els resultats obtinguts s'han comparat amb els que es donen en la bibliografia, així com amb els obtinguts mitjançant el programa ISOFIT [88].

### 4.3.1. Fonament matemàtic

#### Resolució del balanç de massa

El nucli principal d'aquest desenvolupament s'anomena "ISOT\_Calc" i és una funció d'Excel definida per l'usuari. Aquesta funció, així com la macro d'optimització que es descriu en el següent apartat, està escrita en MS "Visual Basic for Applications" (VBA). La funció ISOT\_Calc resol les equacions del balanç de massa mitjançant l'algorisme de Newton (també anomenat mètode de la tangent o de Newton-Raphson) [92], i calcula les concentracions teòriques en les fases sòlida i líquida a l'equilibri ( $C_{S,calc}$  i  $C_{W,calc}$ , respectivament) a partir d'un model d'isoterma i unes determinades condicions experimentals. Per exemple, podem considerar un sistema que segueix un comportament de tipus Freundlich, en el que tenim les següents condicions experimentals: un volum  $V_W$  de fase líquida, una concentració inicial de solut  $C_0$  i una massa  $M_s$  de sòl. Una vegada assolit l'equilibri de sorció, la concentració de sorbat que queda en la fase líquida és  $C_{W,exp}$ . Per tant, la concentració de solut en fase sòlida es determina de la següent manera:

$$C_{S,exp} = V_W \cdot \frac{C_0 - C_{W,exp}}{M_S} \quad (4.11)$$

D'altra banda, les equacions del balanç de massa experimental i teòric segons el model de Freundlich es poden escriure com:

$$V_W \cdot C_0 = V_W \cdot C_{W,exp} + M_S \cdot C_{S,exp} = V_W \cdot C_{W,exp} + M_S \cdot K_F \cdot C_{W,exp}^N \quad (4.12)$$

$$V_W \cdot C_0 = V_W \cdot C_{W,calc} + M_S \cdot C_{S,calc} = V_W \cdot C_{W,calc} + M_S \cdot K_F \cdot C_{W,calc}^N \quad (4.13)$$

On  $V_W$ ,  $C_0$  i  $M_S$  són les variables independents, amb valors mesurats i coneguts;  $K_F$  i  $N$  són els valors estimats corresponents als paràmetres del model, i  $C_{W,calc}$  el valor a determinar. Aquest últim es pot calcular mitjançant el mètode iteratiu de Newton, definint una funció ( $F$ ) que és igual a zero quan el sistema està resolt. En aquest cas, aquesta funció  $F$  es basa en la diferència entre el balanç de massa experimental i calculat:

$$F = V_W \cdot C_0 - (V_W \cdot C_{W,calc} + M_S \cdot K_F \cdot C_{W,calc}^N) \quad (4.14)$$

Aquesta equació es resol mitjançant aproximacions successives de  $C_{W,calc}$ , de forma que el valor de la iteració  $n + 1$  es calcula a partir del valor anterior, dels valors que pren la funció  $F$  i la seva derivada respecte a  $C_{W,calc}$  ( $F'$ ):

$$C_{W,calc,n+1} = C_{W,calc,n} - \frac{F(n)}{F'(n)} \quad (4.15)$$

No obstant, i per tal d'evitar concentracions amb valors negatius durant el procés iteratiu, les derivades es prenen respecte del  $\ln(C_{W,calc}) - F'_{\ln}$  en comptes de  $C_{W,calc}$ ; així, l'equació anterior queda com:

$$\ln(C_{W,calc,n+1}) = \ln(C_{W,calc,n}) - \frac{F(n)}{F'_{\ln(n)}} \quad (4.16)$$

I fent l'antilogaritme d'aquesta equació s'obtenen els valors de concentració calculada:

$$C_{W,calc,n+1} = \exp\{\ln(C_{W,calc,n+1})\} = \frac{C_{W,calc,n}}{\exp\left\{\frac{F(n)}{F'_{\ln(n)}}\right\}} \quad (4.17)$$



Ja que la funció desenvolupada conté diferents tipus d'isotermes, durant el procés iteratiu s'utilitzen derivades numèriques per tal de mantenir un codi el més compacte possible. El procés iteratiu finalitza quan la diferència entre els balanços de massa experimental i calculat és menor que una tolerància determinada; establerta com una diferència relativa  $\leq 0.001$  %. Generalment, la solució s'assoleix després de realitzar entre 4 i 10 iteracions per a cada punt. D'altra banda, el valor inicial de  $C_{W,calc}$  (iteració "0") es pren com la concentració total de solut, així es poden simular isotermes teòriques sense el coneixement previ de les concentracions a l'equilibri.

La funció ISOT\_Calc inclou 13 models de sorció predefinits, sovint utilitzats en l'ajust de dades d'estudis de sorció [20, 91, 93]. Aquests models, juntament amb el nombre de paràmetres corresponents s'indiquen en la Taula 4.3. A més, en cas que els models predefinits no s'ajustin a les dades experimentals, s'ha previst la possibilitat d'emprar isotermes definides per l'usuari (tipus 0, *custom equations*); en aquest cas, es pot introduir el model desitjat dins d'una cel·la del full de càlcul. Aquesta possibilitat es duu a terme mitjançant la inclusió en el codi VBA d'una subrutina que substitueix el text de la cel·la en els valors numèrics corresponents [94]. Les condicions de l'equació literal són que els paràmetres de la isoterma s'han d'escriure com "P(1), P(2), ...", i la concentració de solut en fase líquida com "Ce". Per exemple, si introduïm una isoterma de Freundlich com un model definit per l'usuari, tindria la forma: "P(1)\*(Ce^P(2))" (sense cometes).

La funció ISOT\_Calc dóna com a resultat la concentració calculada en fase líquida  $C_{W,calc}$ , però la concentració en la fase sòlida  $C_{S,calc}$  és un valor calculat durant el procés (segons l'equació 2.3). En el full de càlcul de MS-Excel, ambdós valors es poden obtenir utilitzant la funció 'INDICE'. Per exemple, si s'utilitza la funció ISOT\_Calc a través de INDICE de la forma següent: "=INDICE(ISOT\_Calc(B18:D18;\$C\$12: \$C\$14;11;\$C\$10),1)", aquesta retorna el valor de  $C_{W,calc}$ , però si l'últim nombre (l'índex) es canvia d'1 a 2, el valor obtingut és el de  $C_{S,calc}$ . La resta de dades introduïdes en l'equació corresponen a:

- B18:D18: cel·les que contenen la concentració inicial de solut, el volum inicial i la massa de sòl, respectivament.
- \$C\$12:\$C\$14: cel·les que contenen el conjunt de paràmetres del model.
- 11: correspon al tipus d'isoterma que s'avalua. En aquest cas correspon al model "Simple Dual Mode", desenvolupat per Xia *et al.* [91].

- $C_{10}$ : indica la cel·la on s'introdueix la isoterma definida per l'usuari. Només té efecte quan el tipus és "0".

**Taula 4.3.** Isotermes predefinides en la funció ISOT\_Calc.

Index	Tipus isoterma	Equació ( $C_s = \dots$ )	Nombre de paràmetres
0	Definida per l'usuari	Definida per l'usuari	Definit per l'usuari
1	Langmuir	$b \cdot \frac{K_L \cdot C_W}{(1 + K_L \cdot C_W)}$	2
2	2-site Langmuir	$b \cdot \left( \frac{f_1 \cdot K_1 \cdot C_W}{1 + K_1 \cdot C_W} + \frac{f_2 \cdot K_2 \cdot C_W}{1 + K_2 \cdot C_W} \right)$	3
3	modified Langmuir	$b \cdot \left( \frac{f_1 \cdot K_1 \cdot C_W}{1 + K_1 \cdot C_W} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 + K_2 \cdot C_W} \right)$	3
4	B.E.T.	$\left( \frac{K_1 \cdot C_W}{1 + K_2 \cdot C_W} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 - K_3 \cdot C_W} \right)$	3
5	Freundlich	$K_F \cdot (C_W)^N$	2
6	general L-F	$b \cdot \frac{(K_{LF} \cdot C_W)^N}{1 + (K_{LF} \cdot C_W)^N}$	3
7	general Freundlich	$b \cdot \left( \frac{K \cdot C_W}{1 + K \cdot C_W} \right)^N$	3
8	Redlich-Peterson	$b \cdot \frac{K \cdot C_W}{\{1 + (K \cdot C_W)^N\}^{1/N}}$	3
9	Tóth	$b \cdot \frac{K \cdot C_W}{1 + (K \cdot C_W)^N}$	3
10	Aranovich-Donohue	$\left( \frac{K_1 \cdot C_W}{1 + K_2 \cdot C_W} \right) \cdot \left( \frac{1}{1 - K_3 \cdot C_W} \right)^N$	4
11	DMM <sup>a</sup>	$K_D \cdot C_W + \frac{S^0 \cdot b \cdot C_W}{1 + b \cdot C_W}$	3
12	Temkin	$K_1 \cdot \ln(C_W) + K_2$	2
13	2-step	$\sum_{i=1}^2 \frac{q_{T,i} \cdot K_i \cdot (C_W - b_i +  C_W - b_i )^{n,i}}{2^{n,i} + K_i \cdot (C_W - b_i +  C_W - b_i )^{n,i}}$	7 ( $b_1 = 0$ )

<sup>a</sup>Simple Dual-mode model.

### Optimització dels paràmetres del model

L'altra funció que s'ha desenvolupat en aquest treball consisteix en una rutina d'optimització, anomenada Ref\_GN\_LM, integrada dins una macro de VBA, i que es basa en la modificació Levenberg-Marquardt de l'algorisme iteratiu de Gauss-Newton [95]. En cada iteració, els paràmetres de la isoterma s'estimen de manera que es compleix:

$$\{J^T \cdot J + \lambda \text{diag}(J^T \cdot J)\} \Delta P = J^T \cdot Err \quad (4.18)$$

On  $J$  representa la matriu jacobiana, que conté les derivades parcials dels errors respecte dels paràmetres a optimitzar. D'altra banda,  $\Delta P$  és el vector que conté els increments dels paràmetres,  $\lambda$  és el paràmetre de Marquardt i  $Err$  és el vector dels errors residuals. Inicialment, es pren un valor de  $\lambda = 10$ , disminuint 10 cops per cada iteració amb èxit quan el procés convergeix. En cas contrari,  $\lambda$  adopta el valor del nombre d'iteracions no convergents consecutives. Finalment, aquest procediment d'iteració s'atura quan la diferència relativa en la  $U$  (p. ex. l'equació 4.9) entre dos iteracions consecutives és inferior al 0.1 % i  $\lambda$  és inferior a 0.01. En qualsevol cas, el nombre màxim d'interaccions està limitat a 20. Per tal de mantenir ordres de magnitud similars en els paràmetres durant el procediment de refinament, aquests són transformats internament als seus corresponents logaritmes naturals, la qual cosa també evita la possibilitat d'obtenir valors negatius. A més a més, la rutina permet l'estimació dels errors en els paràmetres a partir dels errors residuals i la matriu dels increments [96-97].

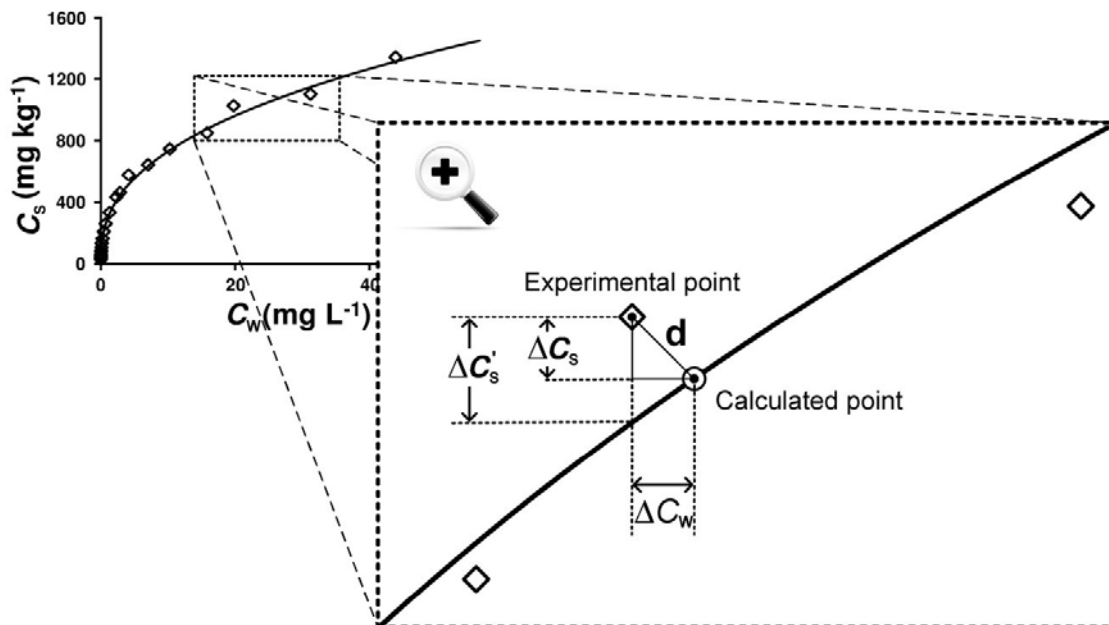
Si bé l'algorisme utilitzat correspon a un procediment estàndard d'optimització, la diferència d'aquest treball respecte d'altres que es troben en la bibliografia rau en la definició dels errors residuals: el balanç de massa (funció ISOT\_Calc) calcula els parells de concentracions teòriques en les fases sòlida i líquida ( $C_{W,calc}$ ,  $C_{S,calc}$ ) per a cada punt d'equilibri a partir de les condicions experimentals i dels paràmetres del model de sorció estimat. Per tant, es poden definir els errors residuals de diferents maneres: com errors en  $C_W$ , en  $C_S$ , o com la distància ( $d$ ) entre punts calculats i experimentals, que equival a la combinació d'ambdós:

$$\Delta C_{W,i} = C_{W,exp,i} - C_{W,calc,i} \quad (4.19)$$

$$\Delta C_{S,i} = C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i} \quad (4.20)$$

$$d_i = \sqrt{(C_{W,exp,i} - C_{W,calc,i})^2 + (C_{S,exp,i} - C_{S,calc,i})^2} = \sqrt{(\Delta C_{W,i})^2 + (\Delta C_{S,i})^2} \quad (4.21)$$

Les diferències en la definició dels errors es mostren en la Figura 4.11, en la que es representen els punts experimentals d'una isoterma hipotètica (rombes), juntament amb un model de sorció ajustat (línia sòlida) mitjançant la funció ISOT\_Calc. Aquesta figura mostra un punt detallat, on s'indiquen els errors en  $C_W$  i  $C_S$  (equacions 4.19 i 4.20, respectivament), així com la distància  $d$  entre un punt experimental en forma de rombe i un calculat en forma de cercle (equació 4.21). A efectes de comparació, la Figura 4.11 també mostra l'error ( $\Delta C_S'$ ) obtingut per un procediment convencional (utilitzant l'equació 4.9).



**Figura 4.11.** Definició dels errors en les dades experimentals.

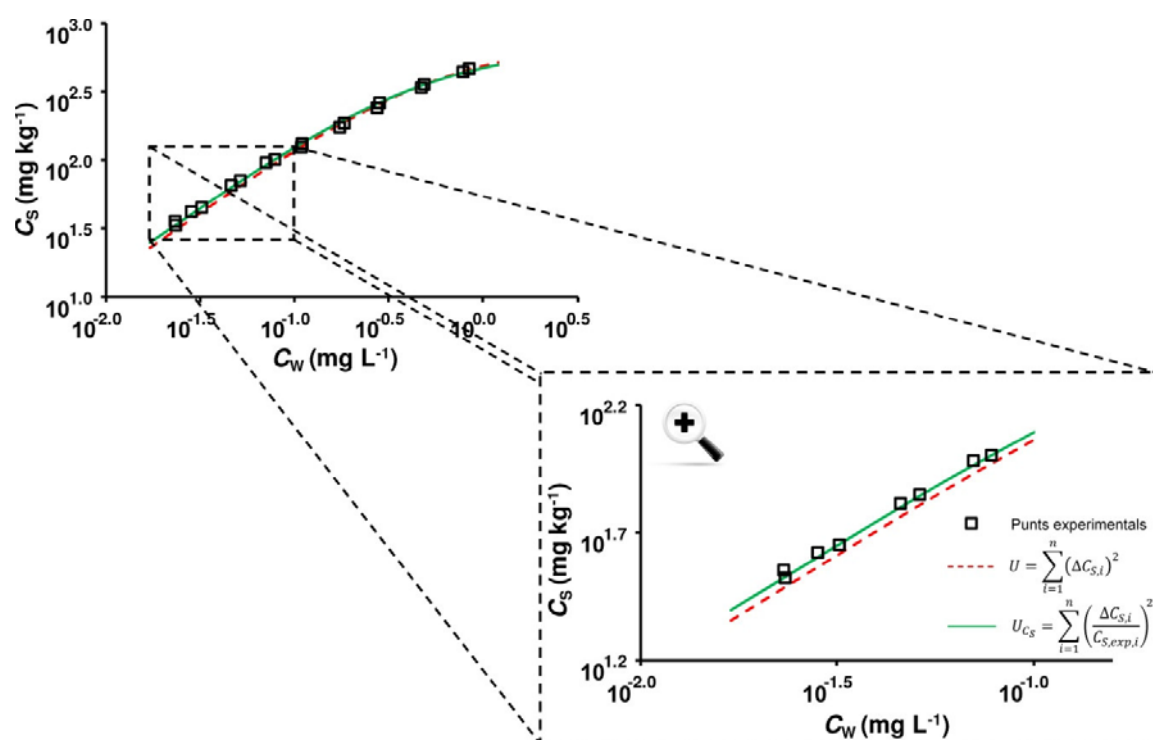
Tot i que els errors es calculen de la forma descrita, les funcions objectives a minimitzar en el procés d'optimització utilitzen factors de ponderació (pesos estadístics) per tal de que tots els punts experimentals siguin igual de significants; en cas contrari, els punts corresponents a concentracions més elevades tindrien més pes estadístic en el model que els punts experimentals obtinguts a baixes concentracions. En aquest treball, s'utilitzen factors de ponderació inversament proporcionals al quadrat de la magnitud experimental

corresponent (p. ex.,  $w_i = 1/(C_{W,exp,i})^2$  o  $w_i = 1/(C_{S,exp,i})^2$ ). Així, les funcions objectives per tal de minimitzar els errors en  $C_W$  i  $C_S$  es calculen a partir dels seus corresponents errors relatius:

$$U_{C_W} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{C_{W,exp,i}^2} \cdot \Delta C_{W,i}^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\Delta C_{W,i}}{C_{W,exp,i}} \right)^2 \quad (4.22)$$

$$U_{C_S} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{C_{S,exp,i}^2} \cdot \Delta C_{S,i}^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\Delta C_{S,i}}{C_{S,exp,i}} \right)^2 \quad (4.23)$$

Tal com es posa de manifest en la Figura 4.12, on es comparen les isoterms obtingudes per minimització ponderada (línia contínua) i sense ponderar (línia discontinua), l'ús de l'error relatiu durant la minimització de la funció objectiu és un procediment que millora l'ajust dels punts experimentals corresponents a baixes concentracions de solut. Així doncs, aquest procediment és particularment interessant en la modelització de la sorció de contaminants en sòls, on els contaminants es troben generalment en concentracions de traces.



**Figura 4.12.** Millora en l'ajust de la part inferior de la isoterma a l'emprar error relatiu en la minimització de la funció objectiu ( $U_{C_S}$ ).

D'altra banda, la definició dels errors residuals com la distància entre punts experimentals i calculats, és equivalent a la regressió per distància ortogonal o ODR (*orthogonal distance regression*). Aquesta mètode, estudiat recentment per Poch i Villaescusa [98], ha estat aplicat a isoterms de Langmuir teòriques per a la determinació dels paràmetres de la isoterma. Cal esmentar que en un procediment "clàssic" de modelització de dades de sorció, se sol suposar que  $C_W$  és la variable independent (sense errors) i els paràmetres de les isoterms són calculats per tal de minimitzar els errors en la variable dependent ( $C_S$ ). En canvi, la ODR té en compte els errors en ambdues variables ( $C_W$  i  $C_S$ ), i la funció objectiu ponderada ( $U_d$ ) a minimitzar es calcula com a combinació de les equacions 4.22 i 4.23:

$$U_d = \sum_{i=1}^n \left\{ \left( \frac{\Delta C_{W,i}}{C_{W,exp,i}} \right)^2 + \left( \frac{\Delta C_{S,i}}{C_{S,exp,i}} \right)^2 \right\} \quad (4.24)$$

Com que els valors de  $C_{W,calc,i}$  i  $C_{S,calc,i}$  s'obtenen directament emprant la funció ISOT\_Calc, el càlcul de les funcions objectives (equacions 4.22 a 4.24) és una tasca trivial. En la Taula 4.4 es mostra l'aspecte típic d'un full de càlcul que utilitza la funció ISOT\_Calc, indicant les dades experimentals, els valors calculats de  $C_{W,calc,i}$  i  $C_{S,calc,i}$  i els errors relatius individuals ( $\Delta C_W/C_W$  i  $\Delta C_S/C_S$ )

**Taula 4.4.** Exemple de dades d'una isoterma i càlculs.

$C_0$ ( $mg L^{-1}$ )	$V_W$ ( $mL$ )	$M_S$ ( $g$ )	$C_{W,exp}$ ( $mg L^{-1}$ )	$C_{S,exp}$ ( $mg kg^{-1}$ )	$C_{W,calc}$ ( $mg L^{-1}$ )	$C_{S,calc}$ ( $mg kg^{-1}$ )	$\Delta C_W/C_W$	$\Delta C_S/C_S$
0.490	50.0	1.005	0.0096	23.89	0.0101	23.87	-0.05	0.0010
0.531	50.0	1.001	0.0125	25.89	0.0110	25.96	0.12	-0.0029
0.687	50.0	1.003	0.0121	33.65	0.0143	33.54	-0.18	0.0033
0.730	50.0	1.002	0.0139	35.74	0.0153	35.67	-0.10	0.0020
0.917	50.0	1.001	0.0190	44.85	0.0195	44.82	-0.03	0.0006
0.981	50.0	1.004	0.0217	47.79	0.0209	47.83	0.04	-0.0009
1.360	50.0	1.003	0.0277	66.43	0.0298	66.32	-0.08	0.0016

En aquest punt, per tal d'optimitzar els paràmetres de la isoterma, es pot utilitzar la macro Ref\_GN\_LM. Una vegada s'inicia, aquesta macro demana la columna que conté els errors residuals ( $\Delta C_w / C_w$ , per exemple), la columna amb els paràmetres a optimitzar, i finalment, una cel·la d'inici on es mostraran els resultats. Aquests últims contindran els valors optimitzats dels paràmetres juntament amb les seves desviacions estàndard estimades, i d'altres paràmetres estadístics, com la suma de quadrats de residuals (equacions 4.22 a 4.24), l'error quadràtic mitjà (RMSE) i l'error quadràtic mitjà ponderat o MWSE (*mean weighted square error*). Tal com ja s'ha comentat anteriorment, aquests paràmetres són de gran utilitat per tal de decidir quin tipus d'isoterma s'ajusta millor a un conjunt de dades experimentals.

$$MWSE = \frac{U}{(m - p)} \quad (4.25)$$

$$RMSE = \sqrt{MWSE} \quad (4.26)$$

On  $m$  i  $p$  corresponen al nombre de punts experimentals i de paràmetres ajustables de l'equació avaluada, respectivament.

D'altra banda, la funció Solver incorporada al MS-Excel també permet optimitzar els paràmetres. En aquest cas, l'usuari pot definir una cel·la que conté la funció objectiu (valor a minimitzar) i l'interval corresponent dels paràmetres a optimitzar. Els resultats obtinguts són totalment semblants als obtinguts emprant el macro Ref\_GN\_LM, però en aquest últim cas la resolució és, generalment, més ràpida. D'altra banda, Solver no dóna els errors estimats dels paràmetres, i s'han de determinar emprant una altra rutina, com per exemple la Solvstat per Excel [99].

### 4.3.2. Exemples d'aplicació

Per tal de provar els procediments de càlcul proposats en aquest treball, s'han aplicat les rutines descrites (combinació ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM) a dades experimentals descrites en la bibliografia i s'han contrastat els paràmetres de l'equació obtinguts amb els publicats. El procediment ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM s'ha utilitzat minimitzant les funcions objectiu  $U_{cw}$ ,  $U_{cs}$ ,  $U_d$  (equacions 4.22-4.24). D'altra banda, per tal d'incloure més elements de comparació, també s'han calculat els paràmetres de les dades bibliogràfiques mitjançant el programa ISOFIT. Aquest últim programa minimitza les diferències

quadràtiques entre  $C_{S,exp}$  i  $C_{S,calc}$ , on aquesta última es calcula a partir del model d'isoterma i els valors experimentals de  $C_w$ . A més, per tal d'obtenir resultats comparables entre els càlculs, s'han utilitzat factors de ponderació similars tant en l'ISOFIT com en el procediment desenvolupat en aquest treball.

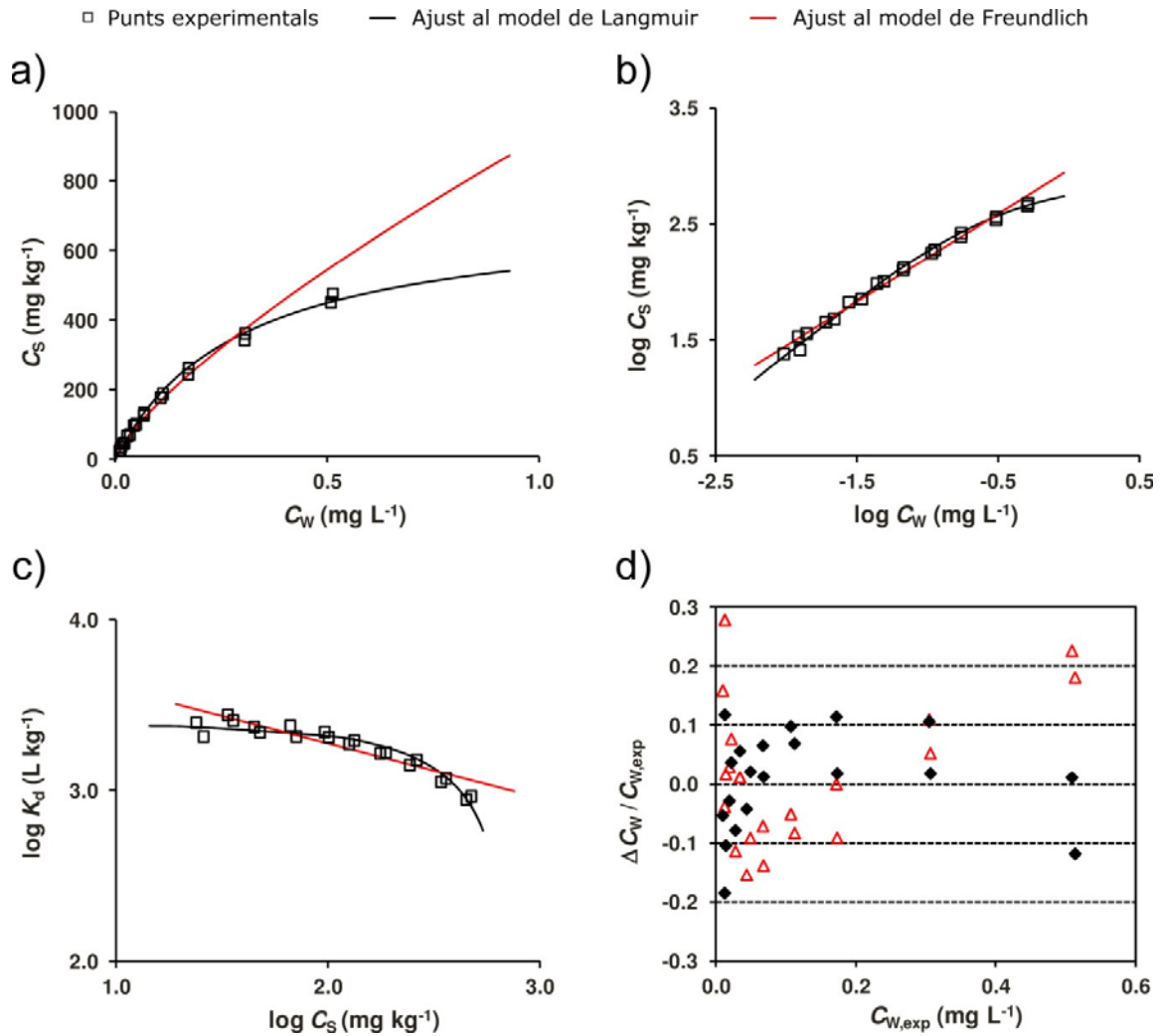
Els sistemes on s'ha provat l'ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM han estat:

- *Sistema I*: correspon a la sorció de TC en un sòl franc estudiat en el segon capítol d'aquesta tesi ( propietats fisicoquímiques en la Taula 3.1, sòl S8, pàgina 92). Es tracta d'una isoterma formada per 20 punts experimentals que presenta un bon ajust a una isoterma de tipus Langmuir, tal com s'indica en la referència [100]. Per tal de comparar entre models es va realitzar l'ajust a les equacions de Langmuir i Freundlich. L'optimització s'ha dut a terme minimitzant per  $C_w$ ,  $C_s$  i distàncies (ODR), entre els punts experimentals i calculats. Els resultats (Taula 4.5, *Sistema I*) inclouen els paràmetres d'ambdues equacions, juntament amb desviacions estàndard dels paràmetres i errors residuals com el MWSE. En tots els casos, els errors del model de Freundlich són entre 2 i 3 vegades superiors que els corresponents al model de Langmuir, per tant, es confirma que el model que millor s'ajusta a les dades experimentals és una isoterma de Langmuir, tal com també indiquen els resultats obtinguts amb el programa ISOFIT. D'altra banda, el bon ajust del model de Langmuir a les dades experimentals també es pot observar gràficament en la Figura 4.13, que mostra diferents representacions de la isoterma experimental i la calculada (Figura 4.13 a, b i c), així com la distribució dels errors residuals en  $C_w$  (Figura 4.13 d). Aquesta última permet veure com els punts amb pitjor ajust al model de Freundlich corresponen sobretot als extrems superior i inferior de la isoterma.
- *Sistema II*: consisteix en la sorció d'ions de Zn(II) en ferrihidrita (gel d'òxid de Fe hidratat) a pH 5.5. Encara que les dades originals presentades per Kinniburgh *et al.* [19] van ser ajustades inicialment a un model de tipus Langmuir, els posteriors ajustos realitzats per Matott i Rabideau [88] van demostrar que l'equació de Freundlich pot donar millors resultats, amb una suma dels residuals quadràtics fins a 9 vegades inferior. Aquest últim treball també mostra que els models amb 3 paràmetres (Toth, Polanyi-Manes, etc.) poden reduir la funció objectiu, però aquests incorporen més paràmetres al model. Per tant, només s'ha considerat



oportú comparar els models de Langmuir i Freundlich en aquest conjunt de dades. En tots els càlculs (utilitzant l'ISOFIT i les diferents modalitats d'ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM), els valors obtinguts de MWSE pel model de Freundlich han estat unes 7-9 vegades inferiors que els corresponents al model de Langmuir (vegeu Sistema II, Taula 4.5), confirmant així que el model de Freundlich proporciona el millor ajust al conjunt de dades experimentals.

- *Sistema III*: aquest sistema descriu la sorció de triclorometà en un sòl amb un alt contingut de matèria orgànica natural (93 %). Xia *et al.* [91] van provar diversos models de sorció (Freundlich, DMM i Polanyi-Manes) per tal d'ajustar els 108 punts experimentals. Tot i que el model Polanyi-Manes va donar un valor MWSE lleugerament inferior que el DMM (0,0051 i 0,0070, respectivament), els autors no el van considerar apropiat per a explicar les dades experimentals donades les característiques del sistema. D'altra banda, aquesta petita diferència en MWSE es pot atribuir a un major nombre de paràmetres ajustables (4 i 3 en el model de Polanyi-Manes i DMM, respectivament). Així doncs, en el present estudi s'han comparat els resultats obtinguts utilitzant els models de Freundlich i DMM. En l'article original, els paràmetres de les isoterms es van determinar mitjançant la forma linealitzada del model de Freundlich i per regressió NLLS del DMM; en aquest últim cas, els autors van utilitzar uns pesos estadístics iguals a  $w_i = 1/(C_{S,exp,i})^2$ . Tal com es mostra en la Taula 4.5, els paràmetres de l'equació de Freundlich calculats mitjançant l'ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM, ISOFIT o les dades originals són equivalents. D'altra banda, si les dades són ajustades al model DMM, en la major part dels casos, els resultats són equivalents amb l'excepció de la minimització per  $\Delta C_w / C_w$  (equació 4.22) amb l'ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM. No obstant, les diferències obtingudes es troben dins de l'ordre de l'error estimat pels paràmetres d'aquest model. En darrer terme, es pot observar que en tots els casos, l'error obtingut en l'aplicació del model DMM es de l'ordre de la meitat que l'obtingut pel model de Freundlich, corroborant així els resultats presentats per Xia i Pignatello [91].



**Figura 4.13.** (a) Isotherma de sorció de TC en un sòl de textura franca (S8, Taula 3.1). (b) representació logarítmica de la isoterma. (c) Representació de  $K_d$  en funció de la concentració en el sòl ( $C_S$ ). (d) Distribució dels residuals dels errors relatius en  $C_W$  per l'ajust a Langmuir (rombes negres) i Freundlich (triangles vermells). Dades experimentals procedents de Teixidó *et al.* [100].

**Taula 4.5.** Paràmetres del model de la isoterma corresponents al sistema I, II i III. Les desviacions estàndard estimades apareixen entre parèntesis.

Paràmetre Unitats	Model de Langmuir			Model de Freundlich			Model de Simple Dual Mode			
	$b$ mg kg <sup>-1</sup>	$K_L$ L mg <sup>-1</sup>	MWSE	$K_F$ mg <sup>1-N</sup> L <sup>N</sup> kg <sup>-1</sup>	$N$ adimensional	MWSE	$K_D$ L kg <sup>-1</sup>	$S^0$ mg kg <sup>-1</sup>	$b$ L mg <sup>-1</sup>	MWSE
<b>Sistema I</b>										
Valors bibliogràfics <sup>a</sup>										
ISOFIT	693(27)	3.5(0.3)	0.0023	828(36)	0.71(0.03)	0.0061				
ISOT_Calc (eq. 4.22)	670(40)	3.7(0.3)	0.0049	877(50)	0.75(0.02)	0.0131				
ISOT_Calc (eq. 4.23)	711(28)	3.4(0.2)	0.0067	929(59)	0.76(0.02)	0.0148				
ISOT_Calc (eq. 4.24)	743(23)	3.2(0.2)	0.0001	819(37)	0.72(0.02)	0.0002				
ISOT_Calc (eq. 4.24)	711(28)	3.4(0.2)	0.0067	926(46)	0.76(0.02)	0.0149				
<b>Sistema II<sup>b</sup></b>										
Valors bibliogràfics <sup>c</sup>										
ISOFIT	7.98	3.10								
ISOT_Calc (eq. 4.22)	8.1(0.7)	3.0(0.4)	0.0040	8.5(0.1)	0.682(0.009)	0.0006				
ISOT_Calc (eq. 4.23)	8.0(0.7)	3.1(0.4)	0.0018	8.5(0.2)	0.687(0.009)	0.0002				
ISOT_Calc (eq. 4.24)	8.8(0.6)	2.6(0.3)	0.0006	8.4(0.1)	0.677(0.010)	0.0001				
ISOT_Calc (eq. 4.24)	8.2(0.6)	2.9(0.3)	0.0025	8.5(0.2)	0.684(0.009)	0.0004				
<b>Sistema III</b>										
Valors bibliogràfics <sup>d</sup>										
ISOFIT				18.6(0.2)	0.921(0.002)	0.0134	10.6(0.2)	13.3(1.4)	1.3(0.2)	0.0070
ISOT_Calc (eq. 4.22)				18.3(0.2)	0.920(0.002)	0.0129	10.6(0.1)	13.3(1.4)	1.3(0.2)	0.0069
ISOT_Calc (eq. 4.23)				18.9(0.2)	0.916(0.002)	0.0014	10.9(0.2)	10.2(1.0)	1.8(0.2)	0.0009
ISOT_Calc (eq. 4.24)				18.1(0.3)	0.924(0.003)	0.0064	10.6(0.1)	15.0(1.6)	1.1(0.1)	0.0031
ISOT_Calc (eq. 4.24)				18.5(0.2)	0.921(0.002)	0.0081	10.6(0.1)	13.5(1.4)	1.3(0.2)	0.0041

<sup>a</sup>: Aquesta tesi (Teixidó *et al.* [100]).

<sup>b</sup>: Les unitats dels paràmetres són  $S^0$ : mmol Zn/mol Fe;  $K_L$ : L/mmol Zn i  $K_F$ : (mmol Zn/mol Fe)/(mmol Zn/L)<sup>N</sup>.

<sup>c</sup>: Kinniburgh *et al.* [19].

<sup>d</sup>: Xia i Pignatello [91].

A partir dels resultat obtinguts estudiant aquests 3 sistemes, podem concloure que la combinació ISOT\_Calc / Ref\_GN\_LM presenta una sèrie d'avantatges en comparació amb altres mètodes d'ajust d'isotermes:

- En primer lloc, la seva integració dins de l'entorn de MS-Excel fa que sigui de fàcil utilització, a l'abast de qualsevol usuari mitjà d'aquest full de càlcul.
- Presenta una gran versatilitat a l'hora d'optimitzar els paràmetres de la isoterma, ja que la funció a minimitzar pot ser de diferents tipus ( $C_S$ ,  $C_W$ ,  $d$ ,  $K_d$ ).
- Els resultats són equivalents als obtinguts mitjançant altres procediments.

Tot plegat fa que la combinació es pugui considerar una eina de gran utilitat en l'estudi d'equilibris de sorció.

## Referències

1. Knapp CW, Engemann CA, Hanson ML, Keen PL, Hall KJ, Graham DW. Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. *Environ Sci Technol* **2008**, 42(14), 5348-53.
2. Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, Smith P, et al. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66(9), 3883-90.
3. Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A* **2000**, 882(1-2), 109-33.
4. Figueroa RA, Leonard A, MacKay AA. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(2), 476-83.
5. Kulshrestha P, Giese RF, Jr., Aga DS. Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: insights on factors affecting its mobility in soil. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(15), 4097-105.
6. Gu C, Karthikeyan KG. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(8), 2660-7.
7. MacKay AA, Canterbury B. Oxytetracycline sorption to organic matter by metal-bridging. *J Environ Qual* **2005**, 34(6), 1964-71.
8. Li Z, Chang PH, Jean JS, Jiang WT, Wang CJ. Interaction between tetracycline and smectite in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* **2010**, 341(2), 311-9.
9. Zhao Y, Geng J, Wang X, Gu X, Gao S. Tetracycline adsorption on kaolinite: pH, metal cations and humic acid effects. *Ecotoxicology* **2011**, 20(5), 1141-7.
10. Parolo ME, Savini MC, Valles JM, Baschini MT, Avena MJ. Tetracycline adsorption on montmorillonite: pH and ionic strength effects. *Applied Clay Science* **2008**, 40(1-4), 179-86.
11. Avisar D, Primor O, Gozlan I, Mamane H. Sorption of Sulfonamides and Tetracyclines to Montmorillonite Clay. *Water Air and Soil Pollution* **2010**, 209(1-4), 439-50.

12. Pils JR, Laird DA. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. *Environ Sci Technol* **2007**, 41(6), 1928-33.
13. Rabolle M, Spliid NH. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* **2000**, 40(7), 715-22.
14. Sassman SA, Lee LS. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(19), 7452-9.
15. Jones AD, Bruland GL, Agrawal SG, Vasudevan D. Factors influencing the sorption of oxytetracycline to soils. *Environ Toxicol Chem* **2005**, 24(4), 761-70.
16. ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J. Estimation of soil sorption coefficients of veterinary pharmaceuticals from soil properties. *Environ Toxicol Chem* **2006**, 25(4), 933-41.
17. ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J. The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil. *Environ Toxicol Chem* **2006**, 25(4), 904-11.
18. Hinz C, Gaston LA, Selim HM. Effect of sorption isotherm type on predictions of solute mobility in soil. *Water Resour Res* **1994**, 30(11), 3013-21.
19. Kinniburgh DG. General purpose adsorption isotherms. *Environ Sci Technol* **1986**, 20(9), 895-904.
20. Hinz C. Description of sorption data with isotherm equations *Geoderma* **2001**, 102(3-4), 405-6.
21. Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **2003**, 166(2), 145-67.
22. Esbensen K. *Multivariate Analysis in Practice*. Trondheim, Norway: CAMO AS; **1994**.
23. Martens H, Naes T. *Multivariate Calibration*. Chichester, UK: John Wiley & Sons; **1989**.
24. Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics Intellig Lab Syst* **2001**, 58(2), 109-30.
25. Gong W, Liu X, He H, Wang L, Dai G. Quantitatively modeling soil-water distribution coefficients of three antibiotics using soil physicochemical properties. *Chemosphere* **2012**, 89(7), 825-31.

26. Carrasquillo AJ, Bruland GL, MacKay AA, Vasudevan D. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil minerals: influence of compound structure. *Environ Sci Technol* **2008**, 42(20), 7634-42.
27. European Medicines Agency (EMA). "Trends in the sales of veterinary antimicrobial agents in nine European countries (2005-2009)". <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2011/09/WC500112309.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2011/09/WC500112309.pdf)> (accessed Feb 2013)> (consulta: 1 febrer 2013); **2011**.
28. Food and Drug Administration (FDA). Department of Health and Human Services Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. <http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM277657.pdf> > (consulta: 1 febrer 2013); **2010**.
29. Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ Sci Technol* **2001**, 35(17), 3397-406.
30. Boxall ABA, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, Tolls J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicol Lett* **2002**, 131(1-2), 19-28.
31. Thiele-Bruhn S, Aust MO. Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil. *Arch Environ Contam Toxicol* **2004**, 47(1), 31-9.
32. Wang Y, Wang L, Fang G, Herath HMSK, Cang L, Xie Z, et al. Enhanced PCBs sorption on biochars as affected by environmental factors: Humic acid and metal cations. *Environ Pollut* **2013**, 172, 86-93.
33. Beesley L, Moreno-Jimenez E, Gomez-Eyles JL. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ Pollut* **2010**, 158(6), 2282-7.
34. Zhang H, Lin K, Wang H, Gan J. Effect of *Pinus radiata* derived biochars on soil sorption and desorption of phenanthrene. *Environ Pollut* **2010**, 158(9), 2821-5.
35. Yang Y, Sheng G. Enhanced pesticide sorption by soils containing particulate matter from crop residue burns. *Environ Sci Technol* **2003**, 37(16), 3635-9.
36. Yu X, Pan L, Ying G, Kookana RS. Enhanced and irreversible sorption of pesticide pyrimethanil by soil amended with biochars. *Journal of Environmental Sciences-China* **2010**, 22(4), 615-20.

37. Uchimiya M, Lima IM, Thomas Klasson K, Chang S, Wartelle LH, Rodgers JE. Immobilization of heavy metal ions (CuII, CdII, NiII, and PbII) by broiler litter-derived biochars in water and soil. *J Agric Food Chem* **2010**, 58(9), 5538-44.
38. Fellet G, Marchiol L, Delle Vedove G, Peressotti A. Application of biochar on mine tailings: effects and perspectives for land reclamation. *Chemosphere* **2011**, 83(9), 1262-7.
39. Cao X, Ma L, Gao B, Harris W. Dairy-manure derived biochar effectively sorbs lead and atrazine. *Environ Sci Technol* **2009**, 43(9), 3285-91.
40. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* **2006**, 65(5), 725-59.
41. Lin CE, Chang CC, Lin WC. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. 3. Citrate buffer as a background electrolyte. *J Chromatogr A* **1997**, 768(1), 105-12.
42. Sakurai H, Ishimitsu T. Microionization constants of sulphonamides. *Talanta* **1980**, 27(3), 293-8.
43. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* **1999**, 225(1-2), 109-18.
44. Batt AL, Snow DD, Aga DS. Occurrence of sulfonamide antimicrobials in private water wells in Washington County, Idaho, USA. *Chemosphere* **2006**, 64(11), 1963-71.
45. Alder AC, McArdell CS, Golet EM, Ibric S, Molnar E, Nipales NS, et al. Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. In: Daughton C.G., Jones-Lepp T.L. (eds) *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues*. Washington, DC: American Chemical Society; **2001**.
46. Lertpaitoonpan W, Ong SK, Moorman TB. Effect of organic carbon and pH on soil sorption of sulfamethazine. *Chemosphere* **2009**, 76(4), 558-64.
47. Kurwadkar ST, Adams CD, Meyer MT, Kolpin DW. Effects of sorbate speciation on sorption of selected sulfonamides in three loamy soils. *J Agric Food Chem* **2007**, 55(4), 1370-6.



48. Langhammer JP. Untersuchungen zum Verbleib antimikrobiell wirksamer Arzneistoffe als Rückstände in Gülle und im landwirtschaftlichen Umfeld. Bonn: University of Bonn; 1989.
49. Chiou CT, Kile DE. Deviations from sorption linearity on soils of polar and nonpolar organic compounds at low relative concentrations. *Environ Sci Technol* **1998**, 32(3), 338-43.
50. Chen BL, Zhou DD, Zhu LZ. Transitional adsorption and partition of nonpolar and polar aromatic contaminants by biochars of pine needles with different pyrolytic temperatures. *Environ Sci Technol* **2008**, 42(14), 5137-43.
51. Xing BS, Pignatello JJ, Gigliotti B. Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environ Sci Technol* **1996**, 30(8), 2432-40.
52. Cornelissen G, Gustafsson O, Bucheli TD, Jonker MT, Koelmans AA, van Noort PC. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(18), 6881-95.
53. Chun Y, Sheng GY, Chiou CT, Xing BS. Compositions and sorptive properties of crop residue-derived chars. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(17), 4649-55.
54. Fernandes MB, Skjemstad JO, Johnson BB, Wells JD, Brooks P. Characterization of carbonaceous combustion residues. I. Morphological, elemental and spectroscopic features. *Chemosphere* **2003**, 51(8), 785-95.
55. Nishimiya K, Hata T, Imamura Y, Ishihara S. Analysis of chemical structure of wood charcoal by X-ray photoelectron spectroscopy. *J Wood Sci* **1998**, 44(1), 56-61.
56. Cornelissen G, Breedveld GD, Kalaitzidis S, Christanis K, Kibsgaard A, Oen AM. Strong sorption of native PAHs to pyrogenic and unburned carbonaceous geosorbents in sediments. *Environ Sci Technol* **2006**, 40(4), 1197-203.
57. Cornelissen G, Gustafsson O. Sorption of phenanthrene to environmental black carbon in sediment with and without organic matter and native sorbates. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(1), 148-55.
58. Cornelissen G, Rigterink H, van Noort PCM, Govers HAJ. Slowly and very slowly desorbing organic compounds in sediments exhibit Langmuir-type sorption. *Environ Toxicol Chem* **2000**, 19(6), 1532-9.

59. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. Environmental organic chemistry. New York: J. Wiley; **1993**.
60. Carda-Broch S, Berthod A. Countercurrent chromatography for the measurement of the hydrophobicity of sulfonamide amphoteric compounds. *Chromatographia* **2004**, 59(1-2), 79-87.
61. Gao JA, Pedersen JA. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(24), 9509-16.
62. Richter MK, Sander M, Krauss M, Christl I, Dahinden MG, Schneider MK, et al. Cation binding of antimicrobial sulfathiazole to leonardite humic acid. *Environ Sci Technol* **2009**, 43(17), 6632-8.
63. Kahle M, Stamm C. Sorption of the veterinary antimicrobial sulfathiazole to organic materials of different origin. *Environ Sci Technol* **2007**, 41(1), 132-8.
64. Zhang D, Pan B, Zhang H, Ning P, Xing B. Contribution of different sulfamethoxazole species to their overall adsorption on functionalized carbon nanotubes. *Environ Sci Technol* **2010**, 44(10), 3806-11.
65. Ji L, Chen W, Zheng S, Xu Z, Zhu D. Adsorption of sulfonamide antibiotics to multiwalled carbon nanotubes. *Langmuir* **2009**, 25(19), 11608-13.
66. Çalışkan E, Göktürk S. Adsorption Characteristics of Sulfamethoxazole and Metronidazole on Activated Carbon. *Sep Sci Technol* **2010**, 45(2), 244-55.
67. Singh NJ, Min SK, Kim DY, Kim KS. Comprehensive Energy Analysis for Various Types of  $\pi$ -Interaction. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2009**, 5(3), 515-29.
68. Thiele-Bruhn S, Seibicke T, Schulten HR, Leinweber P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. *J Environ Qual* **2004**, 33(4), 1331-42.
69. Zhu DQ, Hyun SH, Pignatello JJ, Lee LS. Evidence for pi-pi electron donor-acceptor interactions between pi-donor aromatic compounds and pi-acceptor sites in soil organic matter through pH effects on sorption. *Environ Sci Technol* **2004**, 38(16), 4361-8.
70. Zhu D, Kwon S, Pignatello JJ. Adsorption of single-ring organic compounds to wood charcoals prepared under different thermochemical conditions. *Environ Sci Technol* **2005**, 39(11), 3990-8.

71. Chen W, Duan L, Wang L, Zhu D. Adsorption of Hydroxyl- and Amino-Substituted Aromatics to Carbon Nanotubes. *Environ Sci Technol* **2008**, 42(18), 6862-8.
72. Ji L, Wan Y, Zheng S, Zhu D. Adsorption of Tetracycline and Sulfamethoxazole on Crop Residue-Derived Ashes: Implication for the Relative Importance of Black Carbon to Soil Sorption. *Environ Sci Technol* **2011**, 45(13), 5580-6.
73. Cheng C-H, Lehmann J, Thies JE, Burton SD, Engelhard MH. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Org Geochem* **2006**, 37(11), 1477-88.
74. Cheng C-H, Lehmann J, Engelhard MH. Natural oxidation of black carbon in soils: Changes in molecular form and surface charge along a climosequence. *Geochim Cosmochim Acta* **2008**, 72(6), 1598-610.
75. Nguyen BT, Lehmann J, Kinyangi J, Smernik R, Riha SJ, Engelhard MH. Long-term black carbon dynamics in cultivated soil. *Biogeochemistry* **2009**, 92(1), 163-76.
76. Cheng CH, Lehmann J. Ageing of black carbon along a temperature gradient. *Chemosphere* **2009**, 75(8), 1021-7.
77. Kookana RS, Sarmah AK, Van Zwieten L, Krull E, Singh B. Biochar Application to Soil: Agronomic and Environmental Benefits and Unintended Consequences. In: Donald LS, editor. *Advances in Agronomy*: Academic Press; 2011. p. 103-43.
78. Martin SM, Kookana RS, Van Zwieten L, Krull E. Marked changes in herbicide sorption-desorption upon ageing of biochars in soil. *J Hazard Mater* **2012**, 231-232, 70-8.
79. Pignatello JJ, Kwon S, Lu Y. Effect of natural organic substances on the surface and adsorptive properties of environmental black carbon (char): attenuation of surface activity by humic and fulvic acids. *Environ Sci Technol* **2006**, 40(24), 7757-63.
80. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks*. 2nd ed ed. New York: Springer-Verlag; **2004**.
81. Sposito G. *The Surface Chemistry of Soils*. Oxford Univ Press, New York **1984**.
82. Essington ME. *Soil and Water chemistry. An integrative Approach*. CRC Press, New York **2004**.
83. Ho YS, Porter JF, McKay G. Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: Copper, nickel and lead single component systems. *Water Air and Soil Pollution* **2002**, 141(1-4), 1-33.
84. Ho YS. Selection of optimum sorption isotherm. *Carbon* **2004**, 42(10), 2115-6.

85. Motulsky H, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. Oxford; New York: Oxford University Press; **2004**.
86. Ho YS, Chiu WT, Wang CC. Regression analysis for the sorption isotherms of basic dyes on sugarcane dust. *Bioresour Technol* **2005**, 96(11), 1285-91.
87. Bolster CH, Hornberger GM. On the use of linearized Langmuir equations. *Soil Sci Soc Am J* **2007**, 71(6), 1796-806.
88. Matott LS, Rabideau AJ. ISOFIT - A program for fitting sorption isotherms to experimental data. *Environ Model Software* **2008**, 23(5), 670-6.
89. Li R, Wen B, Zhang S, Pei Z, Shan X. Influence of organic amendments on the sorption of pentachlorophenol on soils. *J Environ Sci (China)* **2009**, 21(4), 474-80.
90. Sathishkumar M, Binupriya AR, Vijayaraghavan K, Yun S-I. Two and three-parameter isothermal modeling for liquid-phase sorption of Procion Blue H-B by inactive mycelial biomass of *Panus fulvus*. *J Chem Technol Biotechnol* **2007**, 82(4), 389-98.
91. Xia G, Pignatello JJ. Detailed sorption isotherms of polar and apolar compounds in a high-organic soil. *Environ Sci Technol* **2001**, 35(1), 84-94.
92. Demidovich BP, Maron IA. Computational mathematics. 3rd print ed. Moscow: Mir; **1981**.
93. Czinkota I, Foldenyi R, Lengyel Z, Marton A. Adsorption of propisochlor on soils and soil components equation for multi-step isotherms. *Chemosphere* **2002**, 48(7), 725-31.
94. Volpi L. Runtime Math Formulas Evaluation in Excel. <[http://digilander.libero.it/foxes/mathparser/Run\\_Time\\_%20Math\\_Formula\\_%20Excel.htm](http://digilander.libero.it/foxes/mathparser/Run_Time_%20Math_Formula_%20Excel.htm)> (consulta: 1 febrer 2013); **2003**.
95. Johnson ML, Faunt LM. Parameter estimation by least-squares methods. *Methods Enzymol* **1992**, 210, 1-37.
96. Durand E. Solutions numériques des équations algébriques. Vol. 2, Systèmes de plusieurs équations: valeurs propres des matrices. Paris: Masson et Cie; **1972**.
97. Johnson ML. Parameter correlations while curve fitting. *Methods Enzymol* **2000**, 321, 424-46.

98. Poch J, Villaescusa I. Orthogonal Distance Regression: A Good Alternative to Least Squares for Modeling Sorption Data. *J Chem Eng Data* **2012**, 57(2), 490-9.
99. Billo EJ. *Excel for chemists: a comprehensive guide*. 2nd ed. New York: Wiley-VCH; **2001**.
100. Teixidó M, Granados M, Prat MD, Beltran JL. Sorption of tetracyclines onto natural soils: data analysis and prediction. *Environ Sci Pollut Res Int* **2012**, 19(8), 3087-95.

## **CONCLUSIONS**

---

*Capítol 5*



Del treball realitzat en aquesta tesi se'n poden extreure les següents conclusions:

- La tetraciclina queden fortament retingudes en tots els sòls estudiats, amb valors de  $K_d$  superiors a  $10^2 \text{ L kg}^{-1}$ . En general, la sorció de CTC i DC és més elevada que la d'OTC i TC.
- Les isoterms de sorció de les 4 tetraciclina presenten un comportament de tipus Langmuir en sòls àcids. En canvi, segueixen un comportament de tipus Freundlich en sòls alcalins. En sòls amb valors de pH intermedis (5.3 – 7.0), les isoterms de CTC i DC s'ajusten al model de Langmuir, mentre que OTC i TC s'ajusten millor al model de Freundlich. En sòls àcids, el principal mecanisme de sorció és el bescanvi iònic. En canvi, en sòls neutres i alcalins comencen a ser importants altres tipus d'interaccions (bescanvi catiònic, complexació en superfície, interaccions polars, etc.).
- Del tractament conjunt de les dades de sorció de tetraciclina mitjançant procediments d'anàlisi multivariant (PCA i PLS) se n'extreu que els descriptors del sòl que tenen més influència són  $\text{pH} > \text{CEC} > \text{contingut de } \text{K}_2\text{O} > \text{contingut de } \text{Al}_2\text{O}_3 > \text{contingut d'argila}$ .
- S'ha establert un model de sorció que prediu satisfactòriament els  $\log K_d$  de les quatre tetraciclina en estudi en funció dels 5 descriptors del sòl més rellevants. Els errors relatius en la predicció són inferiors al 5 %.
- S'ha establert un model que prediu satisfactòriament els  $\log K_d$  de TC, CTC i DC a partir de  $\log K_{d,\text{OTC}}$ , pH i CEC corresponents al sòl. En aquest cas, les prediccions també ha presentat uns errors relatius inferiors al 5 %.
- La sorció de SMT en sistemes biochar-aigua es descriu mitjançant el model de Freundlich. La intensitat de la sorció augmenta en augmentar el grau de carbonització (Agrichar > Soil Reef > PureBlack > CQuest), mentre que la linealitat de la isoterma disminueix.
- En el sistema Agrichar-aigua la sorció de SMT està fortament condicionada per l'especiació de la SMT. Els  $\log K_d$  corresponents a les espècies catiònica, neutra i aniònica són 5.50, 6.04 i  $4.91 \text{ L kg}^{-1}$ , respectivament. L'estudi del mecanisme de



sorció a pH 1, ha posat de manifest que les interaccions  $\pi^+ - \pi$  EDA predominen en la sorció de  $SMT^+$ . A pH 5, la  $SMT^0$  és retinguda majoritàriament mitjançant interaccions hidrofòbiques i forces de van der Waals. En canvi, a pH 10.5 la  $SMT^-$  pot captar un protó de la solució i quedar retinguda en la forma neutra.

- Un sòl acabat d'esmenar amb biochar presenta un augment de la sorció de  $SMT$ . La magnitud d'aquest increment inicial depèn del grau de carbonització del biochar i del contingut d'aquest en el sòl.
- En augmentar el temps de contacte entre sòl i biochar es produeix una atenuació de la sorció en els sòls esmenats. Així, en aquesta tesi s'han observat disminucions de la sorció de fins a 1 ordre de magnitud en transcórrer 1 mes des de la preparació de la mescla.
- S'han desenvolupat, en un entorn MS-Excel<sup>TM</sup>, noves eines pel tractament de dades de sorció: la funció ISOT\_Calc i la macro Ref\_GN\_LM. Aquestes són de gran utilitat en la selecció del model de sorció i l'ajust de les dades experimentals.

