



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi de la distribució dels compostos organoclorats en els organismes fluvials sota la influència dels efluents d'una planta clor-àlcali (riu Ebre, entre Mequinensa i el Delta)

David Huertas López

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

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

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

ESTUDI DE LA DISTRIBUCIÓ DELS COMPOSTOS ORGANOCOLORATS EN ELS ORGANISMES FLUVIALS SOTA LA INFLUÈNCIA DELS EFLUENTS D'UNA PLANTA CLOR-ÀLCALI (RIU EBRE, ENTRE MEQUINENSA I EL DELTA)

David Huertas López



Programa de doctorat:
“Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució”
Bienni 2006-2008

Memòria presentada per optar al
Títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

**Estudi de la distribució dels compostos
organoclorats en els organismes fluvials sota
la influència dels efluent d’una planta clor-àlcali
(riu Ebre, entre Mequinensa i el Delta)**

David Huertas López
Barcelona, Setembre de 2015

Tutor de Tesi:

Dr. Francisco Javier Santos i Vicente
Professor Titular d’Universitat

Departament de Química Analítica
Universitat de Barcelona
(UB)

Director de Tesi:

Dr. Joan Grimalt i Obrador
Professor d’Investigació

Departament de Química Ambiental
Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l’Aigua
Consell Superior d’Investigacions Científiques
(IDÆA-CSIC)

Aquest treball de recerca s'ha pogut realitzar gràcies al suport del Consell Superior d'Investigacions Científiques, el *Ministerio de Ciencia e Innovación* i el *Ministerio de Educación* mitjançant una beca pre-doctoral del Programa Nacional de Formació de *Profesorado Universitario* (FPU-AP2007-01824).

*After years of hard work my motivation is still the same:
"Be absolutely determined to enjoy what you do!"*

Gerry Sikorski

Agraïments

Acabar una tesi doctoral és un viatge llarg. I com en tot viatge, els companys d'aventura són molt importants. Al llarg d'aquests anys hem pogut viure plegats un munt d'experiències i situacions inoblidables que encara el fan més valuós. És per això, que en aquest petit espai m'agradaria homenatjar a totes aquelles persones que d'una forma o altra heu col·laborat a que el meu viatge particular pugui arribar a bon port.

“Les oportunitats no són producte de la casualitat, més aviat són resultat del treball (Tonatihu)”

En acabar la carrera de ciències ambientals, se'm van obrir diverses possibilitats per entrar al món laboral. Com sempre al llarg de la vida, calia triar quin camí seguir. Abans d'aquell moment no m'havia plantejat mai realitzar una tesi doctoral i pràcticament no en sabia res al respecte. Sempre he explicat que, de forma sintetitzada, he pogut realitzar aquesta tesi doctoral gràcies a un anunci penjat en un ascensor d'una de les torres de la facultat de ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona. Allà s'oferia la possibilitat de realitzar una tesi doctoral en el camp de la radioactivitat ambiental, temàtica que em va agradar molt al meu darrer curs universitari. He d'agrair al Jordi Garcia Orellana la seva insistència per fer-me presentar a la plaça, així com al Pere Masqué per, tot i no triar-me a mi com a candidat per aquella tesi doctoral, recomanar-me a un altre investigador relacionat amb el món de les ciències ambientals. Ells dos van ser els meus primers contactes científics “post-universitaris”.

“Per començar un gran projecte, fa falta valentia. Per acabar un gran projecte, fa falta perseverança”

El segon tram del meu viatge es va iniciar amb l'oportunitat de realitzar la present tesi doctoral. Vull agrair sincerament la confiança dipositada en mi per part d'en Joan Grimalt, que em va obrir l'oportunitat de conèixer el món científic relacionat amb la química ambiental en profunditat. També cal esmentar la feina feta pels altres investigadors del grup de recerca, Pilar Fernández i Jordi López, que sempre han intentat compartir els seus coneixements davant dels meus dubtes en qualsevol temàtica. Amb tots ells he pogut créixer com a persona i com a científic exposant els resultats obtinguts en reunions de projectes, congressos espanyols i trobades internacionals.

He d'esmentar que es mereixen un agraïment especial tots aquells companys de laboratori amb els que he tingut l'honor de compartir tantes activitats, tan científiques com d'oci. És impossible

recordar tots els bons moments que hem gaudit plegats al laboratori i realitzant altres activitats, però el que no oblidaré mai són els vostres noms: la Carme, la Mireia, la Lourdes, l'Esther, la Mercè, les Martes, la Berit, la Carolina, la Nèlia, la Belen, la Cons, la Montse, la Yolanda, l'Anton, l'Òscar, el Barend, el Roberto, el Daniel, el Roger, l'Anuar i el Bibi. Vull fer extensius aquests agraïments a les persones que pertanyen a altres grups d'investigació del centre amb els que he tingut contacte i amb la gent que ha estat temporalment al nostre laboratori: l'Aleix, la Gatsby, el Luis, la Melissa, la Joana, el Carlos, el Sabino, la Naiara, la Maria José, l'Ana, el Cristóbal, el Víctor, l'Eric, etc.

Diuen que ensenyar és molt més difícil que aprendre perquè vol dir: deixar aprendre. En aquest sentit vull agrair a la gent que s'ha deixat ensenyar per mi dins del laboratori: el Bastian, la Mireia i el Sam. Tots ells han estat uns alumnes excel·lents que m'han facilitat molt la meva tasca d'ensenyament alhora que em permetien aprendre noves coses. Finalment, per a que tots els equips científics del centre funcionessin correctament, sempre hi ha hagut alguna persona treballant de valent per ajudar-me davant qualsevol problema. Per a elles també van els meus agraïments: la Patricia, l'Imma, la Roser, la Dori i la Maria.

“L'únic lloc on l'èxit arriba abans que el treball és al diccionari (Vidal Sassoon)”

Per a realitzar aquesta tesi he tingut l'avantatge i la fortuna de poder agafar les meves pròpies mostres en col·laboració amb altres grups de recerca. El projecte d'investigació dels residus de Flix ha estat complex i ha implicat molta feina. Per això, a l'hora de treballar al camp he comptat amb la inestimable ajuda del David, el Romero, el Guillermo, el Jordi i l'Esperança del CEAB; el Lluís, el Josep i l'Emili de la UdG; la Núria de la UAB; el Basilio, l'Olga i el Pere Josep del Grup Natura Freixe-Reserva de Flix; el Xavier, el Javier i el Sergi de la UB. Per tots vosaltres, moltes gràcies pels bons moments viscuts davant les situacions complicades que sempre es generen fora de casa.

“Si vols triomfar, no et quedis mirant l'escala. Comença a pujar, graó a graó, fins que arribis a dalt”

Les últimes etapes del viatge que vull remarcar s'han produït ben lluny de casa. L'any 2010 vaig tenir l'oportunitat de realitzar una estada d'investigació al University Center in Svalbard (UNIS). Aquest centre està ubicat a només 1000 quilòmetres del Pol Nord. En un ambient com aquest no hagués pogut sobreviure tan fàcilment sense l'ajuda i confiança de les següents persones: el Roland, el Mark, la Pernilla, la Lorna, la Fanny, l'Anna, la Malu, tota la gent d'administració, logística i dels departaments de biologia i tecnologia àrtica de la universitat, i

tots els estudiants (permanents o passatgers) de les barraques de Nybyen. Moltes gràcies a tots per fer-me sentir com a casa. Més recentment, des del 2014 tinc la gran oportunitat d'estar treballant en un laboratori de referència en la producció i anàlisi químic de materials de referència i de mostres ambientals. Aquí he tingut la gran ajuda i facilitat per continuar aprenent més coses sobre la nostra feina que he pogut aplicar a la finalització d'aquesta tesi. A tots els meus nous companys, els meus agraïments sincers.

“El que sabem és una gota d'aigua, el que ignorem és l'oceà (Isaac Newton)”

El viatge continua a partir d'ara, i no puc deixar d'agrair a tots els meus amics de Terrassa i de la UAB, la seva paciència i comprensió per la meva dedicació a la tesi. No esmentaré cap nom en concret perquè me'n deixaria molts i els que mereixen els agraïments ja ho sabeu. Gràcies a tots vosaltres, els que no he esmentat personalment i que d'una forma o altra m'heu acompanyat en aquest viatge.

Si puc escriure aquestes ratlles es gràcies als meus pares i familiars, que sempre han estat al meu costat en tot moment. Ells m'han facilitat la vida en tots els aspectes possibles, tan els quotidians com els de formació. Sense ells tot aquest viatge no hauria ni tan sols començat: moltes gràcies.

Per acabar he de fer esment especial per a l'Astrid, que m'ha acompanyat en aquesta travessia des de pràcticament el principi. Moltes gràcies per la teva comprensió, suport i ajuda. Sense tu, el disseny d'aquesta tesi hauria estat molt diferent. A partir d'ara el viatge continua per tots dos. Gràcies per acompanyar-me!

*Si los ladrillos no están bien hechos,
las paredes se caen.*

*Lo que he construido aquí es una pared enorme,
por lo que he necesitado montones de ladrillos.
Por suerte conozco a muchos que los fabrican,
así como a toda clase de personas útiles.*

*Alguien me dijo una vez que si iba a hacer algo,
debería tomarme mi tiempo y hacerlo bien.*

*Una vez más, mi agradecimiento
para esos buenos amigos que con tanta gentileza
pusieron a mi disposición sus conocimientos
para que mis ladrillos fueran sólidos
y de buena calidad.*

*Adaptació de G.R.R. Martin "Canción de Hielo y Fuego"
y Patrick Rothfuss "El Nombre del Viento"*

Índex

Resum	xiii
Abstract	xvi
Acrònims	xviii
1. Introducció	21
1.1 Història de Flix	23
1.1.1 Orígens i evolució de la vila	23
1.1.2 La planta clor-àlcali	26
1.1.3 Descobriments dels fangs contaminats	29
1.2 Àrea d'estudi	33
1.2.1 Entorn de la conca fluvial del riu Ebre	33
1.2.2 Contaminació històrica de COPs a la conca fluvial del riu Ebre	36
1.2.3 Caracterització dels residus de l'embassament de Flix	38
1.3 Compostos orgànics persistents (COPs)	43
1.3.1 Els clorobenzens (PeCB i HCB)	45
1.3.2 Policlorobifenils (PCBs)	47
1.3.3 Diclorodifeniltricloroetà i metabòlits (DDTs, DDEs i DDDs)	49
1.3.4 Hexaclorociclohexans (HCHs)	51
1.3.5 Policloroestirens (PCEs)	52
1.4 Les xarxes tròfiques aquàtiques: conceptes de bioacumulació, bioconcentració i biomagnificació	54
1.4.1 Xarxa tròfica fluvial	54
1.4.2 Bioacumulació, bioconcentració i biomagnificació	56
1.5 Transport latitudinal dels COPs	58
2. Objectius	61
3. Metodologia	65
3.1 Àmbit d'estudi: matrius analitzades i zones de recollida de mostra	67
3.1.1 Tram baix de la conca del riu Ebre	67
3.1.1.1 Matrius analitzades	67
3.1.1.2 Localitats de recollida de mostra	96
3.2 Metodologies analítiques per a cada matriu	111
3.3 Tècniques cromatogràfiques	117
3.3.1 GC-ECD	117
3.3.2 GC-NICI-MS	118
3.3.3 Qualitat de la metodologia analítica i anàlisi estadístic	119

4. Resultats	125
4.1 Concentracions de COPs als primers nivells tròfics de l'embassament de Flix: mol·luscs i crustacis	129
4.1.1 Article 1	131
4.2 Concentracions de COPs en peixos de l'embassament de Flix i transport aigües avall del riu Ebre	143
4.2.1 Article 2	145
4.2.2 Article 3	157
4.2.3 Supplementary information	187
4.3 Concentracions de COPs en ous d'ocells del riu Ebre	189
4.3.1 Article 4	191
4.3.2 Article 5	203
4.4 Concentracions i biomagnificació dels COPs dins de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix	213
4.4.1 Article 6	215
5. Discussió dels resultats	241
5.1 Determinació dels COPs als nivells inferiors de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix	243
5.2 Determinació de COPs en peixos del tram baix del riu Ebre (de Mequinensa al Delta)	246
5.3 Determinació de COPs en ous d'ocell al tram baix del riu Ebre	260
5.4 Determinació de la biomagnificació de COPs a l'embassament de Flix	264
6. Conclusions	273
7. Bibliografia	289

Resum

Els compostos orgànics persistents (COPs) són un conjunt de contaminants que comparteixen una sèrie de característiques comuns. Com el seu nom indica, poden romandre en el medi ambient durant llargs períodes de temps, són molt estables i no es degraden amb facilitat. D'altra banda són tòxics i a causa de les seves propietats fisico-químiques es distribueixen per tot el planeta transportant-se a llocs remots allunyats dels focus emissors. A més, en ser lipofílics, tenen una gran capacitat de bioacumulació en els organismes i per tant es biomagnifiquen al llarg de les xarxes tròfiques.

La producció de compostos organoclorats durant el darrer segle per part de l'empresa cloro-àlcali situada a Flix (al sud oest de Catalunya), ha donat lloc a l'acumulació de fangs contaminats a l'embassament d'aquesta població. Tradicionalment, en relació a les concentracions de contaminants orgànics, els organismes han estat tractats de forma parcial en tot aquest tram final del riu Ebre. Es per aquesta raó que en aquesta tesi s'ha realitzat un estudi més complet de la seva distribució i impacte sobre tots els nivells de les xarxes tròfiques fluvials tot començant pels nivells tròfics inferiors i incloent els principals depredadors. Això ha representat l'anàlisi de diversos compostos organoclorats en diferents matrius biòtiques i abiòtiques: els clorobenzens (PeCB i HCB), els policlorobifenils (PCBs), els hexaclorociclohexans (HCHs), el diclorodifeniltricloroetà (DDT) i els seus metabòlits, així com també els policloroestirens (PCEs). Per complementar la recerca s'ha volgut estudiar la presència d'aquests compostos a llocs allunyats de les principals fonts d'emissió. Per fer això, s'han analitzat mostres al llarg de tot el tram baix del riu Ebre, per comprovar si hi havia diferències de concentracions respecte a l'embassament de Flix, diferències en els patrons de distribució de COPs, o en els fenòmens de biomagnificació d'aquests compostos.

Així mateix aquesta tesi estudia l'impacte que ha tingut la fàbrica cloro-àlcali situada a l'embassament de Flix sobre les xarxes tròfiques del darrer tram del riu Ebre, i com aquest focus de contaminació puntual, ha afectat els llocs situats a distàncies llargues de les emissions i abocaments. Primer s'estudien les concentracions de COPs i les relacions entre els nivells tròfics inferiors de l'embassament de Flix. En segon lloc s'avaluen els nivells de contaminants que tenen els peixos tant a l'embassament com aigües avall. En tercer lloc es determina l'efecte que tenen els compostos organoclorats en els estadis superiors de les xarxes tròfiques fluvials: els ocells. Per finalitzar, es condensa tota la informació relacionada amb la biomagnificació dels contaminants al llarg de la xarxa tròfica dins de l'embassament de Flix.

S'han trobat unes concentracions molt altes d'alguns COPs en els sediments i biofilm de l'embassament de Flix, especialment d'HCB, DDTs i PCBs. Aquests compostos augmenten a dins dels nivells inferiors de la cadena tròfica (des del fitoplàncton fins al cranc de riu americà (*Procambarus clarkii*) o el musclo zebra (*Dreissena polymorpha*)). La comparació de resultats entre marges dins de l'embassament de Flix mostra que existeixen diferències significatives per algunes espècies. En tots els casos les concentracions de PeCB, HCB, DDTs i PCBs són més altes a més proximitat dels sediments.

Les concentracions de COPs trobades als peixos de l'embassament de Flix són molt altes per la influència dels sediments contaminats que es troben a la llera del riu. Tots aquests grups de contaminants es troben a totes les espècies sense excepció. A les carpes (*Cyprinus carpio*) les concentracions de de la majoria de COPs estudiats són molt més altes que a les altres espècies de peixos analitzades. Els hàbits alimentaris d'aquesta espècie poden explicar aquest fenomen perquè es tracta d'una espècie molt bentívora.

L'estudi del transport de COPs aigües avall demostra que hi ha una mobilització de contaminants des de l'embassament de Flix aigües avall que afecta als espècimens estudiats de rutils (*Rutilus rutilus*), carpes i silurs (*Silurus glanis*), en les que s'han trobat concentracions d'igual ordre de magnitud o fins i tot superiors a més de 100 quilòmetres del propi embassament. Les concentracions d'HCB, PCBs i DDTs trobades en aquestes mostres, indiquen una influència de les descàrregues dutes a terme per la planta clor-àlcali. Les concentracions en les localitats mostrejades aigües avall són més altes que les dels llocs de referència i fins i tot hi ha individus dels canals que han mostrat valors més alts en comparació amb les mostres de la llera del riu.

A més, s'han observat altes concentracions de COPs en els ous de l'agró roig (*Ardea purpurea*) analitzats a diferents punts de mostreig del tram final del riu Ebre evidenciant de nou que existeix una clara influència de les emissions de la planta clor-àlcali a tota l'àrea del voltant. Fins i tot en algunes mostres de l'embassament de Flix, les concentracions de *p,p'*-DDE es troben per sobre dels límits establerts com a potencialment perillosos per a la reproducció en aquest tipus d'espècies. Per als compostos d'origen més industrial, les concentracions són més altes a l'embassament de Flix, mentre que per aquells d'ús més agrícola es troben valors més a d'altres punts de mostreig situats aigües amunt i avall de l'embassament.

A l'embassament de Flix existeix una tendència clara a la biomagnificació de tots els grups principals de COPs estudiats. Aquest increment de les concentracions és més clar pels DDTs i PCBs. En general, els productors primaris tenen concentracions molt baixes de tots els COPs. A

un nivell superior, els consumidors primaris tenen concentracions molt més altes però sense canviar la distribució dels patrons dels metabòlits o congèneres. Finalment, els consumidors secundaris (peixos depredadors i aus) tenen concentracions molt més altes d'HCB, DDTs i PCBs. En aquest sentit, els factors de biomagnificació (FBM) són molt alts pels compostos més volàtils (PeCB i HCB) en comparació amb els altres grups (HCHs, DDTs o PCBs).



Abstract

Persistent organic pollutants (POPs) are a well-known group of contaminants that have in common some characteristics. As its name indicates, they can remain in the environment for long periods of time, they are stable and do not degrade easily. Furthermore, they are toxic and because of their physical and chemical properties they can be distributed throughout the planet reaching remote places far away from pollution sources. In addition, they are lipophilic and with great capacity to bioaccumulate inside the organisms so they are biomagnified along food webs.

The production of organochlorine compounds during the last century by the chlor-alkali plant located at Flix (South West Catalonia) has generated an accumulation of polluted muds inside the water reservoir from this locality. Concerning the concentrations of organic pollutants, so far the organisms living in the last stretch of the Ebro River have only been considered partially. This is the main reason to include in this thesis a complete study of the distribution and accumulation of these compounds in fluvial food webs starting from the lower trophic levels and including main predators. Different organochlorine compounds have been analyzed in a wide range of biotic and non-biotic matrices: chlorobenzenes (PeCB and HCB), polychlorobiphenyls (PCBs), hexachlorocyclohexanes (HCHs), dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolites, as well as the polychlorostyrenes (PCSs). To complement this research, the presence of these compounds has been assessed in sites located far away from main pollution sources. To achieve this, samples from the last stretch of the Ebro River have been analysed in order to assess if there were differences in concentrations in comparison to samples from the Flix water reservoir, differences in distribution patterns of POPs, or differences at the biomagnification processes of these compounds.

This thesis studies the impact of the chlor-alkali plant located in the Flix water reservoir onto the food webs of the last stretch of Ebro River and how this kind of pollution sources can affect other sites located far away from the emission points. Firstly it studies concentrations of POPs and the relationships between lower trophic levels from the Flix water reservoir. Secondly it evaluates levels of contaminants from fish inside the Flix water reservoir and downstream. Third, it determines the effect that POPs have at higher trophic levels from fluvial food webs: birds. Finally, it integrates all the information related to the biomagnification of pollutants along the food web within the Flix water reservoir.

High concentrations of some POPs have been found at sediment and biofilm from the Flix water reservoir, particularly HCB, DDTs and PCBs. Concentrations of organochlorine compounds increased at lower food web compartments (from phytoplankton to crayfish (*Procambarus*

clarkii) or zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Significant differences in concentrations of POPs have been found in some species located at the two sides of the water reservoir. In all cases, concentrations of PeCB, HCB, DDTs and PCBs are higher as closer are the organisms from the polluted sediments.

The concentrations of organochlorine compounds in the fish from the Flix water reservoir are high due to the influence of polluted sediments from the riverbed. All these groups of pollutants have been detected in all samples without exception. Carps (*Cyprinus carpio*) have higher concentrations of almost all POPs in comparison with the rest of fish species analysed. Diet habits of this species can explain these differences because they are benthic.

The study of POPs transport downstream reflects a mobilization of contaminants from the Flix water reservoir downstream that affects specimens of roach (*Rutilus rutilus*), carp and European catfish (*Silurus glanis*), from which concentrations were at the same order of magnitude or even higher more than 100 km downstream. The concentrations of HCB, PCBs and DDT in these samples reflected the past discharges of these compounds from this factory. Concentrations found downstream are higher than at reference sites and some of the specimens collected in the channels showed higher concentrations than those found in the specimens from the riverbed sites.

In addition, high concentrations of POPs have been found in purple heron (*Ardea purpurea*) eggs in selected locations of the last stretch of the Ebro River indicating once more the clear influence of the emissions of the chlor-alkali plant in the area located nearby this installation. Some of the *p,p'*-DDE concentrations observed in the area nearby were above the threshold effects for reproductive impairment. For those compounds with a more industrial origin, concentrations are higher at Flix water reservoir samples, meanwhile for those more used in agriculture concentrations are higher at other sampled sites located upstream and downstream of the reservoir.

At Flix water reservoir there is a clear trend to biomagnification of all studied POPs. This increment of concentrations is even clearer for total DDTs and PCBs. Overall, primary producers have very low concentrations of all POPs. In an upper level, primary consumers have higher concentrations but without changing distribution patterns of the metabolites or congeners. Finally, secondary consumers (predator fish and birds) have much higher concentrations of HCB, DDTs and PCBs. Taking all this in consideration, biomagnification factors (BMF) are much higher for volatile compounds (PeCB and HCB) in comparison with the rest (HCHs, DDTs or PCBs).



Acrònims

ACA	Agència Catalana de l'Aigua
BMF	Biomagnification factors
Bq/kg	Becquerels/quilogram
CBs	Clorobenzens
CE	Capillary electrophoresis
CH₃Hg⁺	Metilmercuri
CH₃HgCH₃	Dimetimercuri
CHE	Confederación Hidrográfica del Ebro
CIRIT	Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica
CSIC	Consell Superior d'Investigacions Científiques
COPs	Compostos Orgànics Persistents
DCM	Diclorometà
DDA	2,2-bis(4-chlorophenyl)-acetic acid
DDD	Diclorodifenildicloroetà
DDE	Diclorodifenildicloroetilè
DDT	Diclorodifeniltricloroetà
DDTs	Total de DDTs (DDEs+DDDs+DDTs)
DOGC	Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya
DMAH	Departament de Medi Ambient i Habitatge
DS	Desviació estàndard
ECD	Electron capture detector
ECE	Economic Commission of Europe
EE.UU	Estats Units
EPA	Environmental Protection Agency (US)
FBM	Factors de biomagnificació
FID	Flame ionization detector
FPD	Flame photometric detector
GC	Gas chromatography
GF/F	Glass microfiber filter
GPS	Global Positioning System
HBB	Hexabromobenzè
HCB	Hexaclorobenzè
HCHs	Hexaclorociclohexans
HP	Hewlett Packard

HpBDE	Heptabromodifenil èter
HpCE	Heptacloroestirè
HpCS	Heptaclorostyrene
HxBDE	Hexabromodifenil èter
HxCE	Hexacloroestirè
HxCS	Hexaclorostyrene
IUCN	International Union for Conservation of Nature
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemists
K_{ow}	Coefficient de partició octanol-aigua
LC	Liquid chromatography
LOD	Límits de detecció
LOEC	Lowest observed effect concentration
LOQ	Límits de quantificació
MS	Mass spectrometry
MSD	Mass spectrometer detector
MW	Mega watts
M.Z.A	Madrid-Zaragoza-Alicante
NICI	Negative Ion Chemical Ionization
NPD	Nitrogen Phosphorous Detector
OCE	Octacloroestirè
OCS	Octaclorostyrene
PBDEs	Polibromodifenil èters
PCDD	Policlorodibenzo-p-dioxines
PCDF	Policlorats dibenzofurans
PeBDE	Pentabromodifenil èter
PeCB	Pentaclorobenzè
PeCE	Pentacloroestirè
PeCS	Pentaclorostyrene
PCBs	Policlorobifenils, bifenils policlorats
PCEs	Policloroestirens
PCSs	Polichlorostyrenes
PFOS/PFOSE	Perfluorooctanesulfonic acid or perfluorooctane sulfonate/ perfluorooctane
PNUMA	Programa de les Nacions Unides per al Medi Ambient
POPs	Persistent Organic Pollutants
Ppb	Parts per bilió
Ppm	Parts per milió
PTV	Programmable temperature vaporization

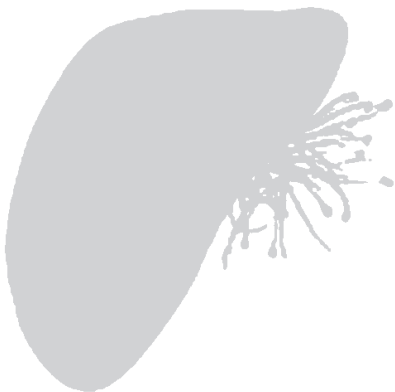


r.p.m	Revolucions per minut
S.A.	Societat Anònima
SFC	Supercritical fluid chromatography
SIM	Selected-ion monitoring
TBB	Tetrabromobenzè
TBDE	Tetrabromodifenil èter
TENORM	Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactivity Materials
TV3	Televisió de Catalunya
UdG	Universitat de Girona
UN	United Nations
UNEP-GC	Programa del Medi Ambient de les Nacions Unides la Comunitat Europea
ZEPA	Zones d'especial protecció per a les aus



Capítol 1

INTRODUCCIÓ



1.1 Història de Flix

1.1.1 Orígens i evolució de la vila

La introducció d'aquesta tesi no seria del tot completa sense fer un esforç de comprensió sobre l'origen del nucli urbà de Flix i la seva estreta relació amb el riu Ebre. És important remarcar que s'han trobat documents o objectes antics conservats que ja indiquen una rellevància històrica de Flix. El riu Ebre ha tingut, i té, una importància capital en el desenvolupament de la vila per la quantitat de recursos que ha generat des dels primers assentaments a la zona (tot oferint aigua i zona de caça) i pels avenços que ha generat als darrers segles (industrialització de la vila i electrificació de la mateixa). Aquesta relació entre el riu i la vila queda reflectida a la vida quotidiana de la gent del poble, com indica al subtítol del *blog* personal d'un reconegut personatge local: “Sóc de Flix, per on l'Ebre passa dues vegades, això és un privilegi!” (<http://blogdejaume.blogspot.com>).

L'entorn de l'actual vila de Flix ha estat punt d'encontre i de rellevància geogràfica des de temps antics. Situada al nord de l'actual comarca de la Ribera d'Ebre (Tarragona), el seu propi nom ja comporta discrepàncies. Hi ha una vessant que apunta a que pot provenir del mot antic *Fleix* (utilitzat per anomenar el freixe). Això explicaria la presència d'aquest arbre tant a l'escut (DOGC núm. 4337, 22/02/2005) com a la bandera de la vila (DOGC núm. 5726, 01-10-2010), ja que els blasons van néixer a l'edat mitjana i havien de ser clars i entenedors (figura 1.1). De fet, després de la gran riuada de 1907, es va decidir plantar el freixe que encara roman a la plaça de l'església com a símbol de la ciutat. De totes formes, la teoria més estesa i acceptada diu que, etimològicament, Flix podria venir del llatí *Flexus* (curvatura o sinuositat), en referència al meandre que el riu Ebre dibuixa al rodejar la vila. Això ens indica, una vegada més, l'estreta relació de Flix amb el riu que l'envolta.

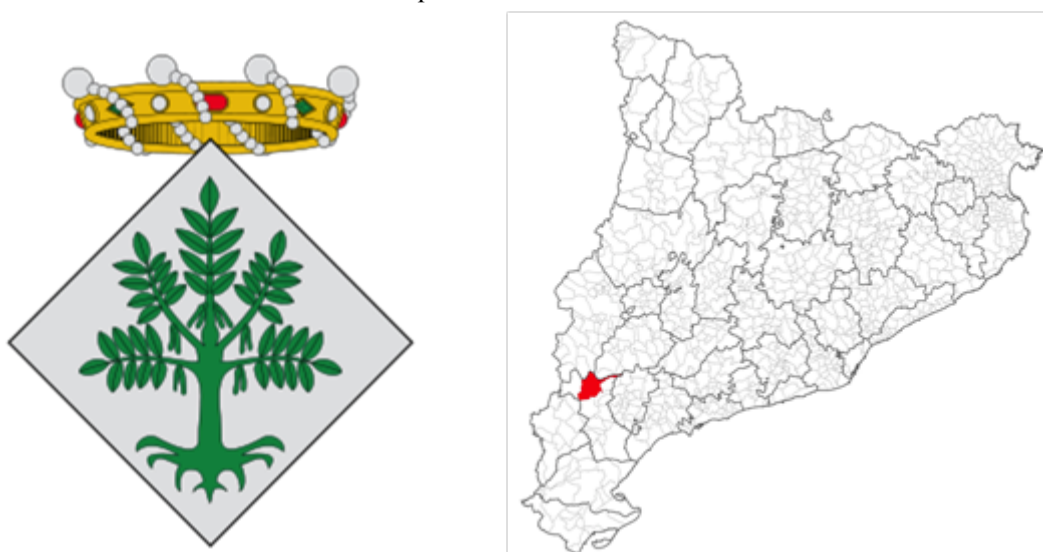


Figura 1.1. Escut de la vila de Flix amb la figura del freixe i localització del municipi de la vila de Flix dins de la comarca de la Ribera d'Ebre.

Els orígens de la vila de Flix es remunten al període pre-ibèric amb restes trobades d'un poblat situat a la vall de Sebes. Aquest es troba situat uns 55 metres sobre el nivell del riu, amb restes de l'època del bronze final i la posterior època dels ibers (s. VII-VI a.C.). L'estratègica situació del poblat i la varietat de troballes romanes localitzades ha plantejat la possibilitat de que es tracti de la desapareguda població d'Octogesa (única referència antiga de nom que queda de l'època romana).

A partir de l'any 1000 (s. XI), en plena ocupació musulmana, els llocs de Miravet, Ascó, Flix i Riba-roja figuren com a llocs fortificats a la frontera de l'Andalus. El 1109 ja apareixen els primers documents amb els topònims referents a Flix. El 1153 Ramon Berenguer IV va conquerir i cedir el Castell de Miravet i altres bens situats a Mequinensa, Flix, Ascó, Garcia, Móra i Tivissa als templers (Colección de Documentos Inéditos del Archivo General de la Corona de Aragón. Tomo 4, p.208. Barcelona, 1849). Un any després, ja apareixen diferents noms per la vila de Flix: Flixio, Flesio, Flix, etc. Al 1303 ja hi ha referències al Pas de Barca de Flix com a límit entre les "Sobrevegueries" i el terme de la vila pertany a una demarcació o altra segons el marge del riu.

El 1443 es decreta la construcció d'un assut, un molí fariner vora el riu i una sèquia per poder "pescar, moldre i regar gran part del terme". Aquest assut es va realitzar sobre el que encara hi havia de l'època àrab, molt malmès per les avingudes de l'Ebre. Amb la guerra civil de 1466, Flix passa a mans aragoneses i s'incendia la població tot cremant el castell de Flix. No és fins al 1645 que es torna a fer una referència històrica important relacionada amb el riu Ebre. Aquest any va ser de gran sequera i durant la Guerra dels Segadors, unes quantes tropes van travessar el riu a guai davant de Flix per intentar conquerir el castell sense èxit. Finalment el mes de setembre del 1950 Flix capitula davant l'exèrcit del Marqués de Mortara, que va deixar escrit "No ay grandeza por mas incomprendible que sea, que los mismos de que se sirve dejen de envidiarla, assi es en todo, emulo de la mar, o con envidia, parece que quiso el Ebro disponer en sus margenes un sitio, que viene a ser Peninsula, aqui en vulgarmente llaman Isla sus moradores a esta sirve de fosso y a el de Corona Flix y su Castillo, fabrica antigua..." en una clara referència a la importància del riu Ebre al pas per la localitat.

El segle XVIII al llarg de la Guerra de Successió Espanyola (1705-1714) també hi ha referències a la bona ubicació estratègica de la fortificació. Juan Alvarez de Colmenar, autor de "Les delices de l'Espanne et du Portugal" va escriure "Esta última en una situación muy ventajosa y bien fortificada por el Arte y por la Naturaleza, edificada en una casi Isla que el Ebro forma haciendo una gran curvatura; de tal modo que este rio lo rodea por tres bandos y le

sirve de foso...”. El 1714, Flix passa a ser possessió reial i el 1715 es confecciona el plànol de la vila. Cap a finals de segle, el 1787 es produeix una gran riuada que provoca la mort de 183 persones entre Riba-roja i la desembocadura del riu Ebre. A Flix s’hi conserva una inscripció sobre pedra que indica que el nivell del riu va augmentar aproximadament uns 10 metres sobre el seu nivell normal: “Del 5 al 8 del mes de octubre de 1787 creció el rio 80 palmos siendo el intendente el varon de la Linde cavallero profeso del orden de Santiago y su comisionado don Gregorio Carpentier y Duque Administrador de la sal de esta villa de Flix”.

El 1807, Carles IV reconeix que la flota de llaguts de Flix és la segona més nombrosa de la Província, per darrera de Tortosa (23 patrons de llaut). Novament, el 1826 es produeix una riuada important i no és fins el 1858 que es construeix un canal de navegació (1100 metres de llargada i 10 d’amplada) i la resclosa de Flix (63 metres de llargada i 10 d’amplada). A finals de segle, el 1891 s’inaugura la via dels ferrocarrils M.Z.A per la vila de Flix i finalment el 1897 es constitueix a Barcelona la “Societat Electro Química de Flix S.A.” que té com a principal accionista la Chemiske Fabrik Elektron. Dos anys més tard, el 1899 arriben els primers tècnics alemanys per supervisar els primers assajos de producció.

Amb l’entrada al segle XX, arriba l’electricitat als principals carrers de Flix el 1903. Novament, el 1907 es produeix una riuada “mil·lenària”, amb 9500 metres cúbics per segon de cabdal, 9 metres per sobre el nivell normal del riu i més de 100 famílies afectades. Deu anys més tard, el 1917 arriba la primera línia telefònica. Es realitzen els primers convenis entre la fàbrica i l’ajuntament per facilitar el subministrament elèctric a un cost baix. Just abans de la proclamació de la II República, el 1931 al “Boletín Oficial de la Província” es dona a conèixer la relació d’afectats per les obres de construcció d’un embassament a Flix per part de “Saltos del Ebro S.A.”. Més tard, just abans de l’inici de la Guerra Civil Espanyola, la premsa anuncia que es construirà un embassament a Flix. Durant els combats, la fàbrica es ocupada per tots dos bàndols fins que a finals de 1938 es dona per finalitzada la batalla de l’Ebre. Uns mesos més tard finalitzaria la Guerra Civil. L’efecte en la població local va ser molt important, tot reduint en més de 1000 persones el cens de la vila de Flix. El 1948 es va inaugurar el salt hidroelèctric de Flix amb una central de 50 MW de potència alimentada pel cabdal del riu Ebre. Tot i això, l’evolució general de la població està lligada clarament a la construcció de la planta clor-àlcali. Tal i com mostra la figura 1.2, al llarg del segle XX hi ha una tendència clara a l’augment de la població degut al bon funcionament de la fàbrica, les millores en el transport, la higiene i l’alimentació. Finalment, els darrers 20 anys, hi ha hagut un progressiu descens de la població local produït també per una reducció de la bonança econòmica de la fàbrica i la tendència generalitzada a la migració des de les viles i pobles cap a les ciutats.

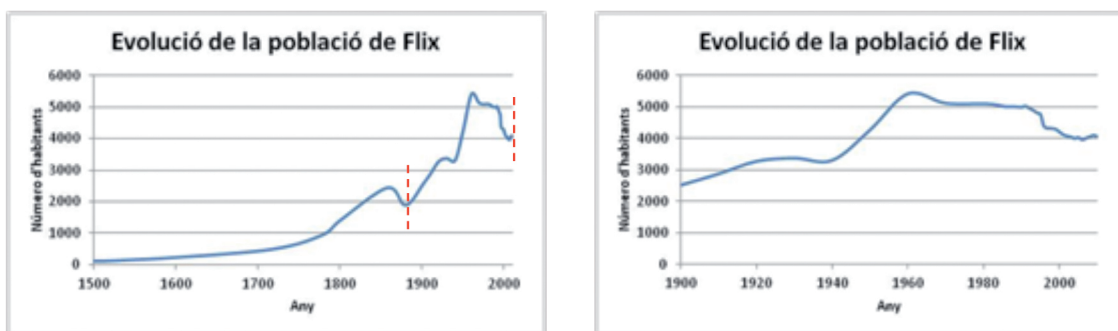


Figura 1.2. (Esquerra) Gràfic amb la tendència del número d'habitants a Flix des del segle XVI fins l'actualitat. (Dreta) Gràfic ampliat dels últims 110 anys. Adaptat de les dades extretes del Centre d'Estudis Demogràfics (<http://www.ced.uab.cat>) i del Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es>).

1.1.2 La planta clor-àlcali

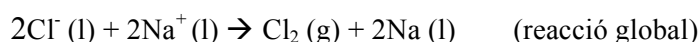
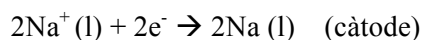
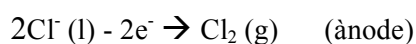
El complex químic de Flix va ser pioner al sector industrial de la producció química bàsica a tota Espanya i va ser el precursor dels polígons industrials de Tarragona, Puertollano, Cartagena i Huelva. La planta electroquímica de Flix (figura 1.3) és una de les factories més antigues del país i va transformar una zona que es dedicava quasi exclusivament a l'agricultura en un entorn ple d'activitat relacionada amb la indústria. Ja des del 1904 es va cedir l'exclusiva de venda dels productes a l'empresa de fertilitzants S.A. Cros, que havia estat fundada el mateix any que la propietària de la fàbrica.



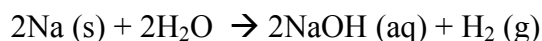
Figura 1.3. Planta electroquímica de Flix a principis de segle XX (<http://www.todocoleccion.net>) i situació dins de l'entorn (<http://obrasocial.catalunyacaixa.com>).

La fàbrica de Flix va ser la primera d'Espanya i la tercera d'Europa en dur a terme el gran canvi tecnològic experimentat per la indústria química tradicional, tot aplicant l'electricitat al procés de fabricació del clor. En el cas de Flix, l'electroforesi utilitzava la sal comuna (clorur sòdic, NaCl) per produir sosa (hidròxid sòdic, NaOH) i clor (Cl₂) de forma simultània.

El procés consta de varies cel·les electrolítiques separades però connectades en sèrie entre elles. L'electròlisi del clorur sòdic funciona segons les reaccions:



En aquest cas el clor es diposita sobre l'ànode mentre que en el càtode es forma una amalgama de sodi i mercuri (si les cel·les són d'aquest metall) que després reacciona amb aigua per formar l'hidròxid sòdic:



La introducció del procés electrolític vingué forçada per l'augment de la demanda del sector tèxtil al que la indústria química aportava clor i sosa per als processos d'acabat, tintat, estampat i blanquejat dels teixits. Al llarg de la seva història la fàbrica va patir els efectes dels diversos conflictes bèl·lics europeus i estatals i per tant es va anar adaptant a la incorporació de productes nous. La taula 1.1 mostra l'evolució dels productes fabricats a la planta de Flix des d'inicis del segle XX.

Taula 1.1. Evolució històrica de la producció de l'empresa clor-àlcali de Flix (adaptada del llibre Centenari de "La Fàbrica". De la Societat Electro-química de Flix a Erkimia, 1897-1997). ERCROS (2008).

Període producció	Substància	Període producció	Substància
1900	Sosa, clor, hipoclorit sòdic	1954	Hipoclorit sòdic
1902	Clorat sòdic	1954-1972	Cianur de sodi
1904	Àcid clorhídric sintètic	1954-1992	Hexacloroetà
1907	Clorat potàssic, tetraclorur de carboni, clorur d'estany, sals de bari	1956	Sodi, ferrocianur de calci i tetraclorur de silici
1912	Clorur de bari	1959-1987	PCBs
1914-1918	Àcid tartàric, fluorur sòdic, permanganat potàssic	1960	Hexaclorociclohexans
1922	Nitrogen i amoníac	1960-1974	Alcohols grassos
1923	Cloratita, àcid nítric i sulfat amònic sintètic	1960-1975	Acetat de vinil
1925	Sulfat sòdic	1960-1980	Difenil
1928	Tricloroetilè	1961	Clor líquid
1930	Barita	1962-1988	Clorur de calci
1944-1978	Amoníac	1963-1990	Tricloroetilè
1945	Permanganat potàssic	1965	Àcid clorhídric
1945-1971	DDT	1969-1974	Clorofluorometans
1947	Cloral i hidrat de cloral	1972	Percloroetilè



1947-1980	Clorobenzè	1973	Fosfat bicàlcic
1947-1991	Clorur d'amoní	1980-1990	Màxima producció de clor
1949	Ànode de grafit i càtode de mercuri	1981-1985	Àcid monocloroacètic
1949-1980	Hidròxid potàssic	1984	Policlorur i sulfat d'alumini
1950	Àcid sulfúric	1990	Cloroform i diclorometà
1951-1970	Sodi	1990-1993	Dues línies:
			- Orgànica (clorometans i percloroetilè)
			- Inorgànica (àcid clorhídric, hipoclorit sòdic i clorur fèrric)

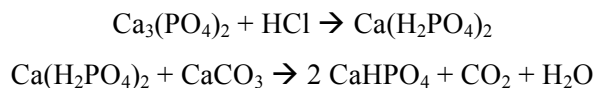
Finalment, entre els anys 50 i 70 l'empresa electroquímica es transforma en una societat anònima (S.A) i es produeix la seva major expansió. El major accionista era S.A. Cros, que posteriorment acabaria absorbint tota l'empresa (1974). A partir de 1973 també va començar a aprofitar l'excés de HCl per produir fosfat bicàlcic per a l'enriquiment dels pinsos compostos alimentaris destinats als sectors de l'aviram, boví, porcí i altres animals domèstics.

Els anys 80 la indústria del clor va viure un repunt en la seva producció i a Flix es van arribar a fabricar 140000 tones de clor a l'any. El 65% de la producció pertanyia a la línia de derivats orgànics (tetraclorur de carboni i percloroetilè), un 25% de la línia d'inorgànics (àcid clorhídric i clorid sòdic, entre d'altres) i el 10% restant consistia en clor líquid.

Una dècada més tard l'empresa es va haver de transformar i va adaptar la seva producció de nou. Va augmentar la seva producció de compostos inorgànics (tot arribant al 50% de la producció) amb àcid clorhídric, hipoclorit sòdic i clorur fèrric (taula 1). A partir d'aquestes dates van començar a aparèixer les normatives ambientals més estrictes i es van prohibir molts dels derivats orgànics produïts tradicionalment per l'empresa (tricloroetilè, hexacloroetà, clorur d'amoní, tetraclorur de carboni). La producció de clor va reduir-se fins les 125000 tones de clor a l'any i la línia de fabricació de compostos orgànics (l'altre 50% de la producció) va passar a estar dominada per clorometans i el percloroetilè.

A mitjans dels 90 (1992 i 1995) la planta de producció de la fàbrica es va ampliar i es va incrementar la producció de fosfat (de 70000 tones a l'any fins a 100000 tones l'any). Aquest fosfat bicàlcic es fabrica a partir de fonts de fòsfor mineral. El mètode tradicional d'obtenció consisteix en tractar la roca fosfòrica (fosforita, generalment) amb un àcid fort (HCl) i una font de calci (Ca(OH)_3 o CaCO_3) a altes temperatures. Concretament a l'empresa de Flix, el procés industrial que es realitza consisteix en fer reaccionar HCl (subproducte que s'aprofita de la línia

de la cloració orgànica) amb la fosforita que prové de Bukra (antic Sàhara espanyol), per formar fosfat monocàlcic soluble que és neutralitzat, posteriorment, amb el carbonat càlcic (roca calcària). El producte final resultant és un precipitat de fosfat bicàlcic. El major problema d'aquesta tècnica és que la fosforita emprada conté fluorurs, amb el consegüent risc d'emissió d'àcid fluorhídric, cadmi i diversos radionúclids.



A l'actualitat, l'activitat productiva de la planta se centra principalment en la fabricació de clor i sosa, derivats del clor, dissolvents clorats i l'esmentat fosfat bicàlcic. La seva activitat s'inclou en dues de les diferents divisions de la companyia Ercros: química bàsica i alimentació animal. Té una plantilla de 245 treballadors i té una capacitat instal·lada de producció d'unes 740000 tones anuals (figura 1.4).



Figura 1.4. Vista de la planta clor-àlcali des del marge de la Reserva Natural de Sebes.

1.1.3 Descobriment dels fangs contaminats

A principi dels anys noranta, el Departament de Medi Ambient, a petició del Conseller de Medi Ambient, Sr. D. Albert Vilalta, mitjançant un projecte finançat per la Junta de Sanejament i la Junta de Residus, va abordar l'estudi dels sediments acumulats a l'embassament de Flix per avaluar-ne la probable contaminació que hi havia. A mitjans del 1996, el Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC) va entregar els tres estudis que s'havien demanat per conèixer la ubicació física en el llit del riu dels residus procedents de la indústria. Amb els resultats trobats es va posar de manifest l'existència d'una greu contaminació tant de metalls

pesants com de compostos organoclorats a l'embassament de Flix. El projecte inicial ja preveia una segona fase adreçada a estudiar la distribució de la contaminació en la columna de sediments i a esbrinar en quina època es van dipositar cada tipus de contaminant. Per realitzar aquest estudi en concret, es van emprar diverses tècniques de datació.

(http://territori.scot.cat/cat/notices/contaminacio_del_riu_ebre_a_flix_2004_570.php)

La Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (C.I.R.I.T.) havia convocat tres projectes d'estudi de problemes ambientals de gran importància a Catalunya. El Departament de Química Ambiental de l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona (IIQAB) presentà un projecte sobre l'impacte dels compostos organoclorats en els sistemes aquàtics de Catalunya, rius i llacs. Dins d'aquest projecte hi havia inclosa la contaminació avaluada amb els treballs d'estudi de la contaminació de Flix. Aquest projecte fou un dels escollits i això permeté continuar. La continuació dels treballs s'inicià el 1999. L'informe final es lliurà a l'ACA i a la CIRIT el 10 de desembre del 2003. El 9 de setembre del 2004 Televisió de Catalunya (TV3) va difondre públicament els resultats de l'estudi de forma coordinada amb La Vanguardia i a partir d'aquí la resta de mitjans de comunicació se'n van fer ressò.

Els principals diaris catalans van començar a difondre notícies sobre la descoberta i les seves implicacions sobre el medi ambient. La importància de la descoberta es basava no només en la quantitat de residus acumulats sinó també en la seva varietat. A la bossa de fangs emmagatzemada al marge dret del riu Ebre dins de l'embassament de Flix s'hi van trobar metalls pesants, compostos organoclorats i també residus radioactius. A més, es va començar a pensar quina influència podien tenir les crescudes del riu eventuais en la mobilització d'aquests residus aigües avall, ja que podien afectar als darrers 90 quilòmetres del riu Ebre i arribar fins al Delta de l'Ebre.

Com a exemple de les notícies aparegudes es pot mostrar que el dia 10 de setembre de 2004, "El Periódico de Catalunya" va publicar la notícia de la descoberta dels contaminants acumulats a la llera de l'embassament de Flix. Es donava informació detallada de la quantitat de fangs emmagatzemada (200000-360000 tones) i quins havien estat els principals compostos trobats (mercuri, cadmi, HCB, PCBs, DDTs, Urani 238, etc.).

El dia següent, tot coincidint amb la Diada de Catalunya (11 de setembre del 2004) el mateix diari "El Periódico" va publicar una notícia esperançadora: el Ministeri de Medi Ambient volia netejar els fangs contaminats abans de l'any 2008. En aquesta notícia es detallava la quantitat de fangs contaminats (tant en extensió com en profunditat), es feia una descripció de la

composició, i a més també es començava a comentar quines podrien ser les propostes d'actuació per extreure els residus de la llera del riu. Semblava que hi havia una bona implicació de les entitats competents per solucionar un problema que ja venia de molts anys enrere.

“La Vanguardia” va publicar una àmplia notícia al respecte el dia 21 de setembre del 2004 tot incloent dades més precises sobre les quantitats de contaminants acumulats als residus de l'embassament de Flix. En aquest article, es detallaven les concentracions de metalls pesants i compostos organoclorats trobats als sediments de l'embassament. A més, s'afegia una comparació amb els valors de referència de zones no contaminades.

Poc a poc van anar sorgint més dades basades en l'estudi del Departament de Química Ambiental de l'IIQAB-CSIC. Les comparacions realitzades entre diverses conques fluvials del territori català mostraven la importància de les concentracions trobades a Flix, i es va començar a impulsar de forma més clara la necessitat de realitzar una extracció dels fangs acumulats a l'embassament. Novament, el diari “La Vanguardia” va publicar un article el 16 d'octubre del 2004 per remarcar la rellevància del problema i quines solucions s'haurien d'aplicar a curt termini.

El 27 d'octubre del 2004, la premsa ja va començar a parlar en ferm de la descontaminació dels fangs acumulats a l'embassament de Flix. Es va plantejar quines eren les opcions millors de treball i quina metodologia es podia utilitzar. A més, es va parlar per primer cop del temps que s'hauria d'invertir a part de la quantitat econòmica que s'havia d'emprar. Es donava de temps fins al mes de maig de l'any següent (2005) per avaluar les metodologies possibles i començar a treballar.

La història i evolució del pla de recuperació dels residus de l'embassament va seguir diversos processos administratius per intentar trobar la millor opció aplicable. Això va implicar un endarreriment considerable en les dates previstes per les actuacions, provocant que no fos fins a finals de l'any 2006 quan es va tornar a parlar de dates previstes, i suposadament definitives, per l'extracció dels fangs emmagatzemats a Flix. El 7 de setembre d'aquest any va sortir a la llum que s'havia començat amb un petit pla pilot d'extracció de sediments per comprovar que tot funcionava correctament. Es tornava a donar una data d'inici (que ja era del 2007) i una de finalització de totes les obres cap al 2009. Semblava clar que els fangs s'havien d'extreure de la llera del riu, però continuava la incertesa de quan es podria dur a terme. Per als científics estava molt clar que s'havia de netejar el més aviat possible ja que hi havia risc de mobilització de contaminants aigües avall degut a les crescudes habituals del riu Ebre.



De cara a l'estudi de la distribució dels compostos organoclorats al llarg de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix (part fonamental d'aquesta tesi doctoral), era molt important poder agafar mostres abans de que comencessin les obres per tenir una representació real de l'estat de tots els organismes de l'embassament. Els retards successius en l'execució de les obres va permetre una bona obtenció de mostres molt valuoses. Finalment, a principis de l'any 2010 es va concretar que els fangs tòxics de Flix es tractarien segons la tipologia i quantitat de contaminants que tinguessin. El 8 de febrer d'aquest any va sortir novament una notícia que concretava com serien aquests treballs i quan es podrien dur a terme. La data nova d'inici de l'execució s'endarreriria fins a l'últim quadrimestre de l'any 2011.

No va ser fins a mitjans de l'any 2010 quan es van començar a realitzar realment els treballs d'aïllament dels fangs contaminants a l'embassament de Flix. El 28 de maig d'aquest any "El Punt Avui" publicava la notícia de l'inici dels treballs de construcció del mur que havia d'aïllar els fangs contaminants. L'adjudicació del programa havia estat atorgat el 2008 però els avenços reals del projecte no es van començar a observar fins aquesta data degut a la realització de diverses proves abans d'instal·lar les palplanxes que havien de conformar el mur de confinament definitiu dels residus.

A inicis de l'any 2011 es va certificar que s'acabaria la construcció del mur d'aïllament a finals de gener. Tot i que això semblava que obria les portes cap a l'extracció immediata dels sediments contaminats, la realitat era una altra. Primer calia finalitzar una sèrie d'actuacions per garantir la seguretat de l'extracció i la vida quotidiana de la població de les rodalies. En primer lloc s'havia de construir la planta de tractament dels llots contaminats, després calia finalitzar l'adequació de l'abocador del Racó de la Pubilla (situat a 8 quilòmetres de Flix), i finalment la construcció d'una captació nova d'aigua per al poble de Flix de cara a prevenir un possible episodi de contaminació mentre es duien a terme els treballs d'extracció. Amb totes aquestes dades sobre la taula, el "Diari de Tarragona" va publicar el 8 de gener del 2011 que la previsió per començar realment l'extracció era per finals d'any o inicis del 2012.

Finalment, a mitjans del primer trimestre de l'any 2011 el secretari d'Estat de Medi Rural i Aigua, Josep Puxeu, donava una data oficial per començar l'extracció dels fangs contaminats de l'embassament de Flix. En total, el retard acumulat des de la primera data proposada era de 4 anys, mentre que es complirien gairebé 8 anys des de que s'havien descobert el conjunt de llots contaminats.

1.2 Àrea d'estudi

1.2.1 Entorn de la conca fluvial del riu Ebre

La conca fluvial del riu Ebre és la més extensa de l'Estat Espanyol ocupant un 17,3% del territori peninsular de l'Estat. Limita al nord pel sistema muntanyós del Cantàbric i els Pirineus, pel sud-est amb el sistema Ibèric i per l'est amb la cadena costera catalana (figura 1.5). Això genera una cubeta interna que forma una àmplia zona deprimida plana coneguda com la depressió de l'Ebre. Aquesta conca hídrica es localitza al nord-est de la Península Ibèrica i ocupa una superfície total de 85362 Km² repartits en 3 països: Espanya (84415 Km²), França (502 Km²) i Andorra (445 Km²).

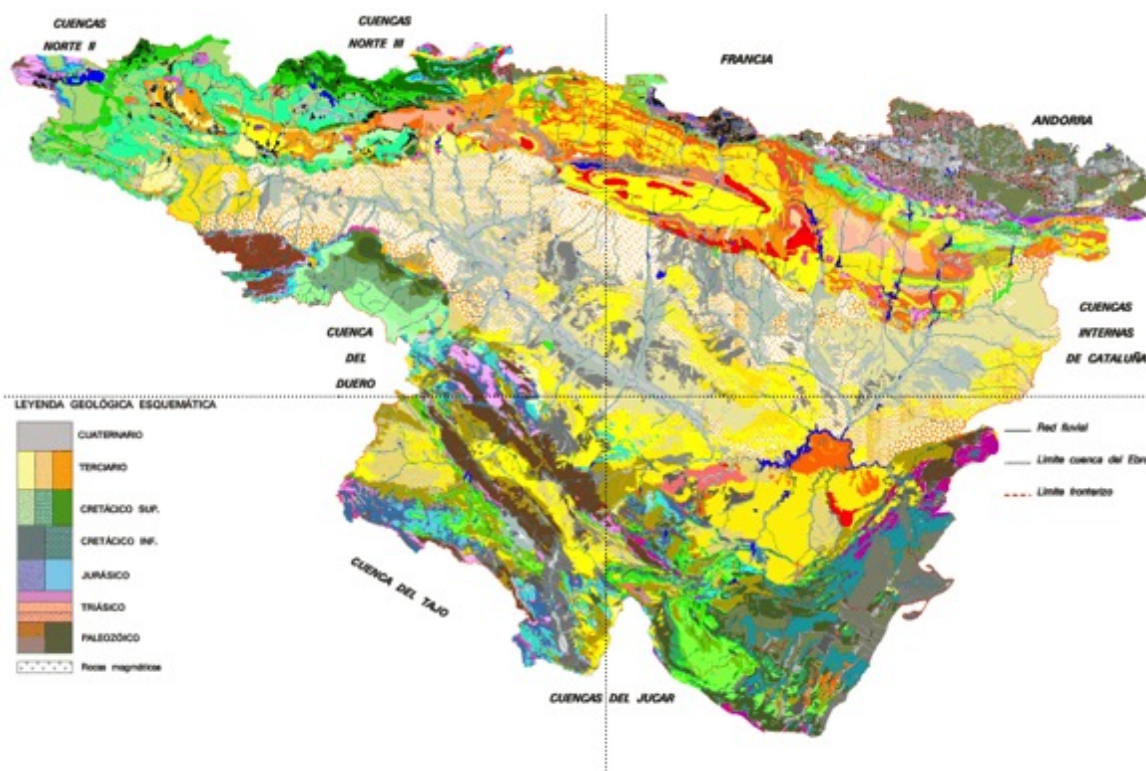


Figura 1.5. Mapa geològic de la conca hídrica del riu Ebre que pertany a Espanya (<http://www.chebro.es>).

El conjunt de la conca està drenada pel riu Ebre, amb una longitud de 910 Km i que transcorre des de la Comunitat Càntabra fins a la desembocadura al Mar Mediterrani, tot formant el Delta de l'Ebre (320 Km²). En total es comptabilitzen 347 rius principals inclosos en aquesta conca i amb una longitud total de 12000 Km aproximadament. Les dues comunitats autònomes amb un major percentatge de superfície dins de la conca són Aragó i Catalunya amb un 49.5% i 17.6%, respectivament. A més, la conca té una influència directa sobre 2.8 milions de persones que viuen repartides en tota la seva extensió (figura 1.6).

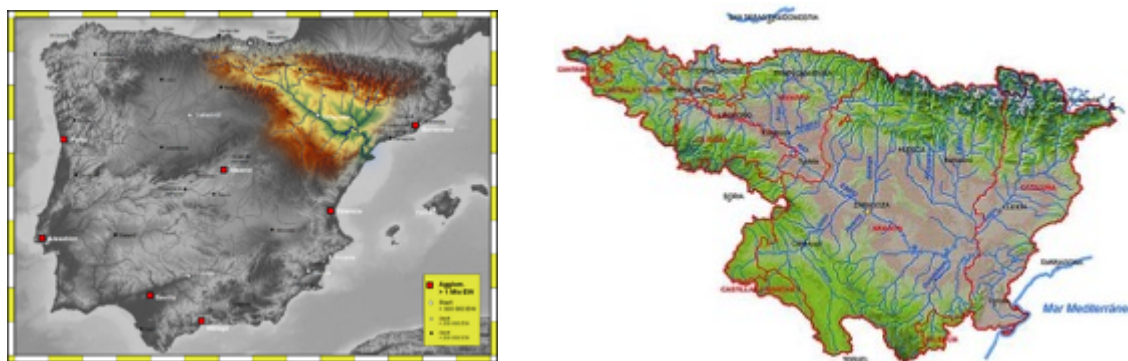


Figura 1.6. Mapes amb la ubicació de la conca hídrica del riu Ebre (esquerra) i les diverses comunitats autònomes que travessa (dreta) (<http://www.riosycuencas.com>).

El cabal del riu Ebre és variable, estacional i molt dependent de la climatologia regional. Com que té una superfície tan gran, la conca del riu Ebre presenta règims pluviomètrics molt diferents amb registres molt elevats a les zones més altes (més de 2000 mm per any) i d'altres molt baixos en zones més àrides (menys de 200 mm per any). Durant els períodes de tardor i hivern solen tenir lloc uns increments de cabal produïts per les pluges comuns en aquesta època. En canvi els increments generats a finals de la primavera estan relacionats amb el desgel de les capçaleres dels rius. Les aigües del riu s'aprofiten en molts indrets per a regadius i agricultura. En concret, al tram final del riu, a partir de l'assut de Xerta neixen els dos canals (el de la Dreta i el de l'Esquerra) que gestionen gran part de l'aigua necessària per l'agricultura de tota aquesta regió i del Delta. El riu Ebre, en el seu tram final, té un cabal mitjà de $615 \text{ m}^3/\text{s}$, tot i que en èpoques d'estiatge pot veure's reduït per sota dels $100 \text{ m}^3/\text{s}$ i en períodes d'avingudes s'han registrat valors de fins a $2500 \text{ m}^3/\text{s}$. Tot i això, el cabal mitjà del riu mostra una tendència clara a la disminució des del 1900 (Guillén i Palanques, 1992).

En el seu tram baix, el cabal del riu Ebre es regula sobretot des dels embassaments de Mequinensa i Riba-roja. El segon problema important que s'ha produït a partir d'aquesta zona és la disminució de la seva descàrrega sedimentària. S'ha calculat que durant el darrer segle, com a conseqüència de la construcció dels embassaments, la descarrega sedimentària s'ha reduït en un 97% (Vericat i Batalla, 2006). Fins i tot estudiant el període comprès entre 1998 i el 2008, s'ha arribat a trobar que la mitjana anual de descàrrega sedimentària equivalia només a l'1% de la que es trobava a principis de segle XX (Grimalt et al., 2003). Tot això fa que hi hagi un dèficit a la zona baixa del riu Ebre, ja que es mobilitzen grans quantitats de sediments cap al mar que no són reemplaçats per aportacions de la part alta del riu, perquè queden retinguts als embassaments (Vericat i Batalla, 2005). Això ha incrementat el fenomen de reducció del Delta de l'Ebre per falta de reposició dels materials erosionats pel mar. Es produeix doncs, una

regressió important del Delta que contrasta amb l'evolució seguida des de la seva formació a partir del segle XVI (figura 1.7).

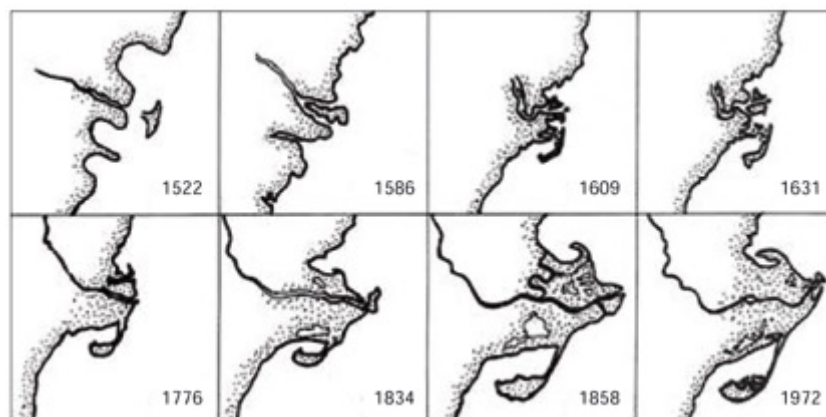


Figura 1.7. Evolució del Delta de l'Ebre des del segle XVI fins al segle XX.

Aqua Pro Omnibus. (<http://aquaproomnibus.blogspot.com.es>).

El riu Ebre ha creat un gran Delta que s'ha convertit en una icona paisatgística, ecològica i econòmica molt important a Catalunya. El 1983 es va declarar un espai protegit al Delta de l'Ebre, i tres anys més tard, el 1986, es va ampliar fins ocupar les actuals 7736 hectàrees. El Delta de l'Ebre és actualment la zona humida més gran del nostre territori i s'ha convertit en una de les més importants de tota l'Europa occidental convertint-se en el segon delta més gran per darrera del Delta del Nil. Constitueix un emplaçament únic per a les aus migratòries al llarg dels seus viatges i com a conseqüència d'aquestes característiques ornitològiques singulars, part del territori del delta fou inclòs dins les zones d'especial protecció per a les aus (ZEPA). El 20% de la superfície del Delta són àrees naturals, el 75% és conreable i la resta urbana.

Al llarg de tota la conca fluvial de l'Ebre l'agricultura és la que consumeix els recursos hídrics. Aquesta compta amb més de 750000 hectàrees de regadiu convertint-se així en l'àrea de regatge més gran d'Espanya. Els tipus de cultiu són variats segons la regió de la conca fluvial. Els cereals són majoritaris (blat, blat de moro i ordi), però el tram baix del riu Ebre també inclou cultius de vinyes, olives, fruita i l'arròs. Els camps d'arròs cobreixen una superfície superior a les 20000 hectàrees. El Delta és un dels centres més importants en el cultiu d'aquest producte a nivell estatal (figura 1.8). Els arrossars formen part del paisatge deltaic i formen unes zones humides molt importants per a tots els organismes que depenen de l'aigua dolça.

Finalment cal destacar que tot i que el principal ús de l'aigua del riu Ebre es destini a l'agricultura (88.8%), altres usos com el ramader (0.9%), l'urbà (4.4%) i l'industrial (5.8%)

també hi són presents i tenen una importància destacada en el desenvolupament de les regions annexades al riu (CHE, 2011: <http://www.che.es>).



Figura 1.8. Fotografia de satèl·lit dels camps d'arròs del Delta de l'Ebre.

1.2.2 Contaminació històrica de COPs a la conca fluvial del riu Ebre

En una conca fluvial tan gran i extensa com la del riu Ebre, els focus de contaminació poden ser molt variats. Les aigües residuals generades per totes les poblacions que es troben al llarg de la conca són un dels focus contaminants coneguts, així com l'impacte generat per les activitats industrials i agrícoles. Al nord de la conca, les indústries automobilístiques, tèxtils, alimentàries, fusteres i mineres, han generat problemes de contaminació (Terrado et al., 2006). La concentració de les activitats industrials al voltant de les principals ciutats de la conca (Saragossa, Vitòria, Pamplona, Logroño, Osca i Lleida) ha provocat la mobilització, en major o menor mesura, de compostos organoclorats i metalls que s'han distribuït per tot el territori d'irrigació del riu Ebre (Lacorte et al., 2006).

A nivell més específic, com a les valls del riu Gállego o el Cinca, on també hi ha zones d'irrigació agrícola intensiva, la implantació d'indústries de producció de dissolvents orgànics i altres pesticides com el lindà o el dicofol ha generat punts de contaminació històrica local (Raldúa et al., 1997; De la Cal et al., 2008). A més, al tram baix del riu Ebre s'hi troba l'esmentada planta clor-àlcali a l'embassament de Flix que, tal i com s'ha comentat anteriorment, ha produït diversos COPs al llarg de la seva història, com ara DDTs, PCBs i HCB. Uns quilòmetres més avall també s'utilitza l'aigua del riu Ebre per a la refrigeració dels sistemes de la central nuclear d'Ascó.

L'altra font principal de contaminació per al riu són les activitats agrícoles perquè comporten majoritàriament un ús molt elevat de plaguicides. La intensificació de l'agricultura a Espanya a les dècades recents ha donat lloc a un increment acusat de la producció i ús d'aquests compostos, tot generant com a conseqüència una contaminació difusa a la conca del riu Ebre (Terrado et al., 2006). Segons les característiques de cada producte poden arribar a contaminar l'aigua del riu, els sediments o fins i tot les aigües freàtiques. Actualment s'estan emprant productes polars com ara l'atrazina (un herbicida del que s'han trobat concentracions en aigua per sobre dels límits legals de forma puntual (Navarro et al., 2010b)) o plaguicides organofosforats. Aquests són molt solubles en aigua i poden contaminar més fàcilment les aigües subterrànies i escampar-se per tota la conca.

Les primeres anàlisis de COPs duts a terme a la regió que ocupa la conca fluvial del riu Ebre no es van realitzar fins a principis dels anys 80. Com a primera aproximació es van analitzar diversos organismes marins situats a la zona del Delta de l'Ebre per controlar les concentracions d'alguns COPs. Es va seguir el mateix patró que s'havia utilitzat en un ampli programa de monitorització a nivell mundial anomenat "Mussel Watch", que emprava mol·luscos com organismes clau aprofitant les seves característiques úniques (Goldberg et al., 1978; Farrington et al., 1983). En un projecte de col·laboració entre Espanya i els Estats Units es va trobar que el riu Ebre era una font important d'alguns compostos clorats com ara DDTs, PCBs o HCHs (Risebrough et al., 1983). Altres estudis posteriors van confirmar que l'aigua del riu Ebre actuava com a principal font de contaminació per HCB a les aigües costeres del Delta i que aquest compost era propens a acumular-se als sediments marins costaners (Grimalt et al., 1988; Amaral et al., 1996). Pel que fa la biota de les parts altes de les xarxes tròfiques, alguns estudis en aus van comprovar que les concentracions de DDTs i PCBs eren del mateix ordre de magnitud que les trobades en altres punts costaners d'Europa.

Finalment, es va començar a relacionar la presència d'aquest tipus de compostos en humans amb alguns tipus de càncer (Grimalt et al., 1994) i uns anys més tard es va comprovar que existia una concentració de base similar en mostres d'aigua per a varis COPs al llarg de tot el riu Ebre, mentre que els sediments agafats a diversos punts del riu mostraven diferents nivells de contaminants segons l'activitat industrial o agrícola desenvolupada localment (Fernández et al., 1999). Estudis més recents van determinar que alguns contaminants d'origen industrial es trobaven més presents en determinades zones del tram mig del riu Ebre, mentre que l'ús més intensiu d'alguns pesticides es podia ubicar a les zones properes al Delta de l'Ebre (Navarro et al., 2010).



En relació amb aquesta contaminació global a la conca fluvial del riu Ebre, aquesta tesi es focalitza en l'estudi dels COPs perquè són compostos produïts en aquest sistema fluvial. Tenen la capacitat de romandre al medi ambient durant períodes llargs de temps i per tant es poden trobar allunyats dels punts d'emissió. S'ha estudiat les concentracions dels principals COPs acumulades en diferents organismes de les xarxes tròfiques fluvials per poder conèixer el seu impacte en el tram baix del riu, els darrers 130 km.

1.2.3 Caracterització dels residus de l'embassament de Flix

A l'embassament de Flix s'hi troba una massa de residus que comprèn entre 200000 i 360000 tones de fangs amb una composició diversa. Aquesta forma un delta en el marge dret, davant la fàbrica clor-àlcali (figura 1.9). Els residus s'han anat acumulant al llarg dels anys a la llera del riu Ebre pels abocaments que l'empresa ha anat realitzant històricament (figura 1.10). En aquests sediments o fangs acumulats a l'embassament de Flix s'hi troben diversos tipus de contaminants. De forma general es poden classificar en tres grans grups:

- 1) Compostos orgànics
- 2) Residus radioactius
- 3) Metalls pesants



Figura 1.9. Fotografia de satèl·lit on es veuen els residus organoclorats a la llera del riu Ebre i el meandre que el riu forma al passar per la vila de Flix.

1) Compostos orgànics

La producció específica de la planta clor-àlcali ha comportat una generació de residus orgànics derivats del clor. Al llarg de la seva història ja hem vist que la pràctica habitual ha estat la síntesi de productes orgànics clorats i per tant és normal que els residus creats estiguin formats per compostos organoclorats. Aquests es poden classificar, segons el seu origen, en productes produïts directament per l'empresa (PCBs, DDTs, HCHs, etc.) o en productes generats durant els processos de formació (subproductes) que també han donat lloc a compostos organoclorats (HCB o PCEs).

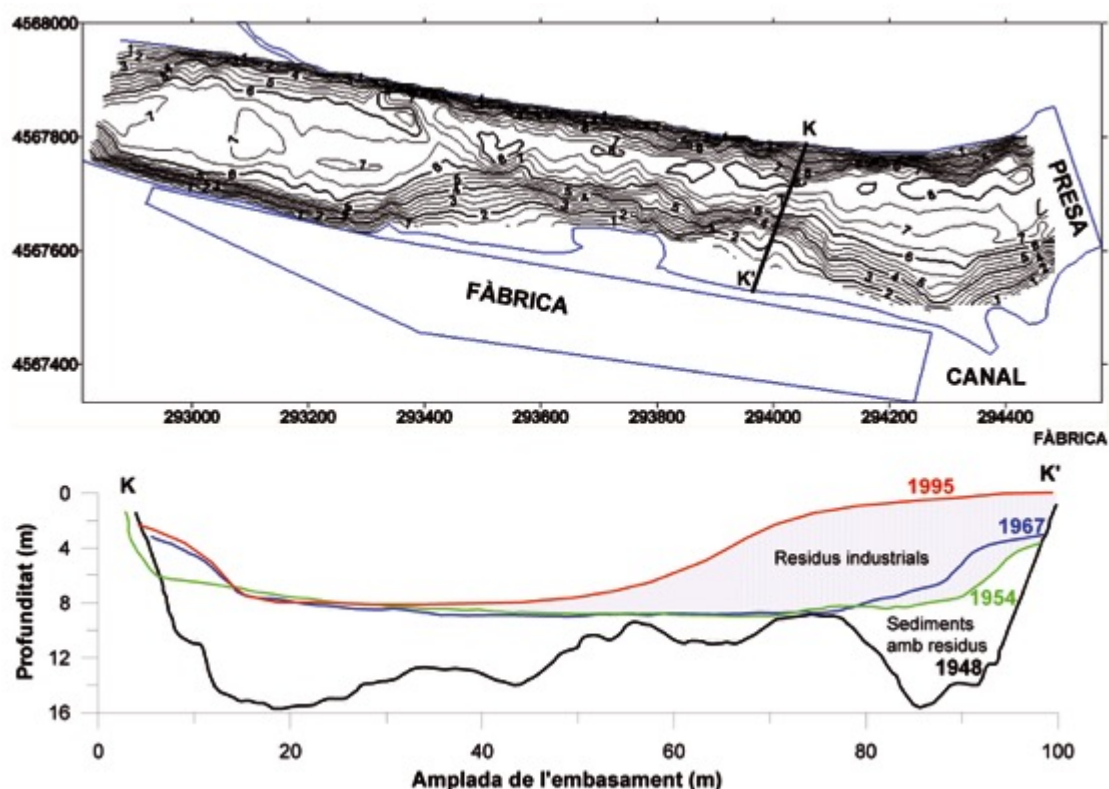


Figura 1.10. Batimetria i perfil de l'embassament de Flix amb l'evolució històrica dels fangs contaminats (Palanques, 2011).

Les concentracions de compostos orgànics trobades als residus de l'embassament de Flix durant els estudis realitzats abans de l'any 2003 eren molt altes. Les concentracions mitjanes de PeCB eren de 10 $\mu\text{g/g}$, les d'HCB eren de 19 $\mu\text{g/g}$; pel total de PCBs es van trobar fins a 39 $\mu\text{g/g}$; els DDTs van arribar a valors de 1.3 $\mu\text{g/g}$ i els PCEs es van trobar en concentracions mitjanes de 0.4 $\mu\text{g/g}$. Tots aquests valors són extremadament alts i molt superiors als valors mitjans trobats en sediments marins o lacustres situats en zones remotes o amb contaminació moderada (Grimalt et al., 2003). Tots aquests valors, però, es troben en concordança amb les activitats desenvolupades per la fàbrica com la producció de DDT entre els anys 1945 i 1971; clorobenzè

entre 1947 i 1980 o PCBs al llarg dels anys compresos entre 1959 i 1987 (taula 1.1). A més, compostos com l'HCB o els PCEs són subproductes que es generen al llarg dels processos de fabricació d'altres productes. El primer cas, quan es produeixen dissolvents orgànics i el segon grup de compostos es generen durant l'electròlisi ja que l'ànode és de grafit i això provoca la formació de PCEs durant la producció de clor (Kaminsky & Hites, 1984).

Els fangs contaminats interactuen fortament amb molts organismes de la xarxa tròfica fluvial. A més, aquests residus acumulats als fangs de l'embassament de Flix es troben sota l'efecte constant de les aigües del riu Ebre, que si bé no presenta uns cabals elevats al seu pas per aquesta localitat, en episodis de crescudes pot generar un risc important aigües avall per la mobilització de les restes contaminades abocades a la llera del riu.

2) Residus radioactius

Els radionúclids són un tipus d'isòtops que poden descompondre's per emissió de diverses partícules o per captura d'electrons orbitals. Aquells que es troben a la litosfera i no són nocius a causa de la seva inaccessibilitat, però que després d'un tractament industrial es concentren en forma de material residual emmagatzemant o abocat de manera no controlada al medi ambient es coneixen com TENORM (Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactivity Materials: <http://www.tenorm.com>). Aquests productes i/o residus d'alguns processos industrials donen lloc a concentracions elevades d'elements radioactius que provenen de la matèria primera (Grimalt et al., 2003).

Als fangs contaminats de l'embassament de Flix, s'han trobat quantitats importants de ^{210}Pb , ^{226}Ra i ^{238}U , arribant a concentracions màximes de 3500 Bq/kg, 9400 Bq/kg i 12000 Bq/kg, respectivament. Cal destacar que les activitats de referència a la zona es troben aproximadament a l'ordre dels 20 Bq/kg per aquests elements. Aquests nivells tant alts provenen de l'ús de la fosforita a partir de l'any 1973 per a la fabricació del fosfat bicàlcic. El material procedent del Marroc i del Sàhara conté un residu amb nivells elevats d' ^{238}U i per tant, també dels seus derivats de la descomposició radioactiva d'aquest element (^{226}Ra i ^{210}Pb , figura 1.11). En un estudi de la fosforita procedent del Marroc, es va determinar que les concentracions de les activitats específiques per aquests radionúclids eren de 1003 Bq/kg, 1406 Bq/kg i 1083 Bq/kg, respectivament (Carvalho, 1995). Les quantitats totals de radionúclids trobades als sediments de l'embassament de Flix són de l'ordre de $130\text{-}240 \cdot 10^9$ Bq per al ^{210}Pb , $220\text{-}420 \cdot 10^9$ Bq per al ^{226}Ra i $380\text{-}730 \cdot 10^9$ Bq per al ^{238}U .

La radioactivitat present a la fosforita utilitzada al llarg de tot el procés industrial dona lloc a una concentració dels nivells de radioactivitat als productes fosfòrics finals, als subproductes que es puguin generar i també als residus. Per això els materials descartats (i abocats al riu en el passat) resultants del procés de fabricació de fosfat bicàlcic tenen concentracions elevades dels elements radioactius que provenen de la roca original.

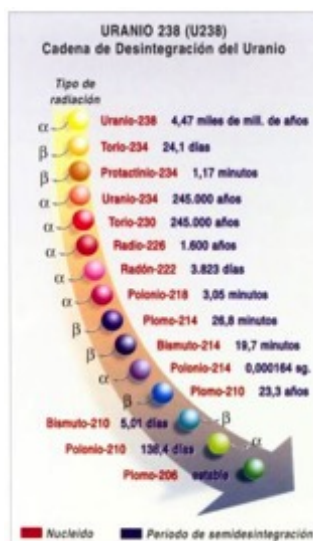


Figura 1.11. Cadena de desintegració de l' ^{238}U .
(Física Colegio Alberto Pérez. <http://fisica-alperit.blogspot.com.es>).

A més, aquests materials contaminants amb grans concentracions de radioactivitat natural a la llera del riu també es poden veure mobilitzats per períodes puntuals d'avingudes, generant una important dispersió i una potencial acumulació a les diverses xarxes tròfiques que es troben al tram baix del riu Ebre.

3) Metalls pesants

El darrer grup de contaminants que s'han trobat als fangs acumulats a l'embassament de Flix està compost per diferents grups de metalls pesants. Els dos metalls traça amb una influència més gran són el mercuri (Hg) i el cadmi (Cd), però altres metalls com l'arsènic (As), el zinc (Zn), el coure (Cu), el crom (Cr) o el níquel (Ni) també hi són presents. En total, les quantitats absolutes estimades als residus de Flix per a cada element són: 10-18 tones de Hg, 0.5-0.8 tones de Cd, 3-6 tones d'As, 22-40 tones de Zn, 8-14 tones de Cu, 42-76 tones de Cr i 10-20 tones de Ni. A més, les concentracions trobades a la capa de sediment en contacte amb els fangs contaminats eren les següents: 18-170 $\mu\text{g/g}$ de Hg, 0.7-8.4 $\mu\text{g/g}$ de Cd, 16-22 $\mu\text{g/g}$ d'As, 72-290 $\mu\text{g/g}$ de Zn, 34-96 $\mu\text{g/g}$ de Cu, 150-490 $\mu\text{g/g}$ de Cr (Soto et al., 2011). Les concentracions mitjanes per als principals elements van demostrar que eren molt més altes que les trobades naturalment en altres zones amb poca influència industrial. Així pel Hg, la concentració mitjana era de 49 $\mu\text{g/g}$,

pel Cd de 2.3 µg/g, pel Cr es va arribar fins als 210 µg/g i pel Ni 67 µg/g (Grimalt et al., 2005). La roca fosfòrica provinent del Marroc presenta uns nivells molt elevats d'alguns d'aquests metalls (Cd, Zn i Cr). Per tant, el seu ús en la producció del esmentat fosfat bicàlcic també va provocar un increment de les concentracions d'aquests metalls en els productes generats, els subproductes formats i als residus.

El mercuri és un dels elements més perillosos dins de la indústria del clor, ja que es troba en els càtodes utilitzats a les cel·les electrolítiques. Totes les indústries que utilitzen aquest sistema de producció tenen petits escapaments a través dels conductes de corrent de clor, a la sosa, als residus sòlids, líquids i fins i tot per emissions atmosfèriques. La planta clor-àlcali de Flix, com que utilitza cel·les de mercuri, té uns permisos especials atorgats per la CHE per abocar certes quantitats de mercuri de forma controlada i sota uns límits ben establerts. De totes formes, ja s'han donat episodis puntuals de contaminació acusada com el que es va produir al desembre de l'any 2001, quan arran d'un abocament indeterminat de mercuri a l'embassament de Flix, es va provocar la mort a uns 4000 peixos del tram baix del riu Ebre. L'Agència Catalana de l'Aigua (ACA) va arribar a trobar nivells elevats de mercuri a l'aigua a la zona d'Ascó (7.7 µg/L) fins i tot dos dies després de l'abocament. Aquests valors sobrepassen el límit legal per a l'aigua potable que estableix la legislació espanyola, fixat en 1 µg/L.

Quan es parla del mercuri cal diferenciar entre les formes inorgàniques del metall i els complexos orgànics que pot formar. La seva forma inorgànica clàssica (Hg^0) es pot oxidar i convertir-se en Hg^{2+} , que pot combinar-se amb altres anions i passar al medi aquós en forma de sal inorgànica. Aquests compostos queden retinguts als sediments de forma inactiva i no són perilloses per a la biota local. El problema recau en quant es formen complexos orgànics per l'efecte del contacte amb microorganismes que produeixen metilacions aeròbies o anaeròbies i faciliten la seva dissolució en aigua. Els complexos més estudiats són el metilmercuri (CH_3Hg^+) i el dimetilmercuri (CH_3HgCH_3). El primer es manté durant força temps en dissolució i és fàcil que s'incorpori al metabolisme dels organismes aquàtics. A més, es bioacumula amb facilitat i pot assolir concentracions molt altes als nivells tròfics superiors, tot causant efectes neurotòxics. En canvi el segon és molt volàtil i ràpidament s'escampa per l'atmosfera.

Varis estudis han trobat alts nivells de Hg i altres metalls traça a diferents organismes de les xarxes tròfiques de l'embassament de Flix i d'aigües avall (Carrasco et al., 2008 i Faria et al., 2010). Tots aquests organismes potencialment biomonitors han demostrat que aquests contaminants en forma de metalls pesants acumulats als fangs de Flix s'han biomagnificat a través de la xarxa tròfica i han impactat a tot l'ecosistema fluvial com a conjunt (Soto et al., 2011). En relació a la població local de Flix, un estudi de les concentracions de Hg en cabells

dels nens de 4 anys de la vila trobà que aquests tenien el doble de metilmercuri que els nens d'altres localitats (Montuori et al., 2006).

La gran quantitat de contaminants acumulats a l'embassament de Flix fa necessari conèixer quines són les seves concentracions en els organismes que conformen la xarxa tròfica fluvial. Aquests resultats són importants per conèixer l'impacte d'aquests compostos en el sistema fluvial i quina en pot ésser l'evolució amb la retirada dels residus.

1.3 Compostos orgànics persistents (COPs)

La substitució d'àtoms d'hidrogen per halògens dóna una gran estabilitat química a les molècules. En general, l'halogen més utilitzat ha estat el clor, tot donant lloc als compostos organoclorats, tot i que darrerament també s'estan emprant altres àtoms com el brom (compostos organobromats). Aquesta estabilitat és positiva per aconseguir certes propietats profitoses per a la nostra vida quotidiana (resistència al foc de certs materials, durabilitat major, etc.) però també té les seves contrapartides perquè fa que aquests compostos siguin persistents en el medi ambient.

Algunes de les propietats físiques i químiques d'aquests compostos fan que un cop emesos al medi ambient tinguin efectes greus. Alguns compostos organoclorats tenen efectes tòxics en la fauna i els humans. Hi ha tres característiques importants que fan aquests compostos especialment perillosos per a la fauna salvatge (Newton, 1979):

1. Són químicament estables i per tant difícilment degradables al medi ambient, això els dóna una alta persistència.
2. Tenen una gran tendència a bioconcentrar-se i a biomagnificar-se gràcies al seu elevat coeficient de partició octanol-aigua ($\log K_{ow}$).
3. En ser compostos semi-volàtils tenen una gran capacitat per a ser transportats molt lluny de l'àrea d'aplicació (Wania i Mackay, 1996).

Com a conseqüència d'aquestes característiques comunes, la majoria d'aquests compostos organoclorats formen part de les llistes de contaminants orgànics persistents publicades per organismes importants com el Programa del Medi Ambient de les Nacions Unides (UNEP-GC Decisió 18/32), la Comunitat Europea i l'Agència de Protecció del Medi Ambient (EPA) dels Estats Units.



Com a resultat de les emissions al medi ambient al llarg de varies dècades per part de l'ésser humà, els COPs es troben actualment distribuïts per moltes zones del planeta (fins i tot en aquelles on mai s'han utilitzat). Aquesta contaminació extensiva també inclou els elements de la dieta i ha donat lloc a una exposició sostinguda per a moltes espècies, incloent els humans, per períodes de temps que inclouen generacions. Això ha donat lloc a una combinació d'efectes crònics i aguts.

A més, en no ser solubles en aigua, els COPs s'absorbeixen ràpidament en els teixits grassos (bioacumulació). D'aquesta forma, les concentracions poden magnificar-se a mesura que ens enfilem per la xarxa tròfica fins a 70000 vegades la concentració base. Els organismes situats a dalt de tot de la cadena alimentària com els peixos, els ocells migradors, alguns mamífers i els humans tenen les concentracions més altes. Quan viatgen, els contaminants també es transporten amb ells i com a conseqüència de tot això, s'han pogut trobar COPs en persones i animals que viuen en regions com l'Àrtic, a milers de quilòmetres de les fonts d'emissió majoritàries d'aquests compostos.

Entre els efectes específics que poden generar els COPs es troben el càncer, al·lèrgies i hipersensibilitat, dany als sistemes nerviosos, desordres reproductius i disrupcions al sistema immunològic. Tot això pot afectar greument al sistema hormonal i a la reproducció tot generant problemes greus per aquell organisme.

L'any 2001, es va aprovar el document oficial de la Convenció d'Estocolm per a contaminants orgànics persistents (<http://www.pops.int>). Aquest tractat té un caràcter global per protegir la salut humana i el medi ambient d'aquells compostos químics que romanen intactes al medi ambient durant llargs períodes de temps, es distribueixen àmpliament a nivell geogràfic, s'acumulen als teixits grassos dels humans o la biota, i que tenen efectes adversos per la salut humana o el medi ambient. Com a resposta a aquest problema global la Convenció d'Estocolm va entrar en vigor finalment a l'any 2004 tot demanant a totes les parts firmants que s'havien d'aplicar mesures per eliminar o reduir l'emissió de COPs al medi ambient.

Inicialment es van identificar 12 COPs que podien causar problemes adversos a l'ésser humà i els ecosistemes, tot classificant-los en tres grans grups segons el seu origen o ús principal:

- Pesticides (aldrin, clordà, DDT, dieldrina, endrina, heptaclor, mirex i toxafè)
- Productes químics industrials (PCBs)
- Subproductes (HCB, PCDD i PCDF)

Als darrers anys s'ha aprovat la inclusió de nous compostos en aquesta llista. Així entre els anys 2009 i 2010 es van afegir 9 compostos més que complien els requisits necessaris. Tot seguint la mateixa classificació en tres grans grups, els compostos nous són:

- Pesticides (clordecona, α -HCH, β -HCH, γ -HCH)
- Productes químics industrials (HBB, TBDE/PeBDE, HxBDE/HpBDE i PFOS/PFOSF)
- Subproductes (PeCB)

De forma regular es van afegint compostos nous sota supervisió per decidir si s'inclouen o no al text. El Comitè encarregat de la revisió dels COPs avalua les propostes i recomana la inclusió a les parts firmants del Conveni d'Estocolm. En aquesta tesi s'han analitzat les concentracions trobades en diverses matrius ambientals per als compostos resumits a la taula 1.2.

Taula 1.2. Grups de compostos analitzats per aquest treball.

Clorobenzens (PeCB, HCB)
PCBs (PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-180)
DDTs (<i>o,p'</i> - DDT, <i>p,p'</i> - DDT, <i>o,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDE, <i>o,p'</i> -DDD, <i>p,p'</i> -DDD)
HCHs (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH)
PCEs (PeCE, α -HxCE, (Z)- β -HxCE, (E)- β -HxCE, (Z)- α,β -HpCE, β - β -HpCE, (E)- α,β -HpCE, OCE)

1.3.1 Els clorobenzens (PeCB i HCB)

Són un grup de compostos cíclics aromàtics en els que un o més àtoms d'hidrogen de l'anell de benzè han estat reemplaçats per un àtom de clor (figura 1.12). La fórmula molecular genèrica és $C_6H_{(6-n)}Cl_n$, on $n=1-6$.

El pentaclorobenzè (PeCB) és un compost generat com a subproducte durant la fabricació de dissolvents organoclorats i ha estat estudiat recentment pel comitè d'examen dels contaminants orgànics persistents, dins del PNUMA (Programa de les Nacions Unides per al Medi Ambient), com a producte candidat a la inclusió dins del Conveni d'Estocolm que determina la llista de Compostos Orgànics Persistents (POPs). Finalment es va aprovar la seva inclusió durant els anys 2009 i 2010.

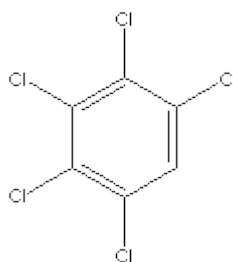


Figura 1.12. Estructura química del pentaclorobenzè

Anteriorment el PeCB s'utilitzava com a component de productes amb PCBs, com a accelerador de tints i com a intermediari químic. Actualment entra en el medi ambient, principalment com a subproducte de la combustió incompleta de materials orgànics que contenen clor. És moderadament tòxic per als éssers humans i no està classificat com a carcinogen tot i que la Unió Europea el va classificar com a substància molt tòxica per als organismes aquàtics.

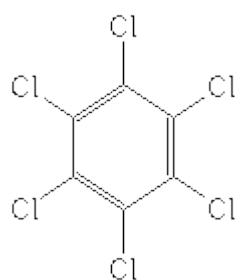


Figura 1.13. Estructura química de l'hexaclorobenzè

D'altra banda, el compost més estudiat i conegut és l'hexaclorobenzè (HCB). Aquest producte organoclorat es va introduir per primer cop al 1933 com a fungicida per a llavors (figura 1.13). Es creu que l'ús agrícola de l'HCB va dominar les emissions d'aquest compost entre els anys 1950 i 1960. Les estimacions globals de producció arriben al seu pic màxim a mitjans dels anys 70 amb valors de 1000 i 2000 tones a l'any (Courtney, 1979). S'ha determinat que s'han arribat a produir més de 100000 tones a nivell planetari d'aquest compost. De totes formes, la producció d'HCB ha disminuït com a resultat de la reducció en el seu us i l'aplicació de regulacions específiques (Barber et al., 2005).

La utilització àmplia que va tenir com a fungicida durant la segona part del segle XX, va donar lloc a una gran intoxicació a Turquia entre els anys 1955 i 1959 per la seva ingestió en cereal tractat amb aquest producte perquè era per llavor de sembra i no per consum humà. Equivocadament es va utilitzar per a fer pa i el consum directe va provocar un brot de porfíria en humans. Més de 3000 persones es van veure afectades i es va convertir en la intoxicació aguda més important de la història causada per un producte organoclorat. Altres estudis també l'han relacionat amb càncer de tiroides i teixit conjuntiu (Grimalt et al., 1994). En alguns països també s'utilitzà com a compost de base dins de la indústria química però la seva importància ha anat disminuint amb el pas del temps. Actualment la seva distribució àmplia pel planeta s'explica per la seva formació com a producte secundari (subproducte) en la síntesi de dissolvents organoclorats (Jacoff et al., 1986) i la incineració de residus. Les emissions actuals són un 95% més baixes que les de 1970 amb una clara disminució a partir dels anys 80 a nivell Europeu (Pacyna et al., 2003). La prohibició de l'HCB per usos agrícoles als anys 70 va eliminar la font d'emissió principal tot arribant a una disminució molt suau durant els anys 90.

Actualment no hi ha una font d'emissió dominant a nivell global (Bailey, 2001). Entre les seves característiques més importants destaca la seva solubilitat elevada en lípids ($\log K_{ow}=3.03-6.42$), persistència i toxicitat. Això permet que tingui una taxa de bioacumulació elevada entre els éssers vius.

1.3.2 Policlorobifenils (PCBs)

Aquests compostos constitueixen una sèrie de 209 molècules, anomenats congèneres, on entre un i deu àtoms de clor substitueixen els àtoms d'hidrogen d'un grup bifenil (figura 1.14). La seva fórmula general és $C_{12}H_{(10-n)}Cl_n$, $n=1-10$.

Els congèneres es diferencien segons el grau de cloració de la molècula i la posició de l'àtom de clor. El criteri de nomenclatura emprat per la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemists) es basa en un sistema de numeració sistemàtica proposada per primer cop per Ballschmiter i Zell (1980). Posteriorment els propis autors van proposar alguns canvis i finalment s'hi van aplicar algunes modificacions (Guitart et al. 1993). En aquest treball s'han estudiat els set congèneres més abundants a les mostres biològiques degut a la seva presència a les mescles comercials. Sovint se'ls anomena els "PCBs indicadors" (Bachour et al., 1998). La taula 1.3 en resumeix el número de clors i la seva nomenclatura.

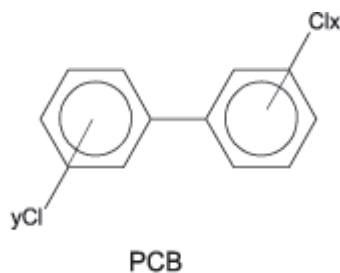


Figura 1.14. Estructura química dels policlorobifenils

Taula 1.3. Nomenclatura Ballschmiter i Zell (BZ) i posició dels àtoms de clor dels congèneres estudiats.

Nomenclatura BZ (1980)	28	52	101	118	138	153	180
Posició dels àtoms de clor	2,4,4'	2,2',5,5'	2,2',4,5,5'	2,3',4,4',5	2,2',3,4,4',5'	2,2',4,4',5,5'	2,2',3,4,4',5,5'

Els PCBs no es produeixen de forma natural, és per això que se'ls inclou dins dels productes sintètics creats per l'ésser humà. Els primers estudis que van trobar nivells elevats d'aquests compostos en diversos organismes vius són de finals de la dècada dels seixanta (Jensen et al, 1969). Els PCBs menys clorats són més fàcils de degradar i normalment no es troben en concentracions altes en els organismes vius. En augmentar el número de clors, augmenta la persistència, i per tant trobem que les distribucions d'aquests compostos en els organismes estan enriquides en els congèneres més pesants. La persistència també depèn de la posició que els àtoms de clor ocupen dins la molècula. Així, els PCBs que tenen almenys un o dos àtoms de clors en la posició *orto* (les posicions 2, 2', 6 i 6') són més persistents (Bernes 1998). La persistència elevada i sobretot els índexs elevats de la constant de partició octanol-aigua ($\log K_{ow}$ entre 4,1 i 9,60 (Erickson 1992)) faciliten que siguin compostos altament bioacumulables en els organismes vius.

Taula 1.4. Principals productors mundials de PCBs (en tones) (Breivick 2002).

Productor	País	Inici	Final	Quantitat	%	Referència
Monsanto	EEUU	1930	1977	641246	48.4	de Voogt and Brinkman (1989)
Bayer AG	Alemanya Oriental	1930	1983	159062	12.0	de Voogt and Brinkman (1989)
Orgsteklo	URSS (Rússia)	1939	1990	141800	10.7	AMAP (2000)
Prodelec	França	1930	1984	134654	10.2	de Voogt and Brinkman (1989)
Monsanto	Regne Unit	1954	1977	66542	5.0	de Voogt and Brinkman (1989)
Kanegafuchi	Japó	1954	1972	56326	4.2	Tatsukawa (1976)
Orgsintez	URSS (Rússia)	1972	1993	32000	2.4	AMAP (2000)
Caffaro	Itàlia	1958	1983	31092	2.3	de Voogt and Brinkman (1989)
S.A. Cros	Espanya	1955	1984	29012	2.2	de Voogt and Brinkman (1989)
Chemko	Antiga Txecoslovàquia	1959	1984	21482	1.6	Schlosserová (1994)
Xi'an	Xina	1960	1979	8000	0.6	Jiang et al. (1997)
Mitsubishi	Japó	1969	1972	2461	0.2	Tatsukawa (1976)
Electrochemical Company	Polònia	1966	1970	1000	<0.1	Zulkowski et al. (2003)
Zaklady Azotowe	Polònia	1974	1977	679	<0.1	Falandysz (2000)
Geneva Industries	EEUU	1971	1973	454	<0.1	de Voogt and Brinkman (1989)
Total	Mundial	1930	1993	1325810	100	

L'inici de la producció de mesclades comercials de PCBs començà el 1881. Schmidt i Schultz foren els seus creadors i es van començar a comercialitzar cap a finals de la dècada dels anys trenta. Sovint aquestes barreges anaren amb altres compostos policlorats, conegudes amb noms comercials com Aroclor[®], Clophen[®], Pyralene[®], etc. La taula 1.4 resumeix els principals productors mundials de PCBs (Breivick 2007). Les propietats d'aquestes mesclades van permetre el

seu ús com a fluids dielèctrics en transformadors, fluids de transferència de calor o hidràulics, com a olis lubricants i com additius d'altres productes com els pesticides, les pintures, papers i fins i tot plàstics. En l'actualitat el seu ús està prohibit i només es mantenen en equips antics tot portant-ne un control d'eliminació quan s'acabi la vida útil del producte. Les legislacions internacionals, fonamentalment el conveni d'Estocolm, han ajudat a reduir-ne la seva presència en el medi ambient des de fa uns quants anys.

La toxicitat dels PCBs depèn de la posició dels àtoms de clor i el seu nombre. Les posicions *orto* dificulten la rotació dels anells. Els PCBs que no tenen cap àtom de clor en posició *orto* s'anomenen coplanars i la resta no-coplanars. Els coplanars són coneguts com *dioxin-like PCBs* perquè actuen de forma similar a les dioxines i tenen una toxicitat comparable a aquestes.

A finals dels anys seixanta (Japó, 1968) i anys setanta (Taiwan, 1979) es van produir problemes de contaminació d'olis d'arròs per PCBs i van aparèixer problemes a les poblacions afectades fins i tot anys després de la seva contaminació. Així es va observar que a dosis altes de PCBs hi ha efectes de toxicitat aguda tot donant lloc a lesions dèrmiques, oculars i desordres respiratoris. Contràriament, a dosis baixes però perllongades relacionades amb la dieta apareix una toxicitat d'efectes crònics (Erickson, 1992) que comporta pèrdues de pes, atrofies, desordres a la resposta immunitària, hepatotoxicitat, porfíria, cloracné, carcinogènesi, teratogènesi i desordres reproductius.

1.3.3 Diclorodifeniltricloroetà i metabòlits (DDTs, DDEs i DDDs)

El DDT és un insecticida que s'ha aplicat en forma extensiva. És un producte sòlid de color blanc cristal·lí, sense gust i pràcticament sense olor. Va ser sintetitzat per primer cop el 1874 per Othmar Zeidler tot i que no va ser fins el 1939 que se'n van descobrir les seves propietats com a biocida per part de Paul Müller (Premi Nobel de medicina el 1948). En tenir una toxicitat aguda molt baixa en organismes superiors, s'aplicà massivament a l'agricultura a partir dels anys 40 com la gran solució contra les plagues d'insectes. Així es van aplicar fins a 100000 Tm de DDT (Voldner i Li, 1995). Durant la Segona Guerra Mundial el DDT també es va utilitzar per a controlar poblacions de mosquits, coneguts vectors de malalties com la malària. La seva eficàcia en el control de plagues va estendre el seu ús a nivell quotidià, però cap als anys 50 es van començar a veure efectes nocius sobre la fauna, sobretot peixos i aus. La raó de l'aparició d'aquests efectes era la capacitat acumulativa del DDT i la seva persistència en l'ambient (Timbrell 2005). Així, a partir dels anys 70, apareixen les primeres regulacions a Nordamèrica i Europa. Aquestes acaben amb la prohibició del seu ús per la seva persistència, capacitat de bioacumulació, evidència mutàgena del *p,p'*-DDT i la resistència que alguns insectes



començaven a donar després de certes aplicacions (Carson, 1962). Actualment el seu ús està restringit per a solucionar problemes de salut pública (prevenir malalties com la malària) o bé com a producte intermedi en la síntesi del dicofol (UN/ECE 1999) (Grimalt et al 2003). Generalment el terme DDT ($C_{14}H_9Cl_5$) es refereix a l'isòmer *p,p'*-DDT (1,1'-(2,2,2-tricloretilèndie)-bis-(4-clorobenzè) que és el compost predominant del producte tècnic (taula 1.5).

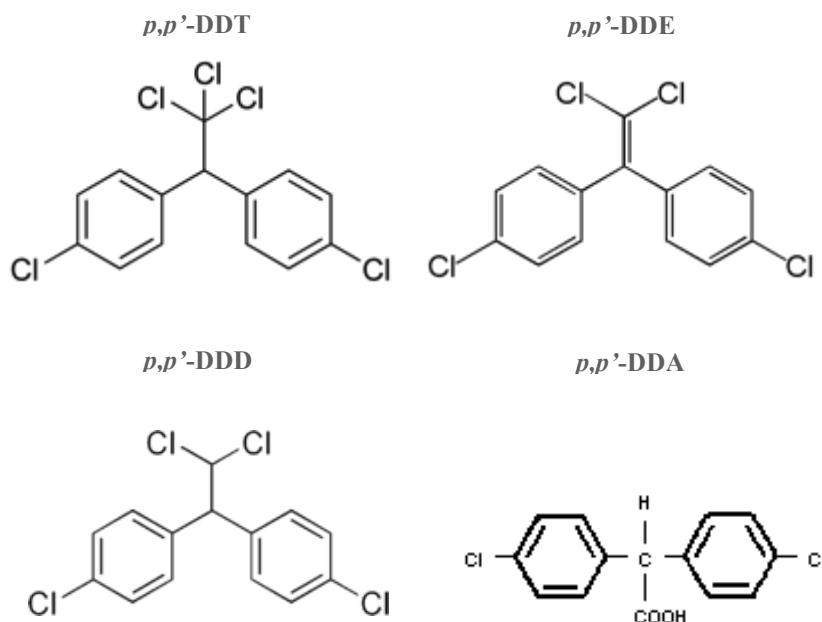


Figura 1.15. Estructura del *p,p'*-DDT i els seus metabòlits *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD i *p,p'*-DDA.

Taula 1.5. Percentatge relatiu de cada metabòlit dins el producte comercial DDT (Niesink et al. 1996).

Metabòlit	Percentatge (%)
<i>p,p'</i> -DDT	77.1
<i>o,p'</i> -DDT	14.9
<i>p,p'</i> -DDE	4.0
<i>o,p'</i> -DDE	0.1
<i>p,p'</i> -DDD	0.3
<i>o,p'</i> -DDD	0.1
Altres	3.5

El DDT i els seus metabòlits (figura 1.15) són molt solubles en lípids i tendeixen fàcilment a ser assimilats pels organismes vius, que els retenen en els teixits adiposos de forma estable (com que contenen clor són resistents a la degradació metabòlica en animals i altres organismes vius) (Bernes 1998), de manera que s'acumulen durant un temps llarg, fins i tot anys. Aquesta estabilitat també els ha fet romandre en sòls i sediments tot convertint-se així en fonts d'exposició a llarg termini. El DDT es degrada en el sòl (per a eliminar-ne el 95% poden caldre

entre 5 i 20 anys) i en alguns animals. Amb el temps es van alliberant des del teixit adipós cap a la sang i d'aquí passa a altres òrgans, on poden provocar efectes adversos (Timbrell 2005).

S'ha observat que la major fracció del *p,p'*-DDT absorbit pels organismes es metabolitza a poc a poc a *p,p'*-DDE, que és encara més persistent, i la forma principal en què s'emmagatzema en els teixits i òrgans dels organismes vius. Una altra part es transforma en *p,p'*-DDD, que després es metabolitza a *p,p'*-DDA. Aquest darrer és més soluble i s'excreta a través de l'orina (Heberer i Dünbnier 1999). Segons el procés de descomposició que segueixi la molècula de *p,p'*-DDT, també es generen quantitats importants dels metabòlits minoritaris *o,p'*-DDT; *o,p'*-DDE i *o,p'*-DDD. En general, les concentracions trobades d'aquests compostos al medi ambient i als organismes vius solen ser baixes.

1.3.4 Hexaclorociclohexans (HCHs)

Són un grup d'isòmers de l'1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexà amb fórmula empírica $C_6H_6Cl_6$. Els HCHs van ser sintetitzats per primer cop l'any 1825 per M. Faraday. Quasi un segle més tard, l'any 1912, van der Linden va aconseguir quatre dels isòmers d'aquest compost però no va ser fins al 1942 que se'n van descobrir les seves propietats insecticides. En total existeixen 8 isòmers possibles dels quals per a la majoria d'estudis ambientals se n'analitzen quatre: l'alfa (α), el beta (β), el gamma (γ) i el delta (δ) (figura 1.16). La diferent orientació (*axial/equatorial*) dels àtoms de clor a l'anell ciclohexànic dona lloc a diferents propietats físico-químiques dels isòmers que influeixen en la seva solubilitat i persistència. En general, la degradació augmenta amb el número d'àtoms de clor en posició *axial*, és a dir perpendicular a l'eix. En mostres ambientals doncs, els isòmers més comuns són l' α , el β i el γ , essent l'isòmer β el predominant en fluids biològics gràcies a aquesta configuració equatorial que el fa molt soluble en lípids. Tots els isòmers excepte el β mostren una solubilitat alta en aigua i una pressió de vapor moderada en comparació amb altres pesticides organoclorats. Així els hexaclorociclohexans s'acostumen a trobar en fase gasosa o dissolta a l'aigua, però rarament associats a partícules.

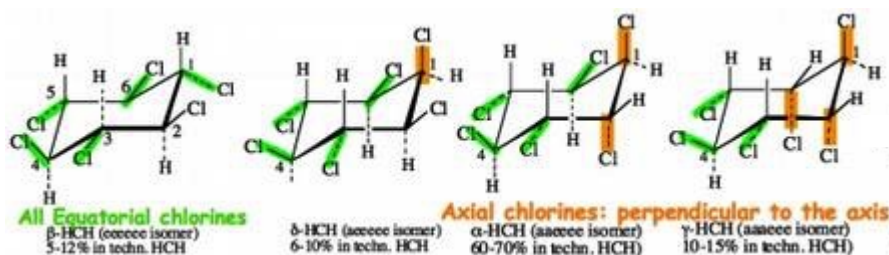


Figura 1.16. Estructures dels 4 isòmers estudiats de l'hexaclorociclohexà (HCH), ordenats per la seva estabilitat termodinàmica (d'esquerra a dreta).

(http://www.eawag.ch/organisation/abteilungen/umik/schwerpunkte/gruppe2/hch_degradation/index).

L'HCH es produeix a escala comercial per la cloració fotoquímica del benzè. El producte tècnic presenta la composició següent: α -HCH (60-70%), β -HCH (5-12%), γ -HCH (10-15%), δ -HCH (6-10%) i altres quantitats menors d'altres isòmers. De tots aquests, només el γ -HCH té propietats insecticides. La mescla fortament enriquida en aquest isòmer es comercialitza com a insecticida vaporitzable amb el nom de lindà (Walker et al. 1999). Aquest producte s'empra universalment com a substitut del DDT quan aquest es va prohibir. Actualment l'ús de la barreja comercial d'HCH està prohibida a molts països. A més, l'isomer γ -HCH pur (lindà) està inclòs dins de l'annex A (productes a ser eliminats) a la llista de COPs de la Convenció d'Estocolm.

L'exposició crònica a aquests isòmers s'ha relacionat amb problemes immunològics i neurològics en humans i amb càncer de fetge en rates i ratolins (Willet et al, 1998).

1.3.5 Policloroestirens (PCEs)

Són compostos químics formats per una molècula d'estirè (Figura 1.17) que pot tenir entre 1 i 8 dels àtoms d'hidrogen substituïts per àtoms de clor. La fórmula empírica és $C_6H_5CH=CH_2$. Es tracta de compostos que mai s'han fabricat directament per a un determinat ús. Es formen com a subproductes en aquells processos que combinen el carbó i el clor a temperatures elevades (Kuehl 1981) i per tant són comuns en plantes clor-àlcali. En especial es poden generar fàcilment en aquelles plantes que usen ànodes de grafit o les que treballen amb elèctrodes d'aquest material (Kaminsky & Hites 1984). També es poden generar en plantes productores de dissolvents clorats i en totes aquelles que tinguin processos de combustions a temperatures altes amb productes que contenen clor. Per exemple la contaminació trobada als fiords Noruecs a la dècada dels 70 té el seu origen en la formació de PCEs com a subproductes del procés industrial que convertia òxid de magnesi a clorur de magnesi (Lunde & Bjorseth 1977).

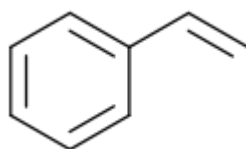


Figura 1.17. Molècula d'estirè.

La identificació inicial d'aquests productes es va dur a terme a finals dels anys 60. En diverses mostres d'ocells es va trobar un compost no descrit anteriorment que tenia 8 àtoms de clor i número de massa 376 (Koeman et al., 1969). Després es va descobrir que es tractava de la molècula d'octacloroestirè (OCE) (ten Noever de Brauw & Koeman, 1972/1973). Al llarg de la

dècada següent, es van anar identificant altres cloroestirens (habitualment els més clorats) tan en mostres de peixos com d'ocells. En general es van identificar barreges formades per diferents compostos (hexa-, hepta- i octa-) derivats de la cloració de molècules d'estirè (PCEs) en peixos tan d'Europa com de Nord Amèrica (Kuehl et al., 1976; Lunde & Ofstad 1976; Reichel et al., 1977; Ofstad et al., 1978; Bester et al., 1998).

Donada la importància del descobriment d'aquests compostos, van aparèixer els primers estudis toxicològics d'aquests contaminants en animals (Tarkpea et al., 1985). Els resultats certificaven que hi havia una relació directa entre la dosi aplicada i les concentracions trobades en greix i fetge en rates. A més, també se suggeria que l'OCE podia generar canvis histològics i bioquímics en animals (Chu et al., 1982). De totes formes, els primers estudis asseguraven que la contaminació era molt localitzada en regions amb grans zones industrials però no trobaven que aquests compostos estiguessin àmpliament distribuïts (Ernst et al., 1984). També es va determinar que un dels focus emissors més importants (bàsicament per l'OCE) consistia en el que es coneixia com "àrees de combustió marina" a la zona del Mar del Nord (Lohse 1988). L'any 1992, Lommel et al., van publicar un treball on ja es trobaven concentracions d'OCE detectables en mostres de sang humanes en els habitants de les rodalies del riu Elba (Alemanya).

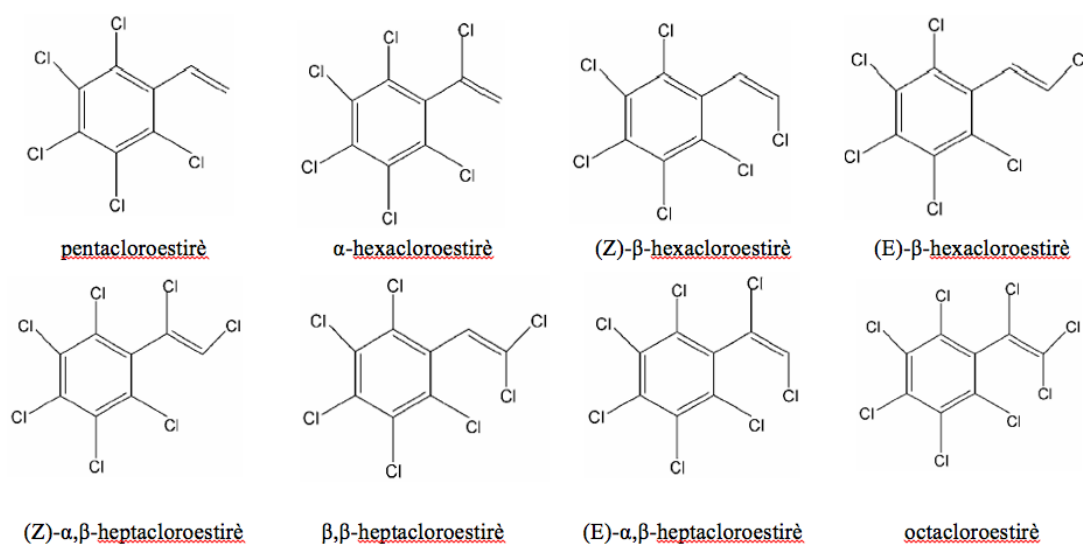


Figura 1.18. Molècules analitzades dels cloroestirens (adaptat de Ramdahl et al., 1986 i Coelhan et al., 2000).

Tot i que els PCEs no s'hagin produït mai per una finalitat industrial concreta, aquests compostos es troben al medi ambient. Així els compostos més abundants es mostren a la figura 1.18. Aquests són els compostos que han estat estudiats en aquesta tesi. En general, els congèneres que tenen major potencial de bioacumulació són els que tenen més àtoms de clor (hepta- i octa-). Alguns autors han trobat correlacions positives entre les concentracions de

compostos més comuns com l'HCB i l'OCE, tot suggerint que en ser tots dos subproductes de processos industrials poden tenir orígens comuns (Chu et al., 2003).

1.4 Les xarxes tròfiques aquàtiques: conceptes de bioacumulació, bioconcentració i biomagnificació

La xarxa tròfica és un concepte complex que inclou un conjunt de cadenes alimentàries d'un ecosistema concret. Sovint s'utilitza per representar les relacions alimentàries que hi ha entre els organismes i explica com circula la matèria i l'energia entre ells. Segons els vincles alimentaris que es constitueixen entre els diferents organismes presents a l'ecosistema es parla de dues categories principals:

- Els productors són aquells organismes que poden transformar la matèria inorgànica en orgànica gràcies a l'energia de la llum del sol o de reaccions d'oxidació.
- Els consumidors són els animals, i es classifiquen en tres nivells:
 - o Els consumidors primaris o herbívors, que s'alimenten dels productors.
 - o Els carnívors primaris o consumidors secundaris, que s'alimenten dels herbívors.
 - o Els carnívors secundaris o consumidors terciaris, que s'alimenten dels carnívors primaris o consumidors secundaris.

Amb aquestes relacions es generen múltiples seqüències diferents per les quals un organisme s'alimenta del precedent i és devorat per un altre, tot generant les cadenes alimentàries. Aquestes línies classifiquen els nivells tròfics en funció de la seva forma d'obtenir matèria i energia i cadascun dels organismes presents desenvolupen papers molt importants en tot el procés. D'aquí sorgeix la importància de l'estudi de les concentracions de contaminants orgànics persistents al llarg de tota la xarxa tròfica d'un ecosistema.

1.4.1 Xarxa tròfica fluvial

Els llacs o embassaments són ecosistemes fluvials terrestres que poden contenir diferents xarxes tròfiques amb nivells tròfics diversos. Els depredadors que ocupen cadascun d'aquests nivells mostren una transició dels compostos contaminants des dels nivells més baixos cap als més alts, acompanyats d'intercanvis entre la zona del bentos litoral i els entorns més pelàgics. La figura 1.19 ens mostra un esquema d'una xarxa tròfica reduïda en un sistema fluvial com el que es troba a l'embassament de Flix. A part dels individus representats a la figura, en el nostre cas també s'han analitzat mostres de sediment i biofilm, silurs, rutils i gardins. Tot això conforma

una xarxa tròfica complexa amb diversos organismes que habiten directament en contacte o estan estretament lligats als sediments contaminats de l'embassament.

A la xarxa fluvial específica de l'embassament de Flix, tenim una matriu abiòtica molt contaminada (els sediments). Els productors primaris que utilitzen l'energia solar per produir els nutrients que necessiten són el biofilm (estretament lligat amb el sediment lacustre), el fitoplàncton i els macròfits. En un segon nivell tenim els organismes que s'alimenten directament d'ells. Els consumidors primaris són el zooplàncton, el musclo zebra, el cranc de riu americà i alguns peixos com la gambusia, el rutil i el gardí. Un graó més amunt, tot actuant com a consumidors secundaris hi trobem la carpa (molt bentònica) i el silur (depredador molt gran) que representen als peixos. A més, s'han estudiat també mostres d'agró roig (au pescadora). Aquests organismes, s'alimenten bàsicament dels consumidors primaris i es troben al capdamunt de la xarxa tròfica local de l'embassament de Flix.

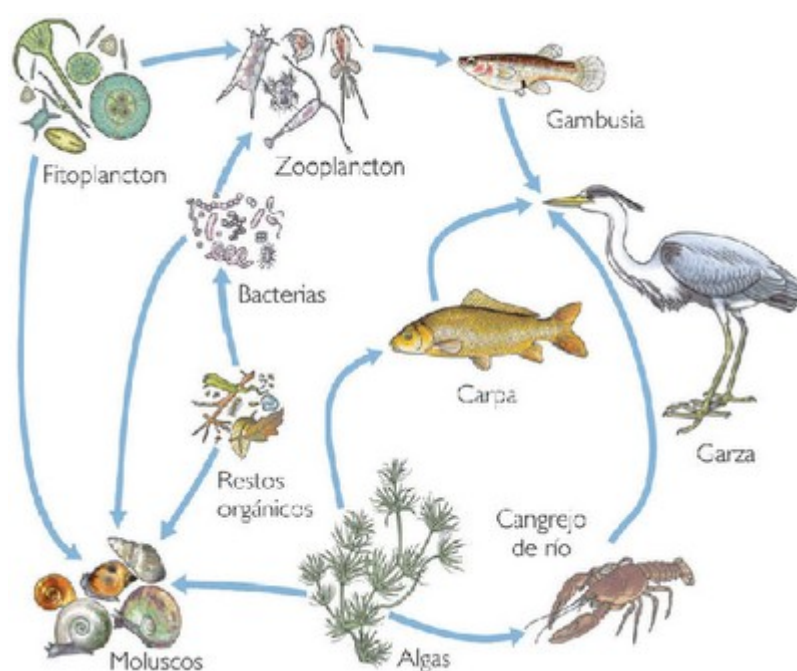


Figura 1.19. Esquema d'una xarxa tròfica d'un sistema fluvial.

(Lagos y Lagunas de México. <http://lagosylagunasdemexico.blogspot.com.es>).

La complexitat d'una xarxa tròfica fluvial pot venir donada per varis factors. Segons la quantitat de nutrients i d'espai disponible es pot trobar més o menys diversitats d'espècies i nivells tròfics. A l'embassament de Flix, com que es troba dins del riu Ebre, hi ha unes condicions adequades de cabal i volum d'aigua que generen una complexitat elevada entre les relacions que s'estableixen dins la xarxa tròfica. Això serà important a considerar quan es realitzin les interpretacions dels resultats dels compostos orgànics persistents trobats a cada organisme.

En llacs i ambients remots, a part de l'efecte del volum i el cabal del sistema fluvial, la temperatura i la diversitat d'aliments fa que les xarxes tròfiques redueixin la seva mida i s'adaptin al seu entorn. En aquest tipus de xarxa tròfica és més adequat treballar directament amb els organismes situats a la part més alta de la cadena alimentària. Aquests solen ser depredadors i reflecteixen millor la contaminació de fons que té l'entorn.

La persistència, toxicitat, lipofilicitat, capacitat de bioacumulació i el transport a llargues distàncies són les propietats dels COPs que faciliten l'aparició d'efectes crònics als organismes al llarg de la seva vida, sobretot en aquells situats a les posicions tròfiques més elevades i a més poden afectar a generacions futures (Tillitt et al., 1992).

1.4.2 Bioacumulació, bioconcentració i biomagnificació

L'anàlisi del risc ambiental dels contaminants comença per conèixer la seva disponibilitat biològica en el medi. La bioacumulació defineix la capacitat dels organismes vius per acumular contaminants químics en el seu cos, directament a partir del medi (bioconcentració) o indirectament mitjançant l'alimentació (biomagnificació), fins assolir concentracions més elevades que les del medi ambient o els aliments. En general la bioconcentració es considera que és una propietat característica de compostos de constant de partició octanol-aigua ($\log K_{ow}$) baixa (Clark et al., 1990). En canvi, el grau de biomagnificació en peixos incrementa en compostos amb un $\log K_{ow}$ alt (Gobas et al., 1999; Catalan et al., 2004). El PCB-180 és la única excepció i es pot explicar per la baixa permeabilitat de membrana de les molècules més grans (Mackay et al., 1982). Tots aquests conceptes estan regulats per diversos factors com les propietats fisico-químiques dels compostos, la biodisponibilitat del compost, el control fisiològic del pròpi organisme, la biotransformació en altres productes, l'eliminació dels contaminants, el contingut lipídic dels teixits i les variacions intra- i interespecífiques i ambientals (Barron, 1990).

Les principals vies d'introducció d'una substància química en un organisme viu s'engloben en tres grans tipus. Es poden acumular a través de la respiració; pel contacte directe a través de qualsevol teixit (pell, escates, etc.) o mitjançant el sistema digestiu.

Les tres rutes d'exposició que presenten els organismes aquàtics són l'aigua, els sediments o la cadena tròfica. A l'embassament de Flix, en els nivells tròfics inferiors es poden trobar dues situacions clarament diferenciades. En primer lloc els organismes lligats estretament amb els sediments (biofilm) i per l'altra banda, aquells organismes més lligats a l'aigua (fitoplàncton i macròfits). Aquests organismes acostumen a bioconcentrar els contaminants per contacte directe amb el medi. Entre els consumidors primaris, també hi haurà més o menys influència de l'aigua,

del contacte amb els sediments o de la cadena tròfica segons les característiques concretes de cada espècie. Finalment, en els peixos, l'exposició directa a partir de l'aigua es produeix per l'intercanvi branquial mentre respiren, el contacte dèrmic directe i l'alimentació. L'absorció de productes químics presents en els sediments transcorre per contacte dèrmic directe i oral (ingestió seguida de l'absorció al tracte intestinal). Les rutes d'exposició a través dels sediments seran de menor o major importància segons sigui el comportament de l'espècie en qüestió, és a dir, la interacció que s'estableixi entre el peix i el medi aquàtic. En el cas de l'exposició a través de la cadena tròfica, cada espècie es comportarà de forma diferent segons els seus hàbits alimentaris.

Quan es realitza un quocient entre les concentracions trobades en un organisme i les que hi ha al compartiment ambiental que l'envolta es parla del factor de bioconcentració. En els organismes que habiten dins de l'aigua sovint s'utilitza només la concentració de la fase dissolta (partícules $< 0.4 \mu\text{m}$) perquè és la fracció química que està més biodisponible per als organismes. Segons les propietats del compost serà més o menys fàcil l'entrada del contaminant a l'organisme per difusió passiva o contacte directe. Els compostos més solubles en aigua tindran un efecte més gran en la bioconcentració (per exemple els HCHs).

Per entendre els patrons de bioacumulació dels compostos organoclorats als diferents nivells tròfics de l'embassament cal tenir en compte les múltiples interaccions que es donen entre tots els organismes que l'habiten. Degut a les seves propietats físico-químiques els COPs es biomagnifiquen, amb el que s'acostumen a trobar les concentracions més elevades als nivells tròfics superiors (figura 1.20). La biomagnificació s'expressa sovint com el quocient entre les concentracions de contaminants en un organisme i en la seva presa. La bioacumulació dels compostos amb elevades K_{ow} , que no es pot explicar a través de processos de difusió passiva, es descriu satisfactòriament en alguns casos a través de la ingestió de preses contaminades (Thomann 1989; Fisk et al., 1998). Després de varis estudis s'ha estimat que la biomagnificació és el mecanisme principal que regula la bioacumulació dels PCBs i DDTs en molts ecosistemes aquàtics (van der Oost et al., 1988, Metcalfe i Metcalfe 1997).

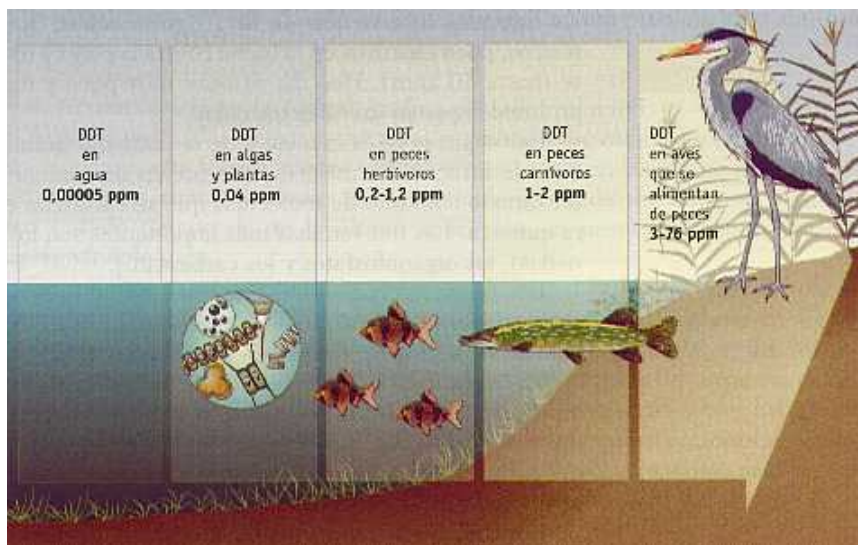


Figura 1.20. Biomagnificació del DDT a través de la xarxa tròfica (<http://slideshare.net>).

Estudis recents han calculat les mitjanes de temps de residència dels COPs dins dels peixos tot trobant-se valors que oscilen des de unes quantes setmanes (HCHs); un any (HCB i *p,p'*-DDE; i entre 2 i 3 anys (*p,p'*-DDT, PCB-28 i PCB-52) (Catalan et al., 2004). En el cas dels PCBs amb més àtoms de clor a la seva estructura s'han trobat temps de residència majors a la dècada (Catalan et al., 2004). La presència d'aquests contaminants pot significar una amenaça molt important pels organismes dels nivells tròfics superiors (Fisk et al., 2001; Boon et al., 2002).

1.5 Transport latitudinal dels COPs

Una de les característiques principals dels COPs és la seva capacitat de ser transportats a grans distàncies del seu focus original de contaminació. Com a conseqüència de les seves propietats físico-químiques, aquest grup de contaminants poden arribar a trobar-se en zones remotes on mai han estat utilitzats o s'han emprat en quantitats pràcticament insignificants. Als darrers anys, la detecció de COPs en àrees remotes on mai s'hi van produir o utilitzar demostra la importància del transport de llarga distància que poden patir aquests compostos. La seva distribució depèn de les característiques físico-químiques esmentades de cada compost.

En general, la major part dels COPs es troben retinguts en quantitats importants a les zones properes als punts d'emissió principals (zones temperades del planeta). El principal problema és que com a conseqüència de la seva semi-volatilitat, una part ha passat a l'atmosfera i s'ha transportat llargues distàncies fins arribar a zones remotes i fredes (Àrtic i Antàrtic). L'atmosfera és la via principal de transport de contaminants a distàncies llargues (Lohmann et

al., 2007), tan pel seu gran volum com per les velocitats que assoleixen les masses d'aire. De totes formes, els nivells de concentracions de COPs trobats als dos pols planetaris són diferents, i per tant, quan es parla de transport global cal tenir-ho en compte. Alguns estudis sobre la distribució global dels COPs han demostrat que existeixen concentracions més elevades sobre tot a l'hemisferi nord, i aquestes, s'han relacionat amb majors nivells d'industrialització en aquesta regió en relació amb l'hemisferi sud (Simonich & Hites, 1995; Breivick et al., 2002; Barber et al., 2005). A més a més, l'intercanvi de masses d'aire troposfèric a través de l'equador és limitat.

El transport de COPs a zones allunyades de les fonts de producció o focus emissors es modelitzà durant els anys 90 tot donant lloc als coneguts termes “*Global Distillation Effect*” i “*Cold Condensation*” (Wania & Mackay, 1993 i 1996). Amb aquests termes es va definir el procés mitjançant el qual molts dels COPs es podien transportar a través de l'atmosfera, tant en forma de vapor com adherits a les partícules d'aerosols, i condensar posteriorment al arribar a temperatures més baixes, pròpies de les latituds altes. L'efecte de la destil·lació global planteja la teoria de que a les latituds més baixes, les temperatures més temperades afavoreixen l'evaporació dels COPs des de la superfície de la terra i l'aigua, tot transportant-los fins a latituds amb menor temperatura on s'afavoreix la seva deposició per condensació freda (figura 1.21).

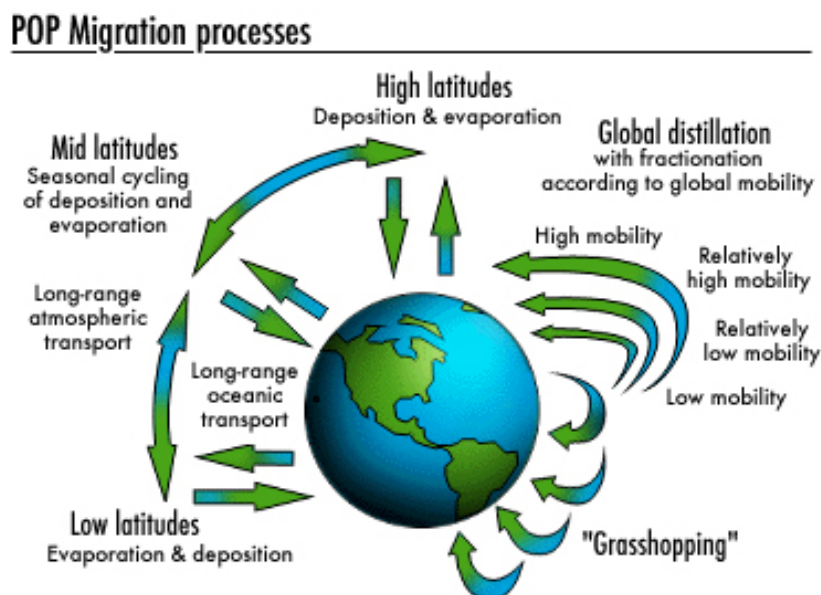


Figura 1.21. Mecanismes de transport latitudinals dels compostos orgànics persistents (COPs) segons el model de Wania i Mackay (1993).

(Greenpeace, 1999. “Down to Zero.” <http://archive.greenpeace.org/toxics/downtozero/POPS/exposure.html>).

En tot aquest model, s'utilitza el concepte “Grasshopping” per caracteritzar els salts o migracions dels COPs en trajectes més curts d'evaporació-transport-condensació depenent dels

canvis estacionals de temperatura des de les latituds més càlides en direcció a les més fredes. D'aquesta forma no es descriu el transport com un únic viatge de llarga distància entre les zones més properes a l'equador i els pols.

Aquest transport atmosfèric dels COPs es produeix entre dues fases, la gasosa i la particulada. La distribució de cada compost entre ambdues fases depèn de les propietats fisico-químiques de cadascú d'ells i de les condicions físiques pròpies de l'atmosfera, com ara la temperatura o la quantitat i composició de les partícules en suspensió. Com que es tracta de compostos lipofílics majoritàriament ($\log K_{ow}$ inferior a 4), és relativament fàcil que es produeixi una adsorció de COPs a les partícules atmosfèriques. A major valor de K_{ow} o menor pressió de vapor, més important serà aquest procés (Fernández et al., 2002 i 2003). A més, la mida de les partícules també influiran en la distància del possible transport, tot quedant-se en zones més properes aquelles que siguin més grans, mentre que les més petites i lleugeres podran viatjar llargues distàncies abans de dipositar-se.

Finalment, la vida mitjana del compost a l'atmosfera és la darrera característica que tindrà certa influència en la tendència de cada compost per arribar a distàncies allunyades dels focus emissors. En general, els HCHs i DDTs tenen una vida mitjana d'entre dies i setmanes un cop emesos a l'atmosfera, els PCBs s'estima que oscil·la entre les setmanes i els mesos, mentre que l'HCB pot romandre-hi durant alguns anys (Gramatica, 2001). De totes formes, un cop dipositats i bioacumulats a la biota aquests temps poden ser encara més grans (Catalan et al., 2004).

Els mecanismes de distribució dels COPs al medi ambient són molt complexos ja que hi intervenen diferents variables que determinen la seva dinàmica i destí final dins de cada ecosistema. Per això, un cop que el contaminant s'emet al medi ambient, entra en un cicle continu de canvis entre diverses matrius on també poden aparèixer algunes vies d'eliminació com la degradació fotolítica, química o biològica. Per tots aquests motius és molt important poder caracteritzar bé les concentracions de fons que es troben a les zones més remotes del planeta i estudiar-ne l'evolució temporal de cada un dels compostos orgànics persistents que s'hi acumulen. D'aquesta forma es poden determinar mesures d'aplicació a escala local i també global per evitar una major incidència dels COPs als diferents ecosistemes que suposadament es troben en zones remotes i aïllades de la contaminació.

Capítol 2

OBJECTIUS



Objectiu principal

Arran del descobriment dels residus contaminats acumulats en forma de sediments a l'embassament de Flix, es van realitzar treballs per caracteritzar-ne les concentracions de metalls, residus radioactius i COPs. Com a conseqüència de la constatació de la perillositat que aquests últims comporten per al medi ambient i l'ésser humà, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és avaluar la distribució que tenen aquests compostos organoclorats dins dels organismes que es troben en aquesta zona tan contaminada. L'estudi riu avall dels nivells de compostos organoclorats de tot el tram baix del riu Ebre permet determinar com aquests compostos afecten als organismes tant en zones molt contaminades com en zones allunyades del focus emissor.

Objectius específics

Per arribar a completar correctament l'objectiu principal ha estat molt important anar complint amb els objectius més específics que es detallen a continuació:

- a) Determinar els principals focus de contaminació per a la xarxa tròfica fluvial de l'embassament de Flix i els seus possibles efectes en el transport de COPs aigües avall. Així com estudiar les concentracions de COPs que es troben als primers nivells tròfics dins de l'embassament de Flix.
- b) Estudiar la bioacumulació de COPs en peixos a l'embassament de Flix i determinar les concentracions d'aquests organismes en el tram baix del riu Ebre per analitzar els efectes que poden ser generats pel transport de contaminants des de l'embassament fins al delta.
- c) Analitzar les concentracions de COPs en ous d'aus que nien al llarg del tram baix del riu Ebre com indicadors dels nivells de contaminació als depredadors.
- d) Amb els resultats dels tres objectius específics anteriors s'ha determinat el nivell de biomagnificació dels COPs dins de la xarxa tròfica completa de l'embassament de Flix.

General purpose

The present PhD thesis is devoted to evaluate what is the impact of the large amounts of organochlorine pollutants accumulated in the Flix water reservoir for the biota living in this reservoir and downstream. Accordingly, the work has been focussed on the study of the accumulation of the diverse organochlorine compounds in the organisms situated on top of the food web, e.g. fish and birds. In addition, the distributions of these pollutants in all main components of this food web have been analysed.

Specific objectives

- a) Determine how the different organochlorine compounds are distributed in the food web components of the Flix water reservoir and how these associations could have an effect in the transport of these pollutants downriver. Study concentrations of organochlorine compounds found at first levels of the local food web.
- b) Study of the bioaccumulation of the organochlorine compounds in fish from the Flix water reservoir and assessment of specific species dependences of the incorporation of these compounds into fish. Study of the concentration gradients of organochlorine compounds in fish living in the Flix water reservoir and downstream Ebro River, including main river and irrigation channels.
- c) Study of the concentrations of organochlorine compounds in bird eggs nesting along the last stretch of the Ebro River and assessment of the emissions of the chlor-alkali plant in migratory birds.
- d) Assessment of the biomagnification of organochlorine compounds within the food web of the Flix water reservoir.

Capítol 3

METODOLOGIA



3.1 Àmbit d'estudi: matrius analitzades i zones de recollida de mostra

Per a la realització d'aquesta tesi, s'han estudiat principalment mostres biològiques recollides al llarg de tot el tram comprés en els darrers 130 quilòmetres del riu Ebre. La única matriu abiòtica analitzada han estat els sediments recollits dins de l'embassament de Flix. Donada la complexitat de les xarxes tròfiques fluvials, primer s'ha treballat intensivament per determinar les espècies més rellevants que es podien trobar dins de l'embassament de Flix, i després s'han buscat les mateixes espècies, o en el seu defecte, espècies similars, a les altres localitats d'estudi per obtenir bones comparacions a nivell geogràfic.

Si bé la part central i més important de l'estudi s'ha basat en l'anàlisi de les concentracions de COPs dins de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix, també s'han emprat mostres d'altres localitats per completar els objectius fixats i analitzar la influència de l'embassament de Flix aigües avall del riu Ebre. Aquests punts de mostreig es troben dins de la mateixa conca del riu Ebre (Aiguabarreig, Riba-roja i les localitats situades aigües avall de Flix). Això ha implicat un esforç molt gran alhora d'establir i dur a terme les campanyes de mostreig per recollir tot tipus de mostres que permetessin estudiar-ne els nivells de concentracions de COPs i que, a més, poguessin aportar un valor afegit al comparar-les amb les trobades dins de l'embassament de Flix. Als següents sub-apartats es defineixen en detall, les matrius, espècies i tècniques d'obtenció de mostres, així com les zones de mostreig analitzades al tram baix de la conca del riu Ebre. Les diferents zones de mostreig descrites són aquelles d'on almenys s'ha obtingut alguna de les mostres analitzades.

3.1.1 Tram baix de la conca del riu Ebre

3.1.1.1 Matrius analitzades

Sediment

Com ja s'ha comentat a la introducció d'aquesta tesi, la bossa de fangs acumulada sota les aigües de l'embassament de Flix té un volum molt gran (entre 200000 i 360000 tones). Aquests sediments es troben submergits al marge dret de l'embassament i afecten a tota la comunitat d'organismes que habita la zona (figures 1.6 i 1.19). Els estudis previs ja han detallat que les concentracions dels COPs en aquests sediments i en zones del Delta són molt elevades (Risebrough et al., 1983; Grimalt et al., 1988; Amaral et al. 1996) i per això és important considerar aquesta matriu en l'estudi de la xarxa tròfica fluvial a l'embassament de Flix.



En aquesta tesi, l'anàlisi dels COPs presents als sediments s'ha realitzat com a mesura per tenir un nivell de base de les concentracions biodisponibles que es poden trobar de cada compost a l'embassament de Flix. Donat que en aquest cas es tracta del principal focus emissor d'aquests compostos a l'ecosistema fluvial principal (riu Ebre), els resultats obtinguts són molt importants a l'hora d'interpretar la resta de resultats trobats a tota la fauna riberenca o conjunt de xarxes tròfiques fluvials. Per això, aquesta ha estat la única matriu abiòtica recollida, però no per això amb menys significança, per entendre i avaluar la resta de resultats trobats a les diferents matrius biòtiques dels nivells tròfics superiors de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix (figura 3.1).



Figura 3.1. Sediment recollit a l'embassament de Flix

L'extracció del sediment s'ha realitzat mitjançant un instrument especial per obtenir *cores* lacustres (figura 3.2) basat en el *gravity core* que s'utilitza en campanyes de mostreig oceanogràfiques per extreure sediments marins. Aquest aparell reduït té l'avantatge de poder-se utilitzar des d'una embarcació petita a qualsevol punt. L'equipament està format per un material pesat que permet la caiguda de tot el sistema dins de l'aigua fins arribar a clavar-se de forma vertical sobre el substrat fangós del fons del riu. Un cop es comença a recollir l'instrument, es tanca una comporta automàticament de la part inferior del cilindre per evitar la pèrdua del sediment mentre puja per la columna d'aigua. D'aquesta forma, al arribar a la superfície de l'aigua, es pot extreure el *core* de sediment fàcilment sobre la barca.



Figura 3.2. Extracció dels *cores* dins de l'embassament de Flix

Un cop a terra, s'ha procedit a tallar els cilindres de sediment recollits en diversos punts (figura 3.3). Això s'ha realitzat fent talls en seccions per a cada *core*, i emmagatzemant cada secció com una mostra individual en vials de vidre de 20 ml que s'han desat a -20°C fins al seu posterior anàlisi química al laboratori.



Figura 3.3. Seccionament dels *cores* de sediment a terra.

Biofilm

El biofilm consisteix en una comunitat de microorganismes que es troben estructurats dins d'una matriu de polímers i que s'adhereix a una superfície viva o inert. La formació d'aquesta biopel·lícula s'inicia amb la unió de diversos microorganismes lliures flotants a una superfície a través de forces dèbils i reversibles. Si els colonitzadors no se'n separen ràpidament, llavors es poden quedar enganxats permanentment usant estructures més complexes d'adhesió cel·lular. Gràcies a aquests primers colonitzadors, després és més fàcil l'arribada d'altres cèl·lules perquè ja tenen llocs per adherir-se i es va generant la matriu que manté unit tot el biofilm.

Normalment el biofilm es troba en substrats sòlids submergits dins de l'aigua i poden arribar a formar capes flotants en superfícies líquides. Si tenen prou recursos disponibles, el seu creixement pot ser molt important i la biopel·lícula s'acaba observant a simple vista. En el cas del biofilm estudiat a l'embassament de Flix, aquest es trobava adherit al sediment del llit del riu i també a les roques i còdols de tots dos marges al seu pas per aquesta localitat. D'altra banda, també es van poder recollir mostres de biofilm que originalment es troba adherit a la llera del riu però que pateix fenòmens d'alliberament i es converteix en biofilm *flotant*. Les mostres de biofilm s'han obtingut en diversos punts dins de l'embassament de Flix. Per a l'obtenció de les mostres dels marges s'ha emprat un raspall especial amb les crineres metàl·liques per evitar la contaminació de les mostres. Realitzant un rascat de les roques amb biofilm adherit s'ha aconseguit suficient mostra per emmagatzemar en pots de vidre a -20°C per al seu posterior anàlisi al laboratori (figura 3.4). Per a les mostres *flotants* de la zona mitjana del riu, s'han recollit directament amb pots de vidre i després s'ha realitzat un buidat d'aigua abans d'emmagatzemar al congelador.



Figura 3.4. Mostres de biofilm recollides dels còdols i roques dels marges (esquerra) i també biofilm *flotant* recollit del centre de l'embassament de Flix (dreta).

De fet, el biofilm és un component important dins de les xarxes tròfiques de rius i corrents d'aigua ja que és aprofitat pels invertebrats aquàtics dels que s'alimenten molts peixos. A més,

en trobar-se en contacte directe amb els sediments contaminats de l'embassament, s'han considerat com un dels possibles focus emissors dins de l'embassament de Flix donat el seu contacte directe amb totes aquelles espècies que remouen o habiten la llera del riu.

El biofilm podria ser un dels mecanismes de mobilització riu avall de contaminants acumulats a Flix després de fenòmens de crescudes i avingudes d'aigua que poden provocar arrossegaments des del fons de la llera de l'embassament.

Fitoplàncton

Quan es parla de la comunitat planctònica d'un sistema aquàtic, sovint es diferencia entre el plàncton vegetal (fitoplàncton) i el plàncton animal (zooplàncton). El fitoplàncton analitzat per aquesta tesi s'entén com la fracció autòtrofa del plàncton. En general, la majoria dels constituents del fitoplàncton són d'una mida molt petita i no es poden veure a ull nu. En el nostre cas, les mostres recollides provenien del filtratge d'un determinat volum d'aigua (figura 3.5) per obtenir una sèrie de filtres amb el fitoplàncton capturat.



Figura 3.5. Filtrat d'aigua de l'embassament de Flix *in situ* per obtenir el filtre amb la mostra de fitoplàncton.

Per a recollir aquest fitoplàncton s'ha emprat una ampolla de Niskin mitjançant la qual es pot recollir aigua a diferents profunditats. Aquest aparell funciona enfonsant-lo a l'aigua amb un pes fins a la profunditat desitjada. El procés es realitza amb l'ampolla oberta en un inici. En el nostre cas va ser submergida entre 2 i 2.5 metres per obtenir una mostra representativa de la colònia de fitoplàncton del riu. Un cop l'instrument està a la profunditat adequada, s'activa el llançament d'un pes a través d'una corda que actua com a guia per accionar el mecanisme de

tancament de l'ampolla. D'aquesta forma es pot pujar tot l'aparell dalt del bot amb l'aigua recollida a la nostra profunditat i realitzar el traspàs a les ampolles de vidre, on s'emmagatzemarà l'aigua fins arribar al laboratori per fer el filtrat (figura 3.6). Aquest s'ha realitzat emprant filtres GF/F de 47 mil·límetres de diàmetre amb un porus de filtrat de 0.7 μm .



Figura 3.6. Procés de recollida de l'aigua a l'embassament de Flix emprant l'ampolla de Niskin per obtenir el fitoplàncton: preparació de l'ampolla (esquerra); llançament del pes per tancar-la (mig); i traspàs de la mostra als recipients de plàstic (per l'anàlisi de metalls) i de vidre (per COPS) (dreta).

Als ecosistemes aquàtics el fitoplàncton es troba a la base de la cadena alimentària ja que serveix d'aliment a organismes superiors. En aquest cas, l'estudi de mostres de fitoplàncton de l'embassament de Flix ens indicarà quins contaminants es comporten de forma menys hidrofòbica i poden ser transportats i transferits fàcilment. D'aquesta forma es poden avaluar els possibles efectes produïts pels contaminants que es bioacumulen des dels sediments a través de la columna d'aigua. Això ens dona una idea de la distribució dels compostos organoclorats emmagatzemats als sediments que es traslladen dins de la columna d'aigua mitjançant els organismes que hi habiten. Alguns estudis han analitzat aquest tipus de mostres trobant concentracions força baixes i properes als límits de detecció (McIntyre & Beauchamp, 2007).

Zooplàncton

Tal i com s'ha comentat, zooplàncton és el plàncton animal. Aquesta fracció està constituïda per organismes que s'alimenten de matèria orgànica ja elaborada a través de la ingestió. Per tant, a diferència del fitoplàncton, són heteròtrofs i els tipus d'organismes que formen aquesta fracció poden ser molt diferents. Aquests organismes es poden arribar a veure a simple vista (figura 3.7).



Figura 3.7. Distribució de mostres de zooplàncton de l'embassament de Flix (plàstic per a l'anàlisi de metalls, i vidre per al de COPs).

Per a les mostres de zooplàncton s'han emprat xarxes *bongo* arrossegades des d'un bot a la zona central del riu. Aquest sistema consisteix en acoblar un adaptador metàl·lic que uneix dos cilindres de tela amb un determinat filtre de malla. Quan la barca arrossega l'estructura, aquesta queda submergida uns quants centímetres dins de l'aigua. El funcionament d'aquest sistema es basa en l'arrossegament suau a velocitat intermèdia de la barca per a que tota la mostra quedi recollida dins d'un pot col·locat al final de l'embut de cadascun dels dos cilindres (figura 3.8). En aquest cas s'han realitzat diverses passades seguint el mateix recorregut per a poder obtenir suficient quantitat de mostra per a totes les anàlisis.



Figura 3.8. Sistema de xarxa *bongo* per a recollir mostres de zooplàncton (esquerra). Esquema longitudinal d'una de les malles amb el pot de recollida al final (dreta).

Els organismes que formen el zooplàncton actuen com a consumidors primaris ja que s'alimenten del fitoplàncton bàsicament, però també es poden alimentar de bacteris, d'organismes descomponedors, i fins i tot d'altres individus del zooplàncton. A més, d'igual forma que el fitoplàncton, també es troben situats a les parts inferiors de les xarxes tròfiques fluvials i tenen un rol molt important en el fenomen de biomagnificació de compostos orgànics persistents (COPs). En general, el zooplàncton té una generació molt ràpida i reflexa en gran part la contaminació més recent dins de l'ambient monitoritzat (Covaci et al., 2006).

Macròfits

S'utilitza aquest nom genèric per definir aquelles plantes aquàtiques que es poden veure a simple vista. Els macròfits, com totes les plantes aquàtiques, són plantes adaptades a viure en ambients molt humits o aquàtics. Alguns viuen totalment submergits mentre que d'altres tenen una part emergent que pot oscil·lar de mida. En general els macròfits es fixen al fons fangós mitjançant arrels, però hi poden haver espècies que floten lliurement i es deixen desplaçar per la superfície de l'aigua segons els corrents o el vent. Hi ha una proporció molt elevada de plantes aquàtiques que viuen en aigua dolça, més o menys estancada, com llacs, estanys o rius de corrent lenta (com l'embassament de Flix).

Fins el moment hi ha hagut pocs estudis sobre el paper que duen a terme els macròfits dins del cicle biogeològic dels compostos orgànics (Hopple, J.A. et al. 1996). S'ha demostrat que les plantes aquàtiques estan relacionades amb els processos d'absorció, bioconcentració i moviment de compostos organoclorats dins dels sistemes aquàtics, així com també dins dels cicles de nutrients essencials. A més, poden incrementar la sedimentació de partícules en suspensió (Lovett-Doust et al., 1994; Biernacki et al., 1995). En llocs sense una font puntual contaminada de sediments, s'han trobat nivells de PCBs de fins a 3 i 4 vegades més grans en plantes que en sediments, i fins i tot concentracions entre 6000 i 9000 vegades superiors que a l'aigua de l'entorn (Painter, 1990).

Com a conseqüència de la seva escassa mobilitat i del seu potencial acumulador de substàncies orgànics persistents, els macròfits tenen una funció de biomonitors "*in situ*" de contaminants (Lovett-Doust et al., 1994). Alguns autors ja han demostrat que les algues són una font alimentària molt important i un vector determinant del transport de contaminants orgànics persistents cap a nivells tròfics superiors en ecosistemes marins (Wang et al., 1998).

Com que hi ha diverses espècies de macròfits amb característiques diferents al llarg de tot el tram baix del riu Ebre, s'ha volgut comprovar si existeixen diferències en relació a l'acumulació

de COPs per a cada una d'elles. S'han analitzat tres espècies predominants en tot aquest tram de riu, si bé no ha estat possible recollir mostres de totes les espècies a totes les localitats ja que la seva distribució no és totalment homogènia. A continuació es realitza una breu descripció de les 3 espècies incloses dins aquesta tesi (en base a l'Herbari Virtual del Mediterrani: herbarivirtual.uib.es): *Ceratophyllum demersum* (figura 3.9), *Lemna gibba* (figura 3.10) i *Myriophyllum* sp. (figura 3.11).

Ceratophyllum demersum



Distribució geogràfica per províncies: Barcelona, Girona, Illes Balears, Tarragona i València.

Distribució general (fitogeografia): cosmopolita i sub-cosmopolita.

Època de floració: maig, juny, juliol, agost i setembre.

Hàbitat: submergida en aigües estancades o de curs lent.

Categoria IUCN: poc preocupant.

Figura 3.9. Planta aquàtica de l'espècie *Ceratophyllum demersum*.

Característiques: planta que viu completament submergida als canals i llacunes. La seva fisonomia recorda més a un alga que a una planta superior perquè la tija no es rígida i les fulles s'han transformat en un tipus d'estructures filiformes rígides que es divideixen dicotòmicament i s'agrupen en verticils. Les inflorescències es formen a la part superior de les tiges i surten de l'aigua. Es diferencia de *C. submersum*, que és molt més estranya, perquè les fulles es divideixen només 1 o 2 vegades mentre que en aquesta darrera espècie es divideixen entre 3 i 4 vegades. Floreix al maig i durant tot l'estiu.

Lemna gibba



Distribució geogràfica per províncies: Alacant, Barcelona, Castelló, Girona, Illes Balears, Lleida, Tarragona i València.

Distribució general (fitogeografia): cosmopolita i sub-cosmopolita.

Època de floració: abril, maig i juny.

Hàbitat: aigües estancades riques en nutrients i embassaments.

Categoria IUCN: poc preocupant.

Figura 3.10. Planta aquàtica de l'espècie *Lemna gibba*.

Característiques: planta aquàtica petita inconfusible com totes les espècies del gènere, per la forma de lletnia de les fulles que floten sobre l'aigua, i per l'arrel llarga que penja sota l'aigua. En aquesta espècie, el revers de la fulla (part submergida) sòl tenir una forma convexa molt característica. Aquesta característica i la forma més arrodonida de les fulles permet diferenciar-la de *L. minor*.

Myriophyllum sp.



Distribució geogràfica per províncies: Barcelona, Girona, Illes Balears, Lleida, Tarragona i València.

Distribució general (fitogeografia): cosmopolita i sub-cosmpolita.

Època de floració: juny, juliol i agost.

Hàbitat: torrents i aiguamolls.

Categoria IUCN: poc preocupant.

Figura 3.11. Planta aquàtica de l'espècie *Myriophyllum sp.*

Característiques: aquesta espècie viu permanentment submergida en canals i llacunes d'aigua dolça i salobre. Té un aspecte fàcil de reconèixer perquè les fulles es troben dividides com si fossin plomes o espines de peix. A més, es troben reunides en verticils. Tota la planta té una coloració verd-marronosa i pot tenir incrustacions de carbonats perquè sempre viu en aigües molt riques en aquestes sals. Les inflorescències tenen formes d'espigues sense fulles o reduïdes a petites bràctees senceres o poc dividides. Aquestes surten fora de l'aigua per pol·linitzarse. L'altre espècie *M. verticillatum* presenta aquestes inflorescències acompanyades de bràctees molt dividides i que són ben visibles.

Totes les mostres de macròfits s'han recollit amb salobres o emprant les mans recobertes amb guants des d'una embarcació (figura 3.12). S'ha recol·lectat el màxim volum possible de mostra per cada espècie per a poder realitzar els anàlisis de les concentracions de COPs. Les espècies han estat classificades *in situ* amb l'ajuda d'especialistes i després s'han emmagatzemat embolicant-les en paper d'alumini prèviament netejat. Posteriorment s'han desat el més aviat possible en congeladors a -20°C per a la seva anàlisi posterior.



Figura 3.12. Recollida de macròfits emprant el salobre des d'una embarcació (esquerra) i des del marge del riu (dreta).

Crustacis

Cranc de riu americà (*Procambarus clarkii*)

Aquest organisme és una espècie originària de Louisiana (EEUU) que es va introduir als anys setanta de forma voluntària a la Península Ibèrica per repoblar els rius que havien perdut població del cranc autòcton (*Austropotamobius pallipes*). Aquesta pèrdua d'individus locals va ser generada sobretot als cursos baixos dels rius com a conseqüència d'un fong (*Aphanomyces astaci*) que els genera una malaltia mortal denominada afanomicosis. En canvi, aquest fong no afecta al cranc de riu americà i per tant no en redueix la seva població. Així, la introducció d'aquesta espècie als rius estatals va provocar un doble impacte sobre el cranc de riu autòcton: en primer terme per la competència entre les dues espècies per l'aliment i l'espai, i en segon lloc perquè el cranc de riu americà era portador del fong que genera la malaltia mortal a l'altre espècie local.

La mida normal del cranc de riu americà arriba fàcilment als 10 cm des de la cara fins al final de la cua. Té una coloració que oscil·la entre colors vermelloses i tons grisos. La seva closca és cefalotoràcic amb nombroses espines als dos costats (figura 3.13). La seva alimentació és omnívora basada principalment en altres invertebrats més petits i productors primaris. De totes formes, també s'ha identificat el detritus com una font important de la seva dieta (France, 1996; Parkyn et al., 2001). Aquest detritus pot venir principalment de la producció terrestre (Whitledge & Rabeni, 1997). La seva reproducció comença amb la fecundació a la tardor per part del mascle sobre la femella. Els ous, al voltant de la centena, romanen units a l'abdomen de la mare. Finalment, a la primavera eclosionen directament amb forma adulta ja que aquesta espècie no passa per estadis larvaris intermedis. La vida mitjana d'aquesta espècie es troba al voltant dels 5 i 6 anys.



Figura 3.13. Vista dorsal del cranc de riu americà (*Procambarus clarkii*)

El cranc de riu americà viu en substrats tous de rius, aiguamolls i tolls d'aigua, excavant túnels per a refugiar-se. Els seus hàbits són menys crepusculars que l'autòcton i per tant es pot trobar a plena llum del dia, si bé té molta més activitat durant la nit. Sempre roman entre la vegetació i només surt al descobert si es troba en aigües poc transparents. Fisiològicament és molt resistent als nivells baixos d'oxigen, temperatures elevades i a un grau elevat de contaminació de l'aigua.

En el cas de l'estudi de les concentracions de COPs a la xarxa tròfica de l'embassament de Flix, donat que els fangs es troben sota l'acció de les aigües del riu. Aquests s'han pres com una de les espècies claus dins del nivell tròfic bentònic. Per això s'ha emprat aquesta espècie tan ubiqua que també es troba en varis punts de mostreig aigües avall. El transport de COPs en sistemes amb corrents d'aigua s'ha correlacionat amb el transport de matèria orgànica degut al seu fort caràcter hidrofòbic (Colombo et al., 1990). Els episodis de cabals més alt provoquen la mobilització dels sediments i incrementen el transport de la matèria orgànica en suspensió i en conseqüència el transport dels seus compostos associats (Quemarais et al., 1994; Rostad, 1997). Existeixen resultats que demostren que els crancs de riu tenen concentracions majors de COPs a major nivell d'aportació fluvial i més precipitació. Als llacs en canvi, són els processos interns propis els que influeixen a la bioacumulació d'aquests contaminants en el cranc (Holmqvist et al., 2007).

Hi ha molta informació en relació als efectes dels COPs sobre altres espècies, però molt poca sobre la bioacumulació en crancs de riu. Com que aquesta espècie acumula els compostos orgànics persistents de l'aigua i el menjar, és un organisme molt adequat com a bioindicador de l'exposició, tant de compostos orgànics com inorgànics als sistemes aquàtics (Shilderman et al., 1999). A més, gràcies a la seva gran proliferació s'ha convertit en una presa habitual dels majors depredadors dels sistemes aquàtics fluvials (peixos i aus) i és important conèixer quines concentracions de contaminants tenen i que, per tant, poden transferir als nivells tròfics superiors.

Per al mostreig d'aquesta espècie s'han emprat una sèrie de trampes especials. Aquestes consisteixen en una petita gàbia de niló que té dues obertures pels costats per permetre l'entrada dels crancs fins a l'esquer, que es col·loca dins d'una bossa tancada amb cremallera (figura 3.14). Un cop el cranc entra dins de la trampa ja no en pot sortir, i quan es recullen de l'aigua, es buiden els individus capturats a través d'una cremallera superior.

Totes les trampes emprades al llarg de les campanyes de recollida de mostres han estat dipositades al capvespre per deixar-les funcionant durant tota una nit (quan l'organisme té major activitat). Gràcies a l'esquer s'atrauen els crancs, que queden atrapats fins que es recullen les trampes el matí següent.

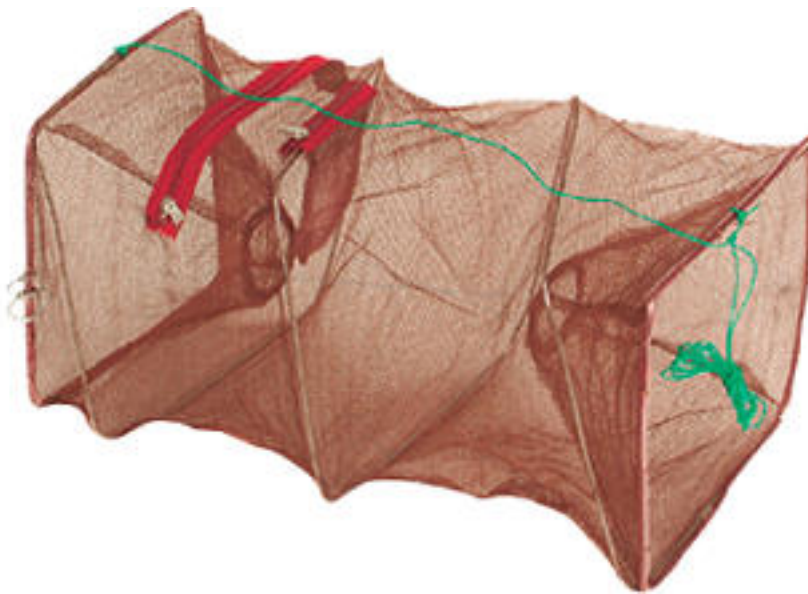


Figura 3.14. Trampa utilitzada per capturar crancs de riu americà

Cal destacar que en el cas de l'embassament de Flix l'accés als marges no sempre és possible des de terra, i per això s'ha emprat una embarcació per acostar-se directament als canyissars per dipositar les trampes. Això dificulta en gran manera la recollida de les trampes ja que per tornar-les a localitzar cal emprar un sistema de posicionament per satèl·lit (GPS). En el cas de les mostres de l'embassament de Riba-roja i a Xerta, l'accés era possible directament des de terra ferma i la recollida ha estat més senzilla. En tots els casos el protocol d'actuació ha estat el següent:

- 1) En primer lloc s'han obert cadascuna de les trampes per col·locar-hi l'esquer dins de la bossa (figura 3.15).



Figura 3.15. Restes de l'esquer emprat.

- 2) A continuació s'ha buscat una zona poc profunda on poder dipositar les trampes i poder lligar les cordes de subjecció per evitar l'arrossegament pel corrent del riu (figura 3.16).



Figura 3.16. Subjecció de la trampa en dos ambients diferents (barca a l'esquerra i terra ferma a la dreta).

- 3) Després s'ha comprovat l'estabilitat de la trampa per evitar que tots els individus capturats al llarg de tota la nit no puguin escapar i s'ha marcat la localització amb el GPS per a la seva posterior recollida (figura 3.17).



Figura 3.17. Trampa situada horitzontalment al fons del riu.

- 4) Finalment, 24 hores després s'ha procedit a recollir les trampes buscant-les amb el GPS, ja sigui via barca o a peu. Un cop localitzada la trampa, s'ha extret de l'aigua amb molta cura buidant les mostres en galledes plenes d'aigua per transportar els individus vius ràpidament fins al laboratori (figura 3.18). Allà s'ha actuat seguint el protocol de dissecció detallat més endavant.



Figura 3.18. Buidat de les mostres de cranc de riu americà de la trampa

- 5) Un cop al laboratori de camp, s'ha establert el pes, el sexe de cada individu i s'ha fet una dissecció per obtenir el teixit muscular. En primer lloc s'han pesat individualment les mostres (figura 3.19). Després s'ha procedit a determinar el sexe emprant la morfologia exterior. Als segments abdominals es poden observar les característiques sexuals que defineixen els mascles i les femelles. Els mascles tenen uns apèndixs modificats a l'abdomen que actuen com òrgan copulador mentre que les femelles tenen uns orificis genitals (figura 3.20). Finalment, per l'extracció del teixit muscular s'han realitzat uns talls laterals paral·lels a la part abdominal per separar la closca del múscul i aquest s'ha desat en paper d'alumini, prèviament netejat, a -20°C fins el seu posterior anàlisi al laboratori (figura 3.21).



Figura 3.19. Pesada de les mostres.

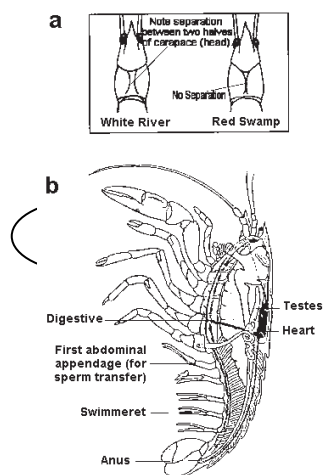


Figura 3.20. Determinació del sexe de l'individu.



Figura 3.21. Extracció del teixit muscular.

Mol·luscos

Musclo zebra o zebra (*Dreissena polymorpha*)

El musclo zebra és un bivalve de closca en forma triangular i amb unes coloracions que oscil·len entre tonalitats marrons i negres. Té aquest nom perquè a la closca se li marquen unes ratlles de color marró clar que li confereixen l'aspecte de zebra (figura 3.22). Es tracta d'una de les espècies invasores més eficaces en la colonització de zones aquàtiques noves. El seu origen és rus (Mar Càspia) i entre les seves principals avantatges biològiques es troben la seva capacitat de suportar canvis bruscos de temperatura i salinitat, i també la seva habilitat per aguantar varis dies fora de l'aigua, amb el que pot colonitzar altres masses d'aigua en forma d'adherències en embarcacions o equipament de pesca, com esquer o viatjant a les aigües de llast dels grans vaixells.

D'altra banda, el seu creixement ràpid i cicle biològic li permeten expandir-se amb una celeritat molt gran (en tan sols 10 anys va ser capaç de colonitzar la meitat oriental dels Estats Units). Tot i ser un bivalve petit, arriba als 2.5 centímetres el primer any i pot créixer fins a un centímetre més al llarg de la seva vida. Aquesta espècie crea grans poblacions que afecten a l'equilibri ecològic de les aigües on habita i provoca quantioses despeses econòmiques perquè s'apilonen en conduccions, obstrueixen canonades i obliguen a realitzar uns treballs de manteniment i neteja constants.



Figura 3.22. Musclo zebra (*Dreissena polymorpha*).

Als anys 90 va arribar a la zona del Delta de l'Ebre. Normalment a les aigües europees la vida mitjana d'aquest musclo oscil·la entre els 4 i els 6 anys. Cap a mitjans del mes de juliol de l'any 2001 i principis d'agost del mateix any es va detectar la presència d'aquest bivalve a diversos trams del riu Ebre situats per sobre del Delta de l'Ebre (Riba-roja, Flix i Xerta). Per aquest motiu es va realitzar un estudi previ per conèixer l'estat real de la invasió (Ministeri de Medi Ambient, 2001).

En aigües marines ja fa temps que s'utilitzen els musclos i ostres (més de 20 anys) com a bioindicadors de contaminació, dins de programes tan coneguts com el "Mussel Watch" (Goldberg et al., 1978). Des de fa un cert temps, també s'han provat els bivalves de sistemes aquàtics terrestres per aquest propòsit (Doherty et al., 1993). Els COPs generalment es troben en concentracions baixes a l'aigua dels llacs i rius, però tenen tendència a acumular-se als organismes vius. Aquesta propietat s'ha utilitzat en varis treballs de biomonitorització per identificar i quantificar els contaminants dins dels sistemes fluvials terrestres (Goldbert et al., 1978; Phillips, 1980; Duursma et al., 1984; Claisse, 1989). El musclo zebra s'ha emprat a Europa com a bioindicador de metalls pesats i contaminants orgànics (Duursma et al., 1984; Kraak, 1991; Giese & Krüger, 1992; Mersch et al., 1992). La seva proporció relativament alta de lípids fa que aquesta espècie sigui interessant per estudiar contaminants orgànics traça (Mersch et al., 1992; Fisher et al., 1993; Bruner et al., 1994). S'ha descrit que aquests organismes poden bioacumular contaminants orgànics fins a un ordre de magnitud superiors a d'altres bivalves (Brieger & Hunter, 1993; Fisher et al., 1993). Altres estudis indiquen que l'estat reproductiu i contingut lipídic s'han de tenir en compte a l'hora d'emprar-los com a biomonitoris perquè poden afectar les concentracions de cada individu (Roe & MacIsaac, 1998).

El musclo zebra serveix com a organisme sentinella. En primer lloc, es troba àmpliament distribuït en el tram final del riu Ebre i per tant és de fàcil recollida. En segon lloc, és un organisme que s'adhereix als substrats a través d'un conjunt de fibres i acumula contaminants orgànics persistents (COPs) a través de la seva alimentació per filtració. Finalment, aquesta espècie conforma una part elevada de la biomassa bentònica dins dels ecosistemes fluvials (Binelli et al., 1996; Galassi et al., 1997; Provini et al., 1997). A més, en tractar-se d'un organisme sèssil ens permet determinar els nivells de contaminació en una localització determinada del riu. En el cas de l'ecosistema de l'embassament de Flix, hi ha varis organismes que s'alimenten d'aquesta espècie i per tant ens ha ajudat a conèixer quins són els riscos de la presència de contaminants orgànics per als organismes situats a la part alta de la xarxa tròfica.

La recollida de mostres s'ha realitzat manualment buscant aquells punts de mostreig més accessibles des de la vora del riu. En alguns casos s'ha necessitat l'ús de barca per accedir directament des del riu als canyissars i obtenir mostres de musclo zebra situades a les seves arrels. En altres era suficient amb una aproximació a zones rocoses o buscar zones poc profundes i fer una recerca a peu dins de l'aigua (figura 3.23).



Figura 3.23. Recol·lecció de musclo zebra a la zona de canyissar (superior esquerra), a la zona rocosa (superior dreta) i a peu (inferior esquerra). Extracció manual del substrat (inferior dreta).

Les mostres es transportaven en recipients amb aigua i oxigen per arribar al laboratori i deixar als individus vius detoxificar-se algunes hores abans de ser classificats per mida de la closca (en tres categories: > 20 mm; 10-20 mm; < 10 mm). Finalment, s'ha extret el teixit muscular de cada individu i s'han emmagatzemat a -20°C per al posterior anàlisi al laboratori (figura 3.24).



Figura 3.24. Mostres de musclo zebra amb oxigen per detoxificar (superior esquerra). Classificació en funció de la mida de la closca (superior dreta). Extracció del teixit tou (inferior esquerra). Emmagatzemament individual per al posterior anàlisi químic dels COPs (inferior dreta).

Peixos

Dins d'aquest gran grup s'hi troben diferents espècies que responen a unes característiques de comportament molt diferent i que ajuden a enllaçar diferents nivells tròfics de tota la xarxa tròfica fluvial.

Els teixits musculars dels espècimens de peix de l'embassament de Flix indiquen els nivells de contaminació acumulats a llarg termini dins de l'organisme. Per realitzar un estudi més complet d'espècies s'ha considerat que era prioritari incloure un ampli ventall de tipus d'alimentació i distribució d'hàbitats. D'aquesta forma s'han estudiat cinc espècies dins de l'embassament de Flix, tres de les quals també han estat estudiades en altres localitats aigües avall del riu Ebre.

Silur (*Silurus glanis*)

Aquest ha estat el peix principal estudiat ja que es tracta d'una espècie invasora de tamany molt gran que es troba amb relativa facilitat al llarg de tot el tram baix del riu Ebre. A part de les

mostres de l'embassament de Flix, s'han analitzat espècimens de tot el tram final del riu. Els valors trobats han permès comparar geogràficament les concentracions de compostos organoclorats.

El silur és una espècie de peix de la família dels *Siluridae*, ordre dels Siluriformes, que des de la seva introducció a l'embassament de Mequinensa al 1974 s'ha expandit per molts punts de la conca del riu Ebre, tant al riu principal com als seus afluents, especialment el riu Segre. El seu origen es troba a l'Europa de l'Est i és una espècie molt abundant al Danubi i al Volga. Dins de la Península Ibèrica també s'han dut a terme introduccions il·legals en altres rius, embassaments i llacs. Dins del riu Ebre, l'espècie s'ha adaptat molt bé ja que s'ha convertit en el principal depredador present.



Figura 3.25. Silur (*Silurus glanis*)

Es tracta d'un peix bentònic, de pell verdosa i sense escames amb un cap aplanat i una boca gran (figura 3.25). Té unes barbes grans i la seva major activitat es produeix durant la nit. S'alimenta d'altres peixos actuant com a gran depredador tot i que tampoc rebutja altres invertebrats. A més, la mida de les preses depèn exclusivament de la mida del propi silur. Sòl habitar llacs grans i calents amb corrents suaus i pot arribar a viure fins a 30 anys. La importància d'aquesta espècie ve donada per la seva mida, ja que pot aconseguir grans dimensions amb facilitat si té unes bones condicions. D'aquesta manera sòl superar amb facilitat al lluç de riu (*Esox lucius*) i per tant s'ha convertit en el major peix d'aigua dolça d'Europa i un dels més grans a nivell mundial pel que fa als sistemes aquàtics terrestres.

Carpa (*Cyprinus carpio*)

Les carpes són una de les altres espècies més abundants dins de l'embassament de Flix. Es tracta d'un peix d'aigua dolça originari d'Euràsia i el sud-est asiàtic. En general prefereix els cossos d'aigües estancades o lentes de les regions més temperades d'Europa i Àsia. És una espècie molt resistent i capaç de viure en aigua molt salobre amb un rang tèrmic entre 2 i 25°C. En molts dels llocs on s'ha introduït se la considera una amenaça per a l'ecosistema com a conseqüència de la seva predilecció pel substrat vegetal dels fons poc profunds, que serveix d'aliment d'altres nombroses espècies.



Figura 3.26. Carpa (*Cyprinus carpio*)

És un peix d'alimentació omnívora que consisteix principalment en plantes aquàtiques tot i que també pot menjar artròpodes, zooplàncton i fins i tot peixos morts si en troba. És de color marró i amb escames dures. Normalment mesura entre 60 i 90 centímetres quan arriba a l'estat adult i el seu pes pot estar al voltant dels 9 kg (figura 3.26). Una de les seves característiques més importants és la seva ubiqüitat. Al tenir la capacitat de resistir una gran varietat de condicions climàtiques, es troba àmpliament distribuïda al llarg del planeta. De totes formes, les seves condicions preferides són les zones aquàtiques estancades o amb corrents d'aigua suaus. A més, també són molt longeves i viuen fàcilment més de 30 anys, tot trobant-se fins i tot casos que superen la seixantena. La seva espina dorsal és força característica per la forma serrada que té i les seves escames són llargues i fines. En el cas dels mascles, tenen l'aleta ventral més llarga que les femelles.

Rutil (*Rutilus rutilus*)

Aquesta espècie és més petita que les anteriors i té una alimentació variada. Ingerix petits moluscos, insectes, larves, cucs, molsa i algues dins de l'aigua. El rutil pertany també a la família dels Ciprínids i és un peix d'aigua dolça i salobre nadiu de la major part d'Europa i Àsia Occidental. S'acostuma a trobar en aigües corrents, tot i que també es pot observar en zones someres, llacs i embassaments. A Catalunya es troba puntualment en llacs i embassaments on hi ha estat introduït pels pescadors.



Figura 3.27. Rutil (*Rutilus rutilus*)

En general aquesta espècie de peix és petita. Arriba com a molt als 35 o 45 centímetres de longitud. El seu pes sol estar al voltant d'1 kg tot i que de vegades pot arribar al doble. És molt comú i la seva carn s'acostuma a utilitzar com a menjar. El rutil té un cap amb dos ulls, orificis nasals cecs (que vol dir que un dels dos costats no té sortida) que no s'obren cap a la boca com a la resta de peixos. Presenta una línia lateral al llarg del costat que va des d'un extrem fins a l'altre del cos. Aquesta línia d'escames especials està equipada amb forats que connecten la part externa del cos amb el sistema nerviós: Així és capaç de detectar moviments propers per les variacions petites de les longituds d'ona llarga de l'aigua a causa de moviments d'altres espècies. La seva forma és aerodinàmica i pot ser fins a quatre vegades més llarg que ample i té una cua allargada amb escates platejades (figura 3.27).

Gardí (*Scardinius erythrophthalmus*)

Aquest peix inclou un nou rang alimentari dins del conjunt dels peixos. El seu aliment més habitual sol ser la vegetació aquàtica i petites preses vives que trobi prop de la superfície. El gardí és un peix d'aigua dolça molt comú a Europa i Àsia. Es va introduir artificialment a Irlanda, els EE.UU, Marroc, Madagascar, Tuníssia, Nova Zelanda, Canadà i Espanya.



Figura 3.28. Gardí (*Scardinius erythrophthalmus*)

Morfològicament és molt semblant al rutil i es confonen sovint. Es poden diferenciar pel color dels ulls i per la ubicació de les aletes dorsals i ventrals (figura 3.28). En relació a la mida també té una longitud màxima propera als 45 centímetres. Prefereix aigües clares en zones riques de vegetació aquàtica. S'alimenta de plantes quan la temperatura augmenta però també caça animals petits propers a la superfície. De fet, aquesta espècie té la boca girada perquè és més fàcil per ells a l'hora d'alimentar-se a la part més pelàgica del riu.

Gambusia (*Gambusia holbrooki*)

És l'espècie de menor dimensió però ens serveix per tenir l'anàlisi d'un altre grup o font d'alimentació per als organismes situats a la part més alta de la xarxa tròfica. En aquest cas, la seva alimentació es basa en insectes terrestres que es puguin trobar a la vegetació aquàtica i també en les larves de mosquit.

La gambusia es troba principalment en hàbitats d'aigua dolça tot i que algunes espècies que conformen el gènere poden viure en aigües més salades. També se les coneix com el peix mosquit perquè hi ha una espècie especialitzada en alimentar-se d'aquests organismes. És nativa de la zona est i sud dels EE.UU i com a conseqüència de la seva agressivitat s'han convertit en una amenaça molt gran per a la fauna autòctona amb la que comparteix nínxol ecològic.

Són peixos molt petits perquè els mascles poden arribar com a molt a mesurar 3.5 centímetres de longitud total (figura 3.29). Prefereix els hàbitats temperats amb aigües calmades i sobretot s'acumula als marges de les corrents d'aigua i dels llacs. Acostuma a triar les preses més petites dels insectes o larves en que es basa la seva alimentació.



Figura 3.29. *Gambusia (Gambusia holbrooki)*

Totes les mostres de peixos analitzades per aquesta tesi es recolliren amb la col·laboració de l'Institut d'Ecologia Aquàtica de la Universitat de Girona (UdG). Per a realitzar les diverses campanyes de mostreig, s'emprà una barca adaptada a la recollida d'un gran nombre de mostres. El procediment consistí en utilitzar una tècnica de pesca elèctrica coneguda com *electrofishing*, on es treballa amb 500 volts i 13 ampers, que és una potència suficient per a la captura de peixos vius a l'embassament de Flix (Carol et al., 2006). D'aquesta forma, es poden recollir els peixos vius per transportar-los fins al laboratori en grans contenidors amb aire. Un cop s'han estabornit els peixos, es recullen des de la barca amb un salobre o amb les pròpies mans (mostres més grans) i es dipositen als contenidors amb aire (figura 3.30).



Figura 3.30. Embarcació preparada per la captura de peixos al riu Ebre. Pesada i mesurament dels individus capturats.

Posteriorment, en arribar al laboratori de camp, cada individu es pot mesurar, pesar, determinar el sexe i fer-ne la dissecció per obtenir les mostres desitjades (figura 3.31). Posteriorment, tots els filets de múscul s'han embolicat en paper d'alumini prèviament net i s'han emmagatzemat a -20°C fins el moment de la seva anàlisi.

L'extracció del múscul de cada individu s'ha realitzat d'acord amb el protocol utilitzat en altres projectes europeus d'estudi de COPs en alta muntanya ("Emerge Sampling Manual for Live Fish"). Aquesta metodologia consisteix en dipositar el peix en sentit horitzontal i arrencar l'aleta dorsal per deixar al descobert tota l'àrea per sobre de la línia que separa les aletes dorsal i ventral. Posteriorment s'ha tallat un rectangle en aquesta zona utilitzant un bisturí i s'ha extret el múscul sense pell ni escates (figura 3.31). En aquells peixos més petits, si la quantitat de mostra no era suficient es podia realitzar la mateixa operació per ambdues bandes del peix. En el cas de les gambusies (peix més petit), s'han estudiat els individus complets per manca de suficient

quantitat de múscul. Per l'anàlisi de COPs de la resta d'espècies, s'han recollit entre 15 i 20 grams de múscul que s'han congelat embolicats en paper d'alumini tal i com ja s'ha comentat (Rosseland B.O., 2003).



Figura 3.31. Preparació de l'individu sobre la taula de treball (superior esquerra). Obertura del rectangle de múscul a extreure amb un bisturí (superior dreta). Separació de les escates i recobriment intern per extreure el múscul que es farà servir als posteriors anàlisis químics (inferior esquerra).

Aus

Les aus aquàtiques es troben en els nivells més alts de les xarxes tròfiques. A les aus, aquests compostos poden provocar conseqüències greus durant el procés reproductiu perquè generen una reducció del gruix de la closca dels ous, o bé poden provocar una elevada mortalitat a nivell embrionari i malformacions als pollets (Aurigi et al., 2000). Tot i que hi ha certes limitacions en els resultats obtinguts, les mostres poc invasives s'utilitzen molt per monitoritzar espècies de la part alta de la xarxa tròfica. D'aquesta forma, les plomes i la recol·lecció d'ous d'ocell són tècniques molt utilitzades (De Luca-Abbott et al., 2001). Hi ha varies avantatges en l'ús d'aquestes metodologies: en primer lloc l'estrès i el destorb que es realitza a l'individu o a la població es redueix; i en segon lloc, les tècniques de mostreig són relativament senzilles. En el nostre cas s'han estudiat mostres d'ous de cadascuna de les postes. Tot i que algunes de les espècies analitzades són migradores, la majoria dels compostos orgànics persistents que es

troben en els ous s'acumulen durant l'època de cria. Cal considerar però, "l'efecte femella", que els investigadors defineixen com important sobretot en períodes on el menjar és més escàs i només es troben 1 o 2 ous per posta, per tant aquests ous estan composts per majors quantitats de greix endogen que els ous que es dipositen en èpoques de bonança alimentària, quan la composició sol ser més lipídica i amb components contaminats ingerits de les fonts d'alimentació (De Luca-Abbott et al., 2001).

En el nostre cas en concret, l'estudi dels ous d'ocell recollits per aquesta tesi té dues avantatges. En primer lloc, l'efecte de la bioacumulació ambiental és menor perquè el temps d'exposició és conegut (només durant el període de reproducció) i similar per totes les mostres. En segon lloc els resultats reflectiran només aquell impacte generat pels contaminants ingerits per la dieta local, ja que durant l'època de reproducció les preses es capturen principalment al voltant de la colònia. Per exemple, el *p,p'*-DDE té una gran influència en la reproducció de les aus tot reduint el gruix de la closca i acabant amb la vida del pollet. Els nivells d'aquest compost que es consideren perillosos per a l'èxit de la reproducció oscil·len molt entre espècies, però es pot afirmar que 2 µg/g en pes fresc sembla ser la mínima concentració associada amb efectes sobre el gruix de la closca i productivitat d'aus de rapinya (Pain et al., 1999). D'altra banda, en el cas dels PCBs, la menor concentració amb un efecte observable (LOEC) es troba prop dels 4 µg/g en relació als efectes en l'èxit reproductiu, i fins a 30 µg/g per afectar a la mortalitat de l'embrió (Sakellarides et al., 2006). Com és lògic, tots aquests valors poden variar entre espècies però serveixen de referència per entendre en quins valors es troben les mostres analitzades en aquesta tesi doctoral.

Els ocells que depenen dels aiguamolls o sistemes aquàtics terrestres són més susceptibles a la bioacumulació de contaminants a través de la seva alimentació. A més, aquelles espècies que s'alimenten principalment de peixos són les més estudiades pel seu risc potencial de contaminació per COPs (Sakellarides et al., 2006). Mentre que la contaminació de COPs en ous d'ocell ha estat, i continua essent molt estudiada a Nord Amèrica, hi ha poca informació disponible en molts països europeus. Específicament la informació de les concentracions de pesticides i PCBs al gènere dels *Ardeids* a l'Europa del Sud és força limitada (Focardi et al., 1998; De Cruz et al., 1997; Sakellarides et al., 2006).

L'única espècie considerada en aquest estudi que nidifica i es reproduïx a l'embassament de Flix és l'Agró roig (*Ardea purpurea*). També es pot trobar en altres localitats i colònies del tram final del riu Ebre. D'aquesta forma la majoria de mostres analitzades corresponen a ous d'aquesta espècie que han permès comprovar si hi ha diferències geogràfiques en relació a les concentracions de COPs. Els ous analitzats de l'altra espècie (Martinet blanc) han servit per

avaluar si existeixen diferències significatives entre elles en relació a les concentracions de COPs. A continuació es detallen les característiques de les dues espècies estudiades.

Martinet blanc (*Egretta garzetta*)



Ordre: Ciconiformes

Família: Ardeidae

Població catalana: 1760 parelles.

Estat de conservació a Catalunya: pròxim a l'amenaça.

Identificació (figura 3.32): 55-65 cm. Plomatge totalment blanc. Durant l'estiu té 2 plomes molt llargues, estretes i punxegudes que sobresurten per darrera del cap. Les plomes escapulars també sobresurten per sobre de la cua. Té el bec negre amb la base de la mandíbula inferior de color gris verdós. Les potes són negres amb els dits grossos.

Figura 3.32. Dibuix del Martinet blanc.

Característiques: és una au resident i nidificant localment abundant. És un ocell migrador regular que hiverna escassament en àrees on no nidifica.

Agró roig (*Ardea purpurea*)



Ordre: Ciconiformes

Família: Ardeidae

Població catalana: 600-700 parelles.

Estat de conservació a Catalunya: pròxim a l'amenaça.

Identificació (figura 3.33): 70-90 cm. Dors i cobertes alars de color pissarra, amb les plomes escapulars en tonalitats castanyes durant l'època nupcial. El cap i el coll solen ser de tonalitats castanyes, amb dues ratlles laterals negres al coll. El bec i les potes són de coloració groguenca.

Figura 3.33. Dibuix de l'Agró roig.

Característiques: és una au estival. Nidificant local als principals aiguamolls de Catalunya

(comú al Delta de l'Ebre). És un ocell migrador regular però escàs, amb exemplars estiuencs ocasionals.

L'obtenció de mostres de camp ha estat possible gràcies a la col·laboració dels membres del departament de biologia animal de la facultat de biologia de la Universitat de Barcelona. Totes les mostres d'ous d'ocell es recolliren de forma manual als diferents nius de cada una de les colònies estudiades. L'aproximació majoritàriament es realitzava amb un bot inflable amb rem per evitar el destorb de les aus (figura 3.34). Quan les condicions de l'embassament permetien l'ús d'un bot més gran a motor, com en el cas de Flix, s'ha optat per aquesta opció per agilitzar la recollida de mostres (figura 3.35). Per a cada una de les postes s'ha triat l'ou més petit, i per tant amb menys possibilitats de supervivència. A continuació s'ha trencat la closca i s'ha desat el contingut intern en un vial de 20 ml prèviament rentat i muflat. Posteriorment s'ha emmagatzemat el més ràpidament possible a -20°C per al seu posterior anàlisi al laboratori.



Figura 3.34. Recollida de mostres d'Agró roig amb bot inflable.



Figura 3.35. Recollida de mostres d'ous d'ocell amb el bot a motor.

3.1.1.2 Localitats de recollida de mostra

El tram baix del riu Ebre que s'ha utilitzat per determinar possibles zones de mostreig per aquesta tesi comprèn els darrers 130 km de riu, entre la zona de confluència de l'Aiguabarreig i el Delta. La localitat principal d'on s'han extret la gran majoria de mostres és l'embassament de Flix, però per obtenir altres dades d'important interès també s'han seleccionat altres punts situats tan aigües amunt de Flix com en zones posteriors a aquest embassament (figura 3.36). S'han agafat les mostres que podien aportar més informació rellevant de cara a l'estudi de cada un dels nivells tròfics a les següents localitats: *Aiguabarreig*, *Riba-roja*, *Flix*, *Meandre*, *Xerta* i *Canals*, i la zona del Delta. Així es genera un tram de nord a sud que és representatiu del corrent fluvial.



Figura 3.36. Zones mostrejades al tram baix del riu Ebre (la creu vermella indica mostres del riu mentre que el punt groc i blau indica mostres dels Canals que circulen pel lateral del riu a partir de Xerta).

Aiguabarreig

El nom d'aquesta localitat prové de la unió dels rius Ebre, Cinca i Segre. Això genera una gran zona d'ecosistemes diversos que giren al voltant del riu i sistemes de boscos de ribera. El paisatge que s'hi troba està conformat per una gran amplària del riu, nombroses illes i un dels boscos de ribera més extensos de la conca del riu Ebre. En relació al sistema plenament fluvial, l'*Aiguabarreig* és una zona humida de gran transcendència com àrea de reproducció i hivernada de fauna migratòria, en especial pel tipus d'aus que també nidifiquen a l'embassament de Flix.

És per això que en aquesta localitat s'hi ha recollit una sèrie de mostres d'ous d'ocells per a utilitzar-los com a localitat de referència en relació a les mostres de Flix. S'han considerat aquests punts de mostreig com característics de zones amb poca contaminació (es troben aigües amunt de l'embassament de Flix). Les mostres s'han recollit en una zona d'illes situada a uns quants metres aigües amunt de la unió entre rius (figura 3.37).



Figura 3.37. Punt de mostreig dels ous d'ocell de les tres espècies d'*Ardeids* estudiats a l'*Aiguabarreig*.

En total s'han analitzat mostres de dues campanyes anuals diferents (2006 y 2007). Dins del primer any, s'empraren 4 ous de Martinet blanc (*Egretta garzetta*), que basa la seva dieta en organismes aquàtics. El 2007 es van poder aconseguir mostres de la mateixa espècie que nidifica a l'embassament de Flix: l'Agró roig (*Ardea purpurea*). Així s'han analitzat 10 ous d'aquesta espècie recollits durant la campanya de mostreig de l'any 2007.

Riba-roja

Seguint pel curs del riu Ebre, uns 10 km abans d'arribar a l'embassament de Flix, hi ha l'embassament de Riba-roja (figura 3.38). Aquest es creà tot aprofitant que el riu discorre entre plataformes calcàries profundes. La presa està situada uns quants quilòmetres aigües amunt de la població de Riba-roja i en total, tot el pantà inclou fins a 38 km de llargària, una superfície de més de 2000 ha i un volum aproximat de 210 hm³ (figura 3.39). Aquest entorn facilita que s'hagi convertit en una de les zones d'oci més grans per als amants de la pesca a Catalunya ja que s'hi troba una gran quantitat i varietat d'espècies.

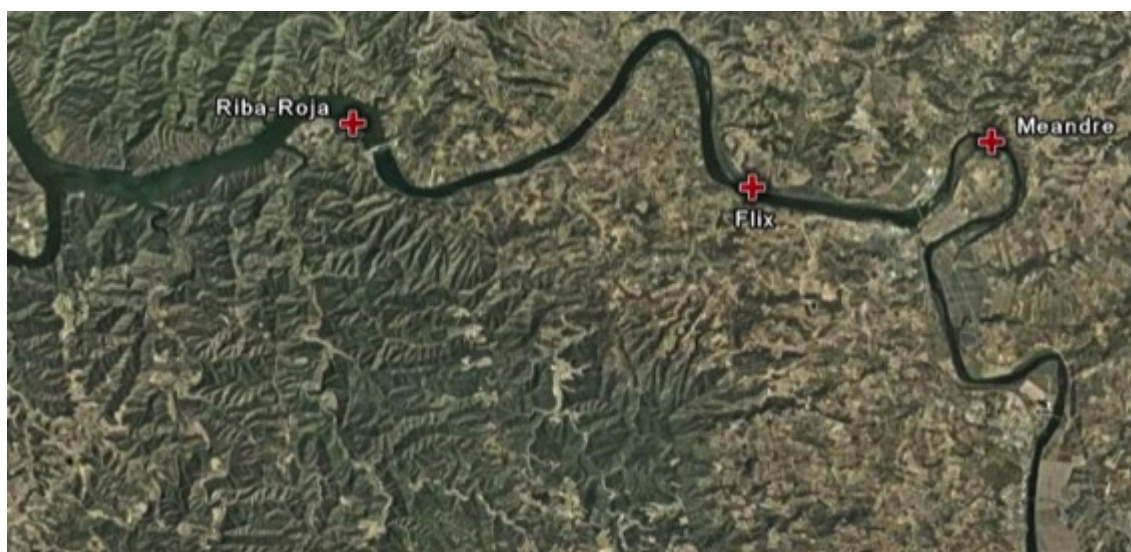


Figura 3.38. Situació del pantà de Riba-roja en relació a l'embassament de Flix i el Meandre.

Per aquesta tesi, el més destacat d'aquest entorn és que es troba situat molt a prop de l'embassament de Flix però continua estant aigües amunt del mateix, amb el que evitem trobar-nos possible contaminació provinent per l'arrossegament dels sediments de l'anterior. A més, donades les característiques favorables a la pesca, té varis punts de fàcil accés per recollir les mostres que siguin d'interès. Durant les campanyes intenses de presa de mostres, es van recollir mostres de dues matrius en aquest entorn per utilitzar-les com a *blancs* de camp. D'aquesta forma, s'han analitzat 5 mostres de cranc de riu americà (*Procambarus clarkii*) i 4 de silur (*Silurus glanis*) del pantà de Riba-roja. Per altres matrius més sèssils com el biofilm, els macròfits o el musclo zebra (*Dreissena polymorpha*), es va optar finalment per buscar localitzacions allunyades dels sediments contaminats de l'embassament de Flix però que es trobessin dins d'aquest mateix embassament per facilitar les tasques organitzatives i logístiques amb la barca de mostreig.



Figura 3.39. Presa del pantà de Riba-roja i localització del punt de mostreig.

Embassament de Flix

Com ja s'ha comentat a la introducció, l'estudi principal i la majoria d'objectius clau d'aquesta tesi es basen en l'anàlisi de les mostres obtingudes a l'embassament de Flix. La determinació de les concentracions de COPs trobades en cada una de les matrius que conformen la xarxa tròfica d'aquesta localitat és el graó bàsic per entendre i estudiar els fenòmens de biomagnificació que es produeixen entre nivells tròfics fluvials. És per tant el punt de mostreig principal i d'on s'ha extret el major nombre de mostres analitzades. En aquest cas s'ha recollit una àmplia representació de matrius per conformar de forma general la xarxa tròfica fluvial complexa de l'embassament de Flix.

Les mostres de sediment s'han obtingut de la zona central del curs fluvial del riu Ebre al seu pas per aquesta localitat. D'aquesta forma es pretén evitar analitzar directament els sediments més contaminats del marge dret perquè el que es vol observar és la concentració de fons dels organismes que es pot trobar dins de l'embassament, i que per tant està afectant directa o indirectament als organismes que l'habiten. En aquest cas, durant la campanya de mostreig de l'any 2006 es van extreure 3 testimonis diferents (figura 3.40). Els testimonis 1 i 4, s'han tallat en seccions de 9 mm de profunditat. El testimoni 2 s'ha tallat cada 18 mm. La fracció de sediment disponible per als organismes aquàtics fluvials es troba en els primers centímetres de sediment. En aquest cas s'ha considerat que era útil l'estudi de totes les fraccions fins arribar a una profunditat entre 3 i 4 centímetres. Així en total, s'han analitzat 4 mostres dels testimonis 1 i 4 (per arribar als 3.6 cm de profunditat), i 3 mostres individuals dels testimonis 2 (2 sub-

mostres de la primera fracció i una segona fracció completa). D'aquesta forma, en tots els testimonis s'ha analitzat les concentracions fins a la mateixa profunditat de 3.6 centímetres.



Figura 3.40. Localització dels punt de mostreig de cada un dels testimonis dins de l'embassament de Flix.

El biofilm s'ha recollit en 3 punts de mostreig diferents distribuïts al llarg de tot l'embassament per incloure la zona del costat de la reserva, el costat de la fàbrica i unes mostres de biofilm *flotant* al centre del curs del riu. En total s'han analitzat 5 mostres: una del marge de la fàbrica extrema just al principi dels sediments contaminats; una del marge de la reserva, just a l'embarcador; i finalment 3 mostres de biofilm *flotant*. Les localitzacions exactes s'indiquen a la figura 3.41.



Figura 3.41. Localització dels punt de mostreig de biofilm dins de l'embassament de Flix.

Les següents matrius analitzades a l'embassament de Flix són el fitoplàncton i el zooplàncton. En ambdós casos se n'han recollit 4 mostres al llarg de tota la zona central del riu Ebre al seu pas per l'embassament. Tot el procés s'ha realitzat des d'una embarcació i a la figura 3.42 es pot veure la situació de la zona de mostreig.



Figura 3.42. Punts de mostreig de fitoplàncton i zooplàncton a l'embassament de Flix.

Les mostres de macròfits s'han recollit en tres punts diferents dins de l'embassament de Flix (figura 3.43). El primer es troba situat aigües amunt dels sediments contaminats, el segon es troba al marge oposat als sediments (marge de la reserva) i el tercer està just a sobre de la bossa de fangs (marge de la fàbrica). Les mostres recollides al primer punt s'han utilitzat com a referència perquè no han rebut l'impacte dels fangs abocats per l'empresa ni dels contaminants emmagatzemats (no s'han inclòs a l'article). Pel que fa a les altres dues localitzacions, serveixen per comparar l'estat de les mateixes espècies de macròfits en un marge i en l'altre de l'embassament.



Figura 3.43. Punts de mostreig de macròfits a l'embassament de Flix.

Al punt situat aigües amunt s'hi ha recollit 3 mostres diferents amb cada una de les 3 espècies descrites anteriorment (*Cerathophyllum demersum* (figura 3.9), *Lemna gibba* (figura 3.10), i *Myriophyllum* sp. (figura 3.11)). D'igual forma, tant a la zona de la reserva com a la de la fàbrica, s'hi han trobat les 3 espècies (*Cerathophyllum demersum* (figura 3.9), *Lemna gibba* (figura 3.10) i *Myriophyllum* sp. (figura 3.11)) i per tant s'han estudiat 3 mostres per cada marge del riu.

Dins de l'embassament de Flix s'han recollit un total de 20 crancs de riu americà (*Procambarus clarkii*). Com en el cas anterior, s'han diferenciat dos grans localitzacions: el marge de la reserva i el marge de la fàbrica. En el primer cas s'ha treballat amb set punts de mostreig mentre que al marge de l'empresa clor-àlcali s'ha mostrejat vuit punts diferents (figura 3.44).



Figura 3.44. Punts de mostreig de cranc de riu americà a l'embassament de Flix repartits entre els dos marges del riu (reserva: punts 1-7 i fàbrica: punts 8-15).

D'aquesta forma, s'ha cobert una gran longitud de cadascun dels dos marges de l'embassament de Flix i s'han diversificat els punts de mostreig per obtenir uns resultats més robustos i equitatius.

A la mateixa campanya de mostreig de l'any 2006, s'inclogueren mostres de musclo zebra (*Dreissena polymorpha*). Per estudiar les correspondències entre la mida i les concentracions de COPs es mostrejaren tres grups d'organismes en cada un dels punts seleccionats. Així, en base a la longitud de la closca de cada individu, es formaren tres grups d'individus: > 20 mm; entre 10 i 20 mm; i < 10 mm (anomenats *grans*, *mitjans*, i *petits*).

L'elecció dels punts de mostreig dins de l'embassament es fonamenta en la situació de cadascun d'ells (punts representatius) i la presència de musclo zebra, que no sempre es troba a tot arreu. Sovint calen certes característiques ambientals favorables per garantir-ne la presència com ara una baixa circulació d'aigua i tenir bons substrats on fixar-se. D'aquesta forma s'han seleccionat tres punts de mostreig dins de l'embassament: un situat aigües amunt dels fangs, un altre al marge de la reserva, i el tercer just al final dels fangs contaminats, al marge de la fàbrica (figura 3.45). En total s'han analitzat 8 pools de mostres perquè en un dels punts (DPO2) no es trobà quantitat suficient de mostra per al grup < 10 mm.



Figura 3.45. Punts de mostreig de músculo zebra a l'embassament de Flix per l'estudi segons les mides dels individus.

Les mostres analitzades de múscul dels peixos de l'embassament de Flix són totes de l'any 2006. En tractar-se de mostres molt mòbils no s'ha establert un punt exacte de recollida sinó que s'ha treballat amb diferents transectes perpendiculars al corrent del riu repartits al llarg de tot el tram que ocupa la llargada del complex de la fàbrica clor-àlcali. En l'únic cas en que s'ha diferenciat les zones de mostreig dins de l'embassament és per les mostres de carpa recollides en una campanya especial de primavera l'any 2006. En aquest cas s'han considerat tres punts de mostreig entre una zona aigües amunt dels fangs, una zona just en contacte amb els sediments centrals, i finalment un últim punt a la darrera part dels fangs contaminats (figura 3.46).



Figura 3.46. Punts de mostreig de carpa a l'embassament de Flix durant la campanya de primavera de 2006.

Les mostres de silur (*Silurus glanis*) es recolliren en dues campanyes diferents del 2006. En total s'han estudiat 20 mostres de silur repartides en 11 mostres de l'hivern (febrer) i un total de 9 mostres més de l'estiu (juliol). De carpes (*Cyprinus carpio*) s'han analitzat un total de 33 mostres repartides en 19 individus de la primavera (maig) i 14 de l'estiu (juliol). També s'han analitzat 6 mostres de rutil (*Rutilus rutilus*) capturades a l'estiu (juliol) i un total de 20 individus de gardí (*Scardinius erythrophthalmus*) i de gambusia (*Gambusia holbrooki*) extrets durant la mateixa campanya de mostreig. En tots els casos es representen les mostres com pertanyents a l'embassament sense precisar la seva posició exacta de captura (figura 3.47).

Amb totes aquestes mostres de peixos s'han cobert bona part dels règims alimentaris i d'hàbits vitals per entendre quins processos poden tenir major repercussió en les concentracions dels diferents grups de COPs estudiats.



Figura 3.47. Punt de mostreig global de tots els peixos dins l'embassament de Flix.

Per últim, l'única espècie d'au amb una marcada alimentació piscícola i que es reproduïx dins de l'embassament de Flix és l'Agró roig (*Ardea purpurea*). D'aquesta forma s'han analitzat 11 ous recollits l'any 2006 i 10 ous més de l'any 2007. Aquestes mostres tenen molta importància perquè, tot i que aquesta espècie realitza les seves postes al marge de la Reserva Natural de Sebes (marge contrari al de la fàbrica, figura 3.48), sovint s'alimenta en zones properes als fangs contaminats. Per tant, és molt probable que pateixin episodis puntuals i aguts de contaminació per compostos organoclorats durant aquest període de la seva vida que es veuran reflectits en les concentracions trobades als ous.



Figura 3.48. Situació de la zona de posta d'ous dins de l'embassament de Flix (zona de la reserva).

Meandre

Al seu pas per la localitat de Flix, el riu Ebre realitza una gran corba per canviar de la direcció d'oest a est i passar a dirigir-se de nord a sud (figura 3.49). En aquest gir natural del riu, s'hi ha construït un salt d'aigua per produir electricitat. Així, la gran majoria de l'aigua es desvia cap a la central hidroelèctrica i s'incorpora de nou al riu després del meandre, mentre que aquest, manté un cabdal força baix regulat de forma antròpica majoritàriament. En aquest entorn, les aigües són molt someres i queden a recer de les corrents més forts del riu (excepte en períodes de crescuda). L'accés relativament senzill a la zona i la presència de les mateixes espècies trobades a l'embassament de Flix, ha servit per recollir algunes mostres del *meandre* i estudiar si hi trobem concentracions de COPs més elevades o del mateix ordre de magnitud que a les mostres de l'embassament, on tenen un contacte més proper amb els sediments contaminats.

Aquí s'han recollit 9 mostres de silur (*Silurus glanis*) i 12 de carpa (*Cyprinus carpio*). Aquestes últimes, tot i que no s'han inclòs en cap article s'han emprat per la interpretació dels resultats finals per la seva rellevància. Totes les mostres de peixos es recolliren el febrer del 2007.



Figura 3.49. Vista aèria del meandre rodejant la vila de Flix.

Xerta i els Canals

Uns quants quilòmetres aigües avall de l'embassament de Flix s'hi troba la població de Xerta. Aquest ha esdevingut un altre punt de mostreig del darrer tram del riu Ebre per la seva accessibilitat i sobretot perquè en aquesta localitat és on es troba l'assut que dona lloc a l'inici dels dos canals de regadiu que recorren per cada un dels marges del riu totalment separats de la corrent principal fins arribar al Delta de l'Ebre (figura 3.50). Es coneixen com el canal de la dreta i el de l'esquerra, sempre observant-los en el sentit de la corrent del riu.

Per aquesta tesi, en aquesta localitat s'han recollit 4 crancs de riu americà i un total de 20 peixos repartits en 5 mostres de silur, 10 de carpa (no incloses als articles) i 5 de rutil (no incloses als articles). Totes aquestes mostres es van recollir el desembre de l'any 2006.



Figura 3.50. Assut de Xerta i inici dels dos canals del riu Ebre (Canal de la Dreta i Canal de l'Esquerra).

S'han estudiat també unes quantes mostres de peixos recollits durant el buidatge anual dels canals de regadiu en diverses localitats situades entre Xerta i el Delta de l'Ebre. En total són 14 silurs repartits en 4 mostres del canal a l'alçada de Tivenys, 4 mostres més del Sifó de Jesús, 2 mostres a l'alçada de Tortosa i 4 mostres més a Deltebre (figura 3.51).

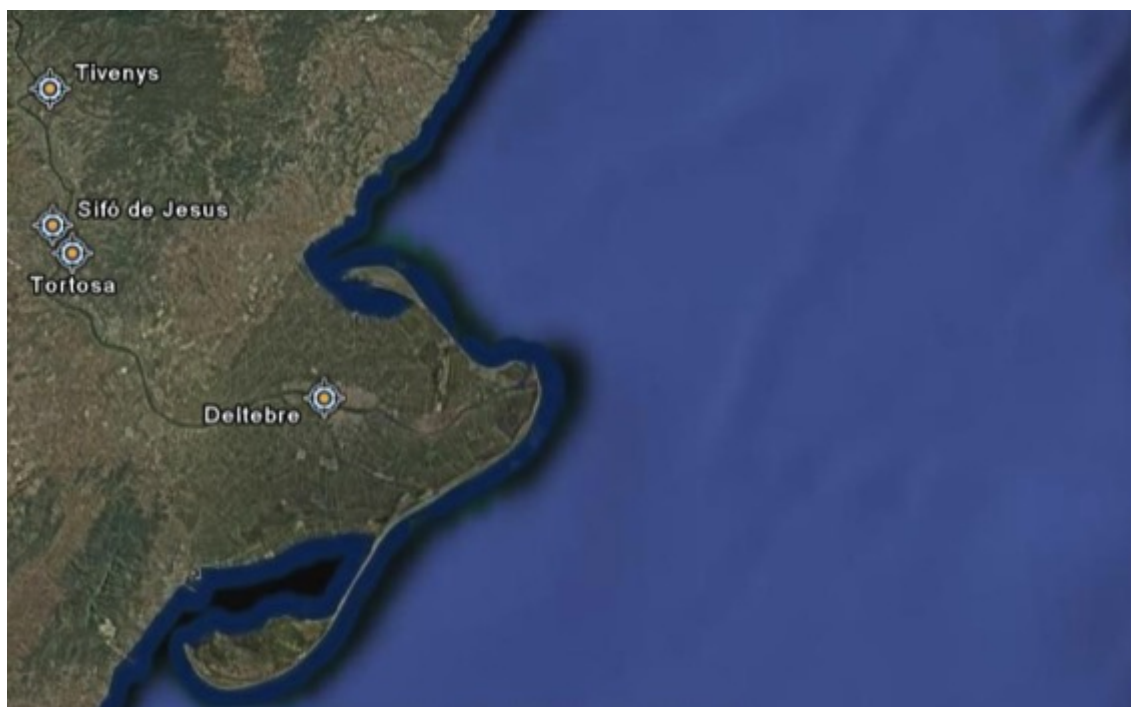


Figura 3.51. Tram final del riu Ebre amb les localitats d'on s'ha extret mostres de silur dels canals.

Delta de l'Ebre

El Delta de l'Ebre conté un parc natural que porta el seu nom. Es va declarar espai protegit l'any 1983 i es troba situat a la desembocadura del riu Ebre. Tres anys més tard es va ampliar la seva àrea protegida, tot arribant a superar les 7500 ha. El Delta de l'Ebre és la zona humida més gran de Catalunya i una de les més importants a nivell Europeu. En aquesta tesi s'han emprat mostres obtingudes en aquest espai sobretot per fer comparacions geogràfiques a certa distància de l'embassament de Flix. Es vol veure si hi ha una possible influència en les concentracions de COPs en organismes que habiten el Delta provinent de la mobilització de partícules contaminades amb aquests compostos de l'embassament de Flix. D'altra banda, s'han recollit ous d'ocell de la mateixa espècie que trobem a Flix.

En total s'han analitzat un total de 17 mostres de peixos que inclouen 2 mostres de silur, 10 mostres de carpa (no incloses als articles) i 5 de rutil (no incloses als articles). Totes aquestes mostres s'han recollit a la zona de Deltebre el desembre del 2006. D'altra banda, dins del Delta de l'Ebre, s'han estudiat dues localitats d'on s'han obtingut diferents mostres d'ous. La colònia del Canal Vell, situada a la zona nord-est del Delta, i la colònia del Clot, localitzada al sud-oest del mateix (figura 3.52).



Figura 3.52. Localització de les dues colònies d'ocells mostrejades al Delta de l'Ebre i el punt de mostreig del riu a Deltebre.

En total s'han analitzat 28 ous d'ocell repartits en dues campanyes de mostreig els anys 2006 i 2007. De l'any 2006 s'han estudiat 14 ous d'Agró roig (*Ardea purpurea*) i 4 de Martinet blanc

(*Egretta garzetta*) mentre que de l'any 2007 se n'han analitzat un total de 10 de la primera espècie. Aquesta és la única espècie d'*Ardeids* que nidifica a l'embassament de Flix i per això s'ha decidit emprar aquesta espècie també al Delta.

A la taula següent es troba un resum de les característiques i número total de mostres provinents del tram final del riu Ebre analitzades en aquesta tesi.

Taula 3.1. Localització, tipus i número de mostres analitzades del tram final del riu Ebre.

Localitat	Nom comú	Espècie	N	Any	
Aiguabarreig	Martinet blanc	<i>Egretta garzetta</i>	4	2006	
	Agró roig	<i>Ardea purpurea</i>	10	2007	
Riba-roja	Cranc de riu americà	<i>Procambarus clarkii</i>	5	2006	
	Silur	<i>Silurus glanis</i>	4	2006	
Embassament de Flix	Sediment	-	11 (3 cores)	2006	
	Biofilm	-	5	2006	
	Fitoplàncton	-	4	2006	
	Zooplàncton	-	4	2006	
	Macròfits	<i>Cerathophyllum demersum</i>	2	2006	
		<i>Lemna gibba</i>	2	2006	
		<i>Myriophyllum</i> sp.	2	2006	
	Cranc de riu americà	<i>Procambarus clarkii</i>	20	2006	
	Musclo zebra	<i>Dreissena polymorpha</i>	8	2006	
	Gambusia	<i>Gambusia holbrooki</i>	20	2006	
	Gardí	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	20	2006	
	Rutil	<i>Rutilus rutilus</i>	6	2006	
	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	33	2006	
	Silur	<i>Silurus glanis</i>	20	2006	
	Agró roig	<i>Ardea purpurea</i>	21	2006/2007	
	Meandre	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	12	2007
		Silur	<i>Silurus glanis</i>	9	2007
Xerta i Canals	Cranc de riu americà	<i>Procambarus clarkii</i>	4	2006	
	Rutil	<i>Rutilus rutilus</i>	5	2006	
	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	10	2006	
	Silur	<i>Silurus glanis</i>	19	2006	
Delta de l'Ebre	Rutil	<i>Rutilus rutilus</i>	5	2006	
	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	10	2006	
	Silur	<i>Silurus glanis</i>	2	2006	
	Agró Roig	<i>Ardea purpurea</i>	24	2006/2007	
	Martinet blanc	<i>Egretta garzetta</i>	4	2006	
Total			311		

3.2 Metodologies analítiques

En una tesi amb tantes matrius diferents per analitzar, ha estat molt important uniformitzar en la mesura del possible les tècniques analítiques a emprar. És per això que s'ha intentat mantenir l'ús de protocols de laboratori el més semblants possible entre ells per facilitar la comparació de resultats entre nivells tròfics. Excepte en el cas de les aus, on s'han estudiat mostres d'ou, per a la resta d'organismes superiors de les xarxes tròfiques (peixos, crustacis i mol·luscos) s'ha analitzat teixit muscular, que a part d'uniformitzar matrius, dona una estimació de la contaminació acumulada a llarg termini dins l'organisme. En tots aquests casos s'ha pogut aplicar el mateix procés analític. Per a les altres matrius s'han emprat tècniques d'extracció més adequades a la seva composició o morfologia que es detallen a continuació. En general, els procediments emprats en l'anàlisi de les diferents famílies de COPs en totes les matrius han estat adaptacions de les tècniques desenvolupades anteriorment al Departament de Química Ambiental del Institut de Diagnòstic Ambiental i Estudis de l'Aigua (Berdié & Grimalt, 1998; Fernández et al., 1999). Les estratègies d'extracció s'han seleccionat segons la quantitat de mostra disponible i les concentracions de COPs que es preveia trobar a cada matriu.

Per estudiar concentracions molt baixes (de l'ordre dels nanograms/gram o ppb) s'ha seguit un rigorós exercici de bones pràctiques de laboratori per evitar contaminacions externes. A més, s'ha realitzat un blanc de laboratori per a cada una de les sèries d'extracció per comprovar que no hi havia contaminacions al llarg del procés. En tots els protocols que es detallen s'han emprat els materials i processos de neteja que es descriuen a continuació.

Material

Segons el tipus de mostra s'han emprat diversos dissolvents com el n-hexà, el diclorometà, l'isooctà, l'acetona, l'àcid clorhídric i l'àcid sulfúric concentrat (95-97%) de la casa Merck. El coure també ha estat de la casa Merck. El sulfat sòdic anhidre pertany a la casa Panreac. Els cartutxos d'extracció de cel·lulosa emprats han estat de la companyia Whatman Ltd. Les solucions de patrons amb els compostos analitzats: PeCB, HCB, HCHs (α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH), DDTs (*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD i *p,p'*-DDD), PCBs (28, 52, 101, 118, 138, 153 i 180) i PCEs (PeCE, α -HxCE, Z- β -HxCE, E- β -HxCE, Z- α - β -HpCE, β - β -HpCE, E- α - β -HpCE i OCE), han estat tots de la casa Dr. Ehrenstofer (Wesel, Alemanya). Com a solució de patrons interns i de recuperació s'han emprat els compostos TBB (1,2,4,5-tetrabromobenzè) de la casa Aldrich-Chemie (Steinheim, Alemanya), el PCB-200, el PCB-142 de la casa Dr. Ehrenstofer (Wesel, Alemanya), tots ells preparats en isoctà.



Procés de neteja

Per a cada tanda d'extracció, el material de vidre no volumètric s'ha rentat en diverses fases. En primer lloc s'ha fet una neteja amb aigua i sabó. Després s'ha submergit el material en un aparell d'ultrasons durant 15 minuts emprant aigua destil·lada i detergent alcalí (Extran AP 13 de la casa Merck). A continuació, s'ha esbandit tot amb aigua de l'aixeta i s'ha netejat amb aigua Milli-Q. Per finalitzar, s'ha emprat acetona per facilitar l'assecament del material i s'ha col·locat tot dins d'una estufa durant 12 hores a 80°C.

Tot el material rebutjable de vidre (pipetes Pasteur o vials), així com els tubs de centrifuga de 15 ml (Pirex SVL 611/54 de la casa Afora) s'han escalfat durant 12 hores en una mufla a 400°C. El material volumètric de precisió que no es pot posar a l'aparell d'ultrasons ha seguit el mateix protocol de neteja que la resta però substituint aquest pas amb l'aplicació de n-hexà abans de l'acetona.

A continuació es descriuen els tres mètodes d'extracció principals emprats segons el tipus de mostra. En primer lloc els sediments tenen el seu protocol diferent, ja que són mostra no biològica. En l'estudi del fitoplàncton també s'ha emprat una tècnica d'extracció especial perquè les mostres eren filtres, i la resta de mostres han estat extretes i preparades amb un únic protocol que pot incloure variacions petites per adaptar-lo a la matriu biològica concreta.

Sediments

Les mostres de sediment recollides a l'embassament de Flix s'han tractat amb un protocol metodològic diferent a l'emprat amb la majoria de mostres de teixits biològics. Les dues grans diferències durant el procés d'extracció de les mostres de sediment són que inclou un procés de liofilització prèvia per assecar bé les mostres i després la realització d'una extracció amb ultrasons.

Per tant, totes les mostres recollides han estat liofilitzades prèviament per extreure tota l'aigua. Després s'han pesat 0.5 grams de sediment sec i s'hi han afegit 15 ml d'una mescla de n-hexà:diclorometà en proporció 4:1 dins d'un tub de centrifuga. A continuació s'han afegit 100 µl de TBB i PCB-200 com a patrons de recuperació.

L'extracció s'ha realitzat durant 15 minuts amb ultrasons i després s'han centrifugat els tubs durant 5 minuts a 1700 r.p.m. La fase de dissolvent s'ha traspassat a un baló i s'ha desat a part. Aquest procés s'ha repetit 3 vegades, i un cop el baló conté tota la fase de dissolvent, s'ha extret una fracció per al càlcul del percentatge de lípids amb una tècnica gravimètrica. La resta de dissolvent del baló s'ha concentrat i se li ha afegit coure activat durant 12 hores per eliminar

qualsevol traça de sofre. La preparació d'aquest coure activat consisteix en l'eliminació de la seva capa oxidada per obtenir coure elemental. D'aquesta forma, amb una quantitat petita és suficient per retenir tot el sofre que es troba als extractes. El procediment consisteix en afegir coure en un vial de 20 ml i cobrir-lo amb àcid clorhídric (HCl). Després es posa aquest vial a l'aparell d'ultrasons durant 15 minuts. S'extrau l'àcid clorhídric amb una pipeta Pasteur i s'afegeix aigua milli-Q. A continuació s'utilitza un vòrtex per homogeneïtzar durant 1 minut i s'extrau l'aigua milli-Q. Aquest pas es realitza entre 5 i 6 vegades fins que el pH roman entre 5 i 6. Després s'afegeix acetona, es torna a utilitzar el vòrtex i es decanta per eliminar l'aigua milli-Q repetint aquest pas dues vegades. Per acabar es repeteix aquest procés però emprant n-hexà com a dissolvent, d'aquesta forma s'aconsegueix eliminar l'acetona i tot es troba en fase hexànica.

A continuació, s'ha procedit amb la fase de purificació amb àcid sulfúric. S'han afegit 2 ml d'aquest àcid a cada mostra i s'ha emprat un vòrtex per homogeneïtzar les mostres abans de centrifugar-les 5 minuts a 4000 r.p.m. Amb la centrifugació s'elimina qualsevol emulsió que hi hagi a la interfase. Després es descarta la fase d'àcid sulfúric i s'afegeixen de nou 2 ml d'àcid per realitzar el cicle un altre cop. Aquesta etapa de purificació es repeteix fins que s'aconsegueix una fase transparent d'àcid (normalment entre 4 i 5 etapes d'oxidació per mostra).

Un cop es disposa d'aquesta dissolució transparent es procedeix a l'extracció de la fase de n-hexà i es fa passar per una petita columna realitzada amb sulfat sòdic net. Així s'ha pogut separar qualsevol resta d'àcid que pugui quedar. La fracció obtinguda s'emmagatzema en un matràs i després es torna a afegir n-hexà a l'àcid sulfúric per repetir el procés 3 vegades més. Finalment tot el n-hexà acumulat per mostra es concentra per evaporació de rotació al buit fins aconseguir volums menors a 1 ml. Aquestes solucions es transfereixen a vials d'injecció i s'evaporen fins a volums de 50 µl sota un corrent de nitrogen a temperatura ambient. Per acabar l'extracte concentrat es dissol en isoctà per a l'anàlisi instrumental.

Fitoplàncton

Les mostres de fitoplàncton s'obtenen després de filtrar l'aigua recollida *in situ* amb filtres GF/F de 47 mm de diàmetre i amb un porus de 0.7 µm tarats prèviament. Aquests filtres es liofilitzen durant 6 hores (s'arriba a pes constant). A continuació els filtres es tallen i dobleguen per col·locar-los dins dels tubs de centrífuga i realitzar l'extracció per ultrasons. La primera extracció es fa durant 15 minuts amb 10 ml de metanol per acabar d'eliminar qualsevol resta d'aigua. Es retira tot el dissolvent i s'hi afegeixen 10 ml de la mescla de n-hexà:diclorometà



(4:1) i 100 µl dels patrons de recuperació TBB i PCB-200. Aquesta mescla s'extreu durant 15 minuts amb ultrasons i es traspasa tota la fase de dissolvent a un baló. Aquest procés es repeteix 3 vegades. Un cop el baló conté tot el volum de dissolvent, se n'extreu una fracció per a realitzar el càlcul del contingut de lípids per gravimetria. A continuació es concentra la resta per evaporació rotatòria al buit i s'aplica la mateixa tècnica de purificació amb àcid sulfúric i concentració en vials emprada en el mètode anterior.

Resta de matrius

La resta de matrius biològiques analitzades han seguit un esquema d'extracció molt similar entre elles, però que s'ha hagut d'adaptar tot afegint alguns passos segons el tipus concret de mostra. D'aquesta forma, el zooplàncton, els macròfits, els crustacis, els mol·luscos, els peixos i els ous d'ocell s'han extret amb aparells de Soxhlet. L'únic grup de mostres que ha hagut de menester una liofilització prèvia de les mostres pel seu contingut alt d'aigua han estat els macròfits. Com es pot comprovar a la taula 3.2 la mitjana de percentatge d'aigua en aquestes mostres ha estat molt elevada (entre un 86% i un 93%). En aquest cas, s'ha utilitzat el total de la mostra per seguir el procediment d'extracció. El protocol d'extracció amb Soxhlets ha estat el descrit per Berdié i Grimalt, 1998.

Taula 3.2. Taula resum de les característiques de les mostres de macròfits.

Localització i espècie	Pes fresc (g)	Pes sec (g)	% Aigua
Embassament Flix (Reserva)			
<i>Ceratophyllum demersum</i>	15.37	1.39	91
<i>Lemna gibba</i>	16.01	1.06	93
<i>Myriophyllum</i> sp.	3.04	0.44	85.5
Embassament Flix (Fàbrica)			
<i>Ceratophyllum demersum</i>	12.66	1.12	91
<i>Lemna gibba</i>	8.28	0.68	92
<i>Myriophyllum</i> sp.	4.49	0.33	93

L'esquema del protocol per a totes les matrius esmentades anteriorment es mostra a la figura 3.53. Primer ha calgut una homogeneïtzació i disgregació de les mostres amb sulfat sòdic anhidre. Després s'han extret totes les mostres amb un sistema de Soxhlets i evaporació posterior rotatòria al buit i concentració de la mostra sota un corrent de nitrogen (figura 3.54). El contingut de lípids de totes les mostres s'ha mesurat gravimètricament després de l'extracció amb n-hexà:diclorometà (4:1).

Per realitzar l'extracció primer s'ha preparat el sistema de Soxhlets i s'han mantingut en funcionament durant 24 hores per assegurar-se de que tot funciona correctament i que el material queda totalment net. A continuació s'han emprat entre 0.1 i 5 grams de mostra (segons

disponibilitat) per barrejar-los amb el sulfat sòdic prèviament activat. En el cas dels mol·luscos, s'han emprat *pools* amb varis individus de la mateixa mida i localitat per obtenir un quantitat de mostra acceptable. Després d'homogeneïtzar-ho tot bé, s'ha introduït en un cartutx de cel·lulosa rentat i s'ha realitzat una extracció amb Soxhlets emprant 100 ml de n-hexà:diclorometà (4:1) i 100 µl de TBB i PCB-200 com a patrons de recuperació. Aquesta extracció s'ha realitzat durant 18 hores.

Posteriorment, dels 100 ml extrets s'ha extret una alíquota de 20 ml per a realitzar l'anàlisi del contingut de lípids i la resta (80 ml) s'han concentrat amb evaporació en rotació per buit fins a un volum de 2 ml. A continuació s'ha procedit a realitzar la purificació amb àcid sulfúric afegint-ne 2 ml i vortejant el tub per homogeneïtzar les mostres. El pas següent ha estat centrifugar 5 minuts entre 4000 i 5000 r.p.m i comprovar que s'ha eliminat qualsevol emulsió formada a la interfase. Després es descarta la fase d'àcid sulfúric i s'afegeixen 2 ml més per repetir el procés. Aquesta etapa es repeteix fins que s'aconsegueix una fase transparent d'àcid (entre 2 i 5 vegades normalment).

Es recull el sobrenedant (fase de n-hexà) i s'acumula en un baló fent-lo passar per una petita columna de sulfat sòdic que evitarà recollir qualsevol resta d'àcid sulfúric. Per assegurar-nos de que no es perd res, s'ha extret de nou la darrera fase d'àcid sulfúric descartada amb n-hexà tres vegades més repetint aquest cicle. Per acabar, tot el n-hexà acumulat al baló es concentra per evaporació de rotació en buit fins aconseguir volums inferiors a 1 ml. Aquestes solucions s'han transferit a vials d'injecció i s'evaporen a volums de 50 µl sota un corrent de nitrogen a temperatura ambient. Finalment, l'extracte concentrat es dissol amb isoctà per a procedir a l'anàlisi instrumental.

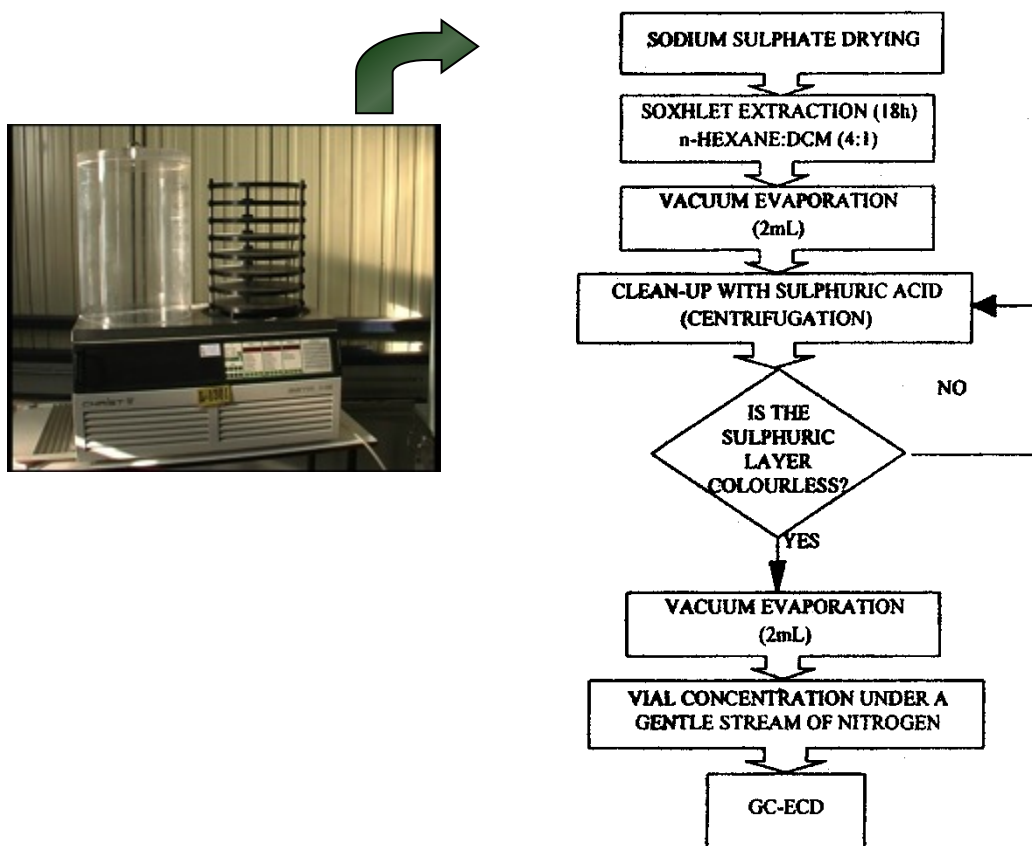


Figura 3.53. Esquema del protocol seguit per realitzar l'extracció de les mostres amb Soxhlet. En el cas dels macròfits ha estat necessari un procés de liofilització prèvi.



Figura 3.54. Resum gràfic del protocol seguit per realitzar l'extracció de la majoria de mostres biològiques emprant una bateria de Soxhlets.

3.3 Tècniques cromatogràfiques

3.3.1 Cromatografia de gasos amb detecció de captura d'electrons (GC-ECD)

La cromatografia de gasos amb detecció de captura d'electrons és idònia per a l'estudi de la majoria de COPs analitzats en aquesta tesi. S'ha emprat aquesta tècnica per obtenir les concentracions de PeCB, HCB, HCHs (4 isòmers), DDTs (6 metabòlits) i PCBs (7 congèneres). L'equip utilitzat és un cromatògraf de gasos de la casa Agilent Technologies model 6890N (Agilent, Palo Alto, CA, USA). El gas portador ha estat l'heli amb un cabal de 1.5 ml per minut i el nitrogen com a gas auxiliar pel detector a un cabal de 60 ml per minut. La columna capil·lar ha estat una de sílice fosa amb una fase estacionària DB-5 (5% fenil – 95% metilsiloxà) de 60 metres de longitud i 0.25 mm de diàmetre intern amb paret recoberta per la fase estacionària de 0.25 µm de gruix (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Les condicions de treball han estat amb injecció automàtica de 2 µl en mode *splitless* (amb *split* tancat durant 0.5 minuts), temperatura de l'injector de 280°C mentre que la temperatura del detector ha estat de 320°C. La rampa de temperatura del forn ha començat als 90°C durant 2 minuts. A continuació s'ha realitzat una rampa de 15°C per minut fins assolir els 130°C i s'ha acabat amb una nova rampa de 4°C el minut fins arribar als 290°C finals, que s'han mantingut durant 20 minuts. En total, el temps cromatogràfic ha estat de 65 minuts. A la figura 3.55 hi ha un cromatograma obtingut després la injecció del patró de la mescla de tots els compostos que s'han analitzat amb les condicions descrites.

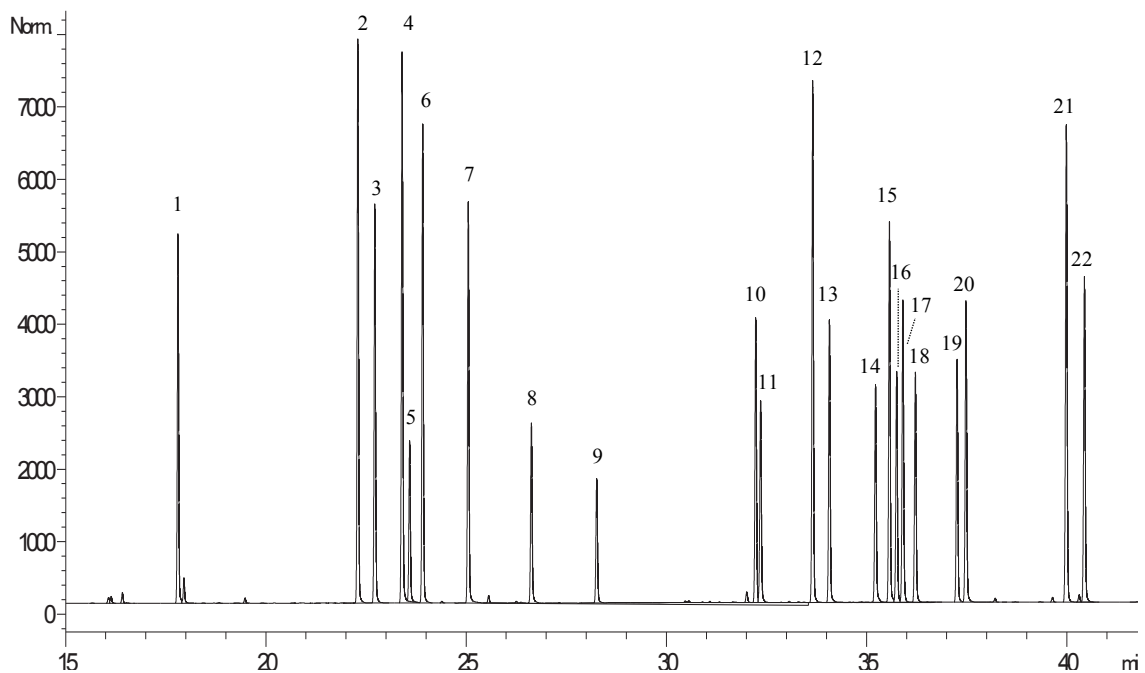


Figura 3.55. Cromatograma d'una mescla de COPs analitzada amb GC-ECD. (1: PeCB, 2: α -HCH, 3: HCB, 4: TBB, 5: β -HCH, 6: γ -HCH, 7: δ -HCH, 8: PCB-28, 9: PCB-52, 10: *o,p'*-DDE, 11: PCB-101, 12: *p,p'*-DDE, 13: *o,p'*-DDD, 14: PCB-118, 15: *p,p'*-DDD, 16: *o,p'*-DDT, 17: PCB-142, 18: PCB-153, 19: *p,p'*-DDT, 20: PCB-138, 21: PCB-200, 22: PCB-180).

3.3.2 Cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses amb ionització química d'ions negatius (GC-NICI-MS)

Per estudiar els PCEs s'ha emprat la cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses funcionant amb el sistema d'ionització química en mode negatiu (GC-NICI-MS). L'equip emprat és un HP 5973 MSD (Agilent, Palo Alto, USA). En aquest cas, les característiques de la tècnica analítica són diferents.

Per als PCEs, el gas portador ha estat l'heli amb un flux de 1.0 ml per minut i l'amoníac ha actuat com a gas reactiu a una pressió de $1.4 \cdot 10^{-4}$ Torr. S'ha utilitzat una columna capil·lar de sílice fosa amb fase estacionària DB-5 (5% fenil – 95% metilsiloxà) de 60 metres de longitud i 0.25 mm de diàmetre intern amb una paret recoberta per fase estacionària de 0.25 μ m de gruix (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). S'ha treballat amb injecció automàtica de 2 μ l, en mode *splitless* (amb *split* tancat durant 0.5 minuts), i temperatures de l'injector, font d'ionització i línia de transferència de 280°C, 176°C i 280°C, respectivament. En aquest cas, la rampa de temperatures del forn s'ha programat per començar a 90°C durant 1 minut i després augmentar la temperatura fins als 130°C a un ritme de 12°C per minut. Finalment, un cop assolida la temperatura, s'ha realitzat una segona rampa de 7°C per minut fins arribar als 310°C, on s'ha mantingut la temperatura durant 10 minuts. El temps total d'anàlisi cromatogràfica ha estat de 40 minuts per mostra. El *dwell time* ha estat de 50 ms per canal.

S'ha treballat amb el mode selectiu d'ions (SIM). Per quantificar cada compost s'han emprat 2 ions, el de quantificació i el de confirmació (taula 3.4). Per identificar aquests ions s'han analitzat patrons dels compostos que es volien estudiar en el mode *full scan*, i s'han obtingut els espectres de masses. El cromatograma de la figura 3.56 mostra el perfil d'elució dels diferents congèneres de PCEs analitzats (Carrizo i Grimalt, 2009).

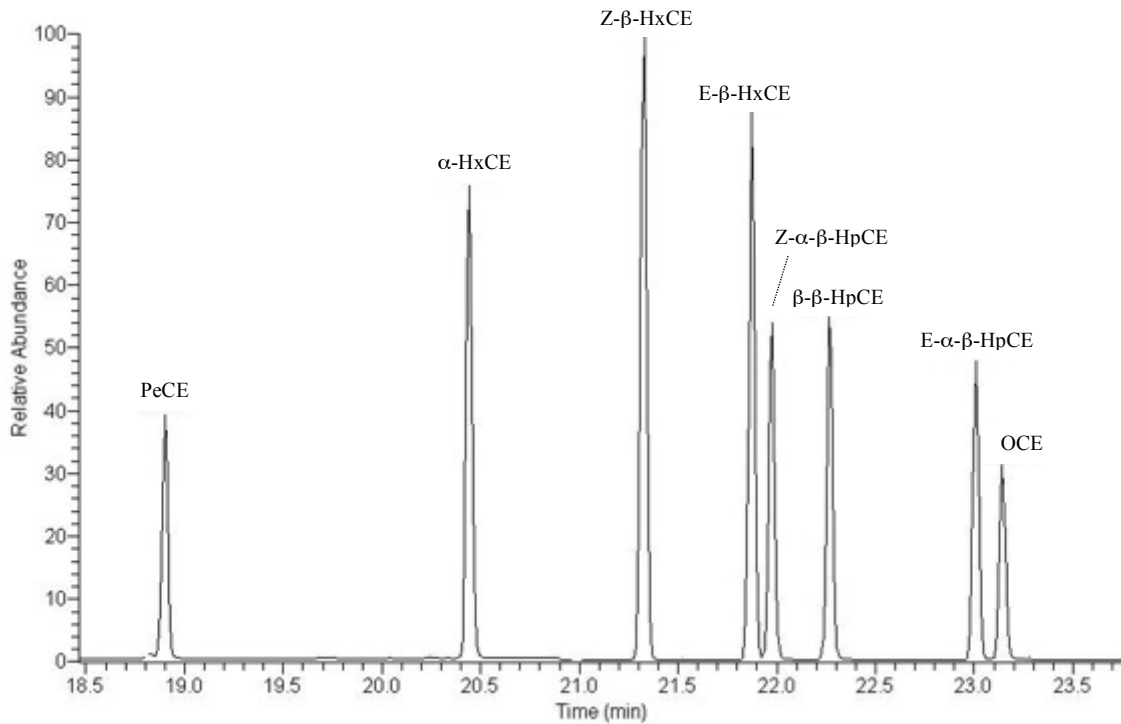


Figura 3.56. Cromatograma d'una mescla de PCEs analitzada amb GC-NICI-MS.

Els ions emprats per la quantificació i confirmació dels compostos estudiats (PCEs) es troben resumits a la taula 3.3.

Taula 3.3. Compostos estudiats per GC-NICI-MS amb els ions de quantificació i confirmació emprats.

Congènere	Ió de quantificació	Ió de confirmació
PCEs		
Pentacloroestirè	241	276
α -hexacloroestirè	274	276
Z- β -hexacloroestirè	276	310
E- β -hexacloroestirè	276	310
Z- α - β -heptacloroestirè	276	310
β - β -heptacloroestirè	276	310
E- α - β -heptacloroestirè	276	310
Octacloroestirè	308	310

3.3.3 Qualitat de la metodologia analítica i anàlisi estadístic

Per quantificar els compostos organoclorats PeCB, HCB, HCHs, DDTs i PCBs amb GC-ECD, s'ha emprat una corba de calibratge externa amb diferents concentracions conegudes de tots els compostos (de 0.5 a 250 ng/ml). S'ha emprat el PCB-142 com a patró intern ja que aquest

compost no es troba a les mostres analitzades. Com a patrons de recuperació s'han emprat el TBB, per als compostos més volàtils, i el PCB-200 per aquells menys volàtils. Els percentatges de recuperació en cada una de les diferents metodologies analítiques es troben resumits a la taula 3.4.

En el cas dels PCEs, també s'han emprat corbes de calibratge amb GC-NICI-MS i de diferents concentracions conegudes (Taula 3.3) i s'ha utilitzat el PCB-142 com a patró intern i el TBB i PCB-200 com a patrons de recuperació.

L'addició de patrons de recuperació permet avaluar les pèrdues de l'analit durant el tractament de la mostra i la correcció posterior de les dades obtingudes. És important doncs, que aquests compostos tinguin unes característiques físiques i químiques semblants als compostos que es volen estudiar i que no siguin a les mostres. A més, s'han controlat les possibles variacions del factor de resposta del detector amb injecció d'una mescla estàndard cada cert número de mostres analitzades. Si la variació era superior al 20% s'ha tornat a injectar la corba de calibratge per continuar amb les mostres a analitzar (Quiroz, 2009).

Taula 3.4. Mitjanes dels percentatges de recuperació i desviació estàndard per compost segons la metodologia analítica emprada.

Matriu i compost	Percentatge de recuperació	Desviació estàndard
Sediment		
TBB	55	2
PCB-200	104	17
Fitoplàncton		
TBB	60	15
PCB-200	117	23
Resta de matrius		
TBB	60	14
PCB-200	89	24

S'han realitzat blancs analítics de procediment per cada sèrie de mostres. La quantificació dels blancs s'ha fet servir per calcular els límits de quantificació (LOQ) i els límits de detecció (LOD). El LOD d'un compost es defineix com la mitjana de la concentració d'aquell compost en els blancs més tres vegades la desviació estàndard. I el LOQ, és la mitjana de la concentració d'aquell compost en els blancs més cinc vegades la desviació estàndard.

$$\text{LOD} = \text{Mitjana} \pm 3\text{DS}$$

$$\text{LOQ} = \text{Mitjana} \pm 5\text{DS}$$

Quan no es pot detectar cap senyal en els blancs dels analits desitjats, els LODs i LOQs es calculen a partir de la mitjana de l'alçada de resposta del soroll a prop dels pics dels analits en unes quantes mostres diluïdes. En el cas d'aquesta tesi, en emprar tres tècniques analítiques

diferents, els LODs i LOQs varien tot i mantenir-se dins dels mateixos ordres de magnitud. Tots ells es descriuen a les taules 3.5; 3.6 i 3.7.

Taula 3.5. Límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ) dels compostos analitzats per GC-ECD i GC-NICI-MS (en cursiva) en mostres de sediment (ng/g pes sec).

Compost	LOD	LOQ
PeCB	0.290	0.420
HCB	0.136	0.162
α -HCH	0.456	0.599
β -HCH	0.276	0.340
γ -HCH	0.112	0.120
δ -HCH	0.568	0.818
<i>o,p'</i> -DDE	0.254	0.335
<i>p,p'</i> -DDE	0.137	0.147
<i>o,p'</i> -DDD	0.188	0.217
<i>p,p'</i> -DDD	0.119	0.127
<i>o,p'</i> -DDT	0.385	0.526
<i>p,p'</i> -DDT	0.813	1.165
PCB-28	0.533	0.738
PCB-52	0.234	0.256
PCB-101	0.316	0.463
PCB-118	0.164	0.182
PCB-138	0.120	0.127
PCB-153	0.190	0.255
PCB-180	0.091	0.095
<i>PeCE</i>	<i>0.0018</i>	<i>0.0021</i>
<i>α-HxCE</i>	<i>0.0060</i>	<i>0.0084</i>
<i>Z-β-HxCE</i>	<i>0.0005</i>	<i>0.0005</i>
<i>E-β-HxCE</i>	<i>0.0043</i>	<i>0.0060</i>
<i>Z-α-β-HpCE</i>	<i>0.0027</i>	<i>0.0034</i>
<i>β-β-HpCE</i>	<i>0.0010</i>	<i>0.0011</i>
<i>E-α-β-HpCE</i>	<i>0.0011</i>	<i>0.0016</i>
<i>OCE</i>	<i>0.0113</i>	<i>0.0155</i>

Taula 3.6. Límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ) dels compostos analitzats per GC-ECD i GC-NICI-MS (en cursiva) en mostres de fitoplàncton (ng/g pes sec).

Compost	LOD	LOQ
PeCB	0.382	0.512
HCB	0.154	0.180
α -HCH	0.354	0.498
β -HCH	0.321	0.386
γ -HCH	0.118	0.126
δ -HCH	0.745	0.995
<i>o,p'</i> -DDE	0.311	0.393
<i>p,p'</i> -DDE	0.144	0.154
<i>o,p'</i> -DDD	0.167	0.196
<i>p,p'</i> -DDD	0.125	0.133
<i>o,p'</i> -DDT	0.485	0.626
<i>p,p'</i> -DDT	1.062	1.414
PCB-28	0.678	0.882
PCB-52	0.217	0.240
PCB-101	0.420	0.566
PCB-118	0.177	0.195
PCB-138	0.115	0.122
PCB-153	0.236	0.301
PCB-180	0.089	0.092
<i>PeCE</i>	<i>0.0020</i>	<i>0.0024</i>
<i>α-HxCE</i>	<i>0.0043</i>	<i>0.0067</i>
<i>Z-β-HxCE</i>	<i>0.0004</i>	<i>0.0005</i>
<i>E-β-HxCE</i>	<i>0.0030</i>	<i>0.0048</i>
<i>Z-α-β-HpCE</i>	<i>0.0022</i>	<i>0.0029</i>
<i>β-β-HpCE</i>	<i>0.0009</i>	<i>0.0010</i>
<i>E-α-β-HpCE</i>	<i>0.0014</i>	<i>0.0019</i>
<i>OCE</i>	<i>0.0082</i>	<i>0.0125</i>

Taula 3.7. Límits de detecció (LOD) i quantificació (LOQ) dels compostos analitzats per GC-ECD i GC-NICI-MS (en cursiva) en mostres de zooplàncton, macròfits, crustacis, mol·luscos, peixos i aus (ng/g pes fresc).

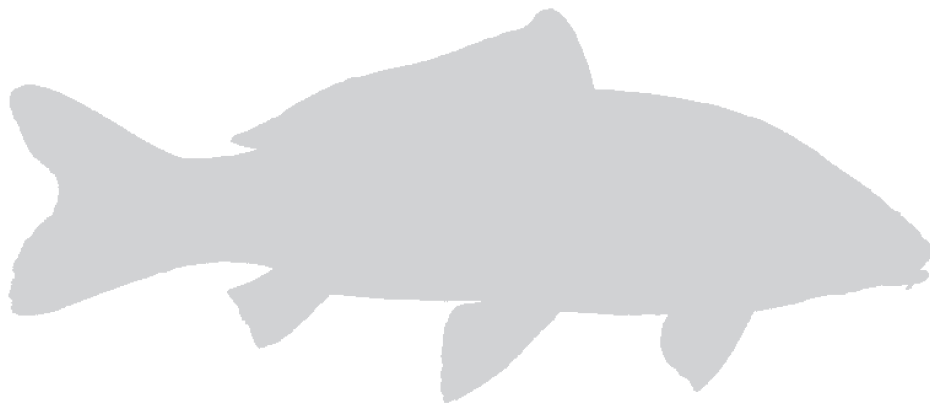
Compost	LOD	LOQ
PeCB	0.256	0.399
HCB	0.621	0.990
α -HCH	0.372	0.517
β -HCH	0.183	0.288
γ -HCH	0.337	0.478
δ -HCH	0.545	0.758
<i>o,p</i> '-DDE	0.475	0.729
<i>p,p</i> '-DDE	0.472	0.674
<i>o,p</i> '-DDD	0.428	0.611
<i>p,p</i> '-DDD	0.471	0.674
<i>o,p</i> '-DDT	0.588	0.856
<i>p,p</i> '-DDT	0.574	0.817
PCB-28	0.314	0.486
PCB-52	0.426	0.643
PCB-101	0.248	0.375
PCB-118	0.218	0.331
PCB-138	0.560	0.840
PCB-153	0.185	0.277
PCB-180	0.291	0.423
<i>PeCE</i>	<i>0.0062</i>	<i>0.0092</i>
<i>α-HxCE</i>	<i>0.0045</i>	<i>0.0067</i>
<i>Z-β-HxCE</i>	<i>0.0035</i>	<i>0.0053</i>
<i>E-β-HxCE</i>	<i>0.0060</i>	<i>0.0092</i>
<i>Z-α-β-HpCE</i>	<i>0.0047</i>	<i>0.0070</i>
<i>β-β-HpCE</i>	<i>0.0041</i>	<i>0.0060</i>
<i>E-α-β-HpCE</i>	<i>0.0062</i>	<i>0.0093</i>
<i>OCE</i>	<i>0.0066</i>	<i>0.0096</i>

En relació al tractament estadístic del conjunt de dades, a cada article es detalla la metodologia emprada per cada grup de mostres. Per fer l'anàlisi descriptiva de les concentracions de COPs s'han calculat paràmetres estadístics com les mitjanes, medianes, desviacions estàndard, mitjanes geomètriques, màxims, mínims, etc. Quan les mostres presentaven concentracions d'algun compost per sota dels seus límits de detecció (LOD) o quantificació (LOQ) se'ls ha assignat el valor de la meitat del límit de detecció i quantificació, respectivament, només per realitzar el tractament estadístic. S'ha analitzat la normalitat de les distribucions de les concentracions de tots els contaminants amb la prova de Kolmogorov-Smirnov, i aquells compostos que no presentaven valors dins de la normalitat han estat tractats amb transformacions logarítmiques. En alguns casos en que no s'ha assolit aquest objectiu, o el

número de mostres ha estat baix, s'han emprat proves no paramètriques (Kruskall-Wallis i Mann-Whitney). De forma general, per a totes les proves realitzades s'ha considerat que existeix una significació estadística per probabilitats $p \leq 0.05$. Per treballar les dades estadístiques s'ha fet servir principalment el programa estadístic SPSS en la seva versió 15.0, tot complementant-ho amb altres paquets com Sigmaplot o Stata.

Capítol 4

RESULTATS



A continuació s'inclouen els resultats més rellevants obtinguts amb el treball d'aquesta tesi. A l'apartat 4.1 (article 1) s'estudien els nivells de concentracions de COPs en els primers nivells tròfics de l'embassament de Flix per tal d'establir quins són els principals focus contaminants i com afecten als organismes situats a la part baixa de la xarxa tròfica. També s'ha comparat si hi havia diferències entre els organismes menys mòbils o sèssils que habiten els dos marges de l'embassament, per tenir més informació de l'efecte dels sediments contaminats a la resta de l'entorn. A l'apartat 4.2 (articles 2 i 3), s'han inclòs els estudis de concentracions de COPs en silurs al llarg de tot el darrer tram del riu Ebre (130 Km) així com els resultats trobats per 5 espècies de peix diferents que habiten al propi embassament de Flix. En el primer cas, l'ús dels silurs ha permès avaluar l'efecte aigües avall dels sediments contaminats emmagatzemats a l'embassament de Flix. D'altra banda, l'estudi de les concentracions en diferents espècies dins de l'embassament ha permès comprovar quins patrons d'acumulació de COPs tenen les diverses espècies de peix que hi viuen, segons els seus hàbits d'alimentació i comportament. A l'apartat 4.3 (articles 4 i 5), s'ha treballat amb mostres d'ous d'ocell de dues espècies per estudiar quines concentracions de COPs s'hi troben al tram final del riu Ebre. Al tractar-se d'espècies d'alimentació piscícola, es troben al capdamunt de la xarxa tròfica fluvial i poden bioacumular grans quantitats d'aquests compostos i patir-ne els efectes tòxics amb més facilitat. Finalment, a l'apartat 4.4 (article 6), s'han emprat mostres de tots els nivells tròfics recollides a l'embassament de Flix per estudiar com es biomagnifiquen els COPs en aquest punt i poder analitzar en conjunt, quines espècies es veuen més afectades pels contaminants emmagatzemats als sediments que es troben a la llera del riu dins de l'embassament de Flix.

4.1 Concentracions de COPs als primers nivells tròfics de l'embassament de Flix: mol·luscs i crustacis

Resum

S'han calculat les concentracions de COPs als primers organismes de la xarxa tròfica dins de l'embassament de Flix emprant dues espècies invasores: el musclo zebra (*Dreissena polymorpha*) i el cranc de riu americà (*Procambarus clarkii*). S'han aplicat diferents tècniques de presa de mostra i extracció al laboratori adaptant-les a les característiques de cada matriu. Les concentracions de COPs trobades a les dues espècies indiquen una clara influència dels fangs contaminats de l'embassament de Flix. Com a conseqüència de la poca mobilitat d'alguns d'aquests organismes, també s'ha avaluat si hi havia diferències de concentracions entre els dos marges del riu dins de l'embassament. Per alguns COPs, aquestes són significativament diferents tant per als musclos zebra com pels crancs de riu americà. Això mostra la gran influència dels fangs contaminats al marge de la planta clor-àlcali. No s'han trobat grans diferències en els patrons de bioacumulació de COPs entre les dues espècies, tot indicant que ambdues espècies poden patir efectes potencialment negatius de forma semblant.

Abstract

POPs concentrations have been assessed in organisms from first levels of the food web from the Flix water reservoir using two invasive species: zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkia*). Different sampling techniques and extraction methodologies have been applied depending on the matrix characteristics. POPs concentrations found at both species indicate a clear influence from the polluted sediments stored at Flix water reservoir. Due to low mobility from some of these organisms, differences in concentrations between river margins have been assessed inside the reservoir. Significant differences have been found for some groups of POPs in both zebra mussel and crayfish suggesting a great influence from the polluted sediments at the chlor-alkali plant margin. No significant differences have been found between the bioaccumulation patterns of both species, indicating that they can suffer potential negative effects in a similar way.

4.1.1 Article 1

Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain)

Melisa Faria¹, David Huertas¹, David X. Soto², Joan Grimalt¹, Jordi Catalan², Mari Carmen Riva³, Carlos Barata¹

¹*Department of Environmental Chemistry, IDÆA -CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain*

²*Limnology Unit, Center for Advanced Studies of Blanes, CEAB-CSIC,
Accés Cala St. Francesc, 14, 17300-Blanes, Spain*

³*Laboratory of Environmental Toxicology, Intexter-CRIT-UPC
CN 150 Km 15, 08227, Terrassa, Spain*

Article published at: Chemosphere





Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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

Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain)

Melissa Faria^a, David Huertas^a, David X. Soto^b, Joan O. Grimalt^a, Jordi Catalan^b, Mari Carmen Riva^c, Carlos Barata^{a,*}

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

^b Limnology Unit, Centre for Advanced Studies of Blanes, CEAB-CSIC, Accés Cala St. Francesc, 14, 17300 Blanes, Catalonia, Spain

^c Laboratory of Environmental Toxicology, (Intexter), Centre for Research and Innovation in Toxicology (CRIT), Technical University of Catalonia (UPC), CN 150 Km 15, 08227 Terrassa, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2009

Received in revised form 23 September 2009

Accepted 3 November 2009

Available online 1 December 2009

Keywords:

Biomarker
Metals
Organochlorine
Zebra mussel
Crayfish
Oxidative stress

ABSTRACT

Large amounts of industrial waste containing high concentrations of mercury, cadmium and organochlorine residues were dumped in a reservoir adjacent to a chlorine-alkali plant in the village of Flix (Catalonia, Spain), situated at the shore of the lower Ebro river. Effects of these contaminants to aquatic river invertebrates were assessed by integrating analyses of metals and organochlorine residues in field collected zebra mussels and crayfish with a wide range of biomarkers. Biological responses included levels of metallothioneins, activities of ethoxyresorufin-O-deethylase, oxidative stress biomarkers (glutathione content, enzymatic activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione s-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase), levels of lipid peroxidation and of DNA strand breaks. The results obtained evidenced similar response patterns in mussels and crayfish with increasing toxic stress levels from upper parts of the river towards the meander located immediately downstream from the most polluted site, close to the waste dumps. The aforementioned stress levels could be related with concentrations of mercury, cadmium, hexachlorobenzene, polychlorobiphenyls and dichlorodiphenyltrichloroethanes from 4- to 195-fold greater than local background levels. The response of biomarkers to these pollutant concentrations differences was reflected in high activities and levels of antioxidant enzymes, metallothioneins, lipid peroxidation and DNA strand breaks and decreased levels of glutathione.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Due to modern human industrial and agricultural activities a wide range of chemicals are often produced in the proximity of fresh-water systems. The resulting breakdown and by-products from the production process finally end up into the water. Environmental concerns arise on whether the residual concentrations of these compounds represent a risk to human and biota, and whether fresh-water systems meet water quality requirements for society in terms of water supply for human consumption and other activities (e.g. fishery, aquaculture and tourism). A combination of physical, chemical and biological indicators is frequently used to assess water quality (Karr, 1999). But in recent years, there has been a growing awareness of the need to detect and assess the adverse effects of contaminants in inhabiting fauna. Among the

available techniques, the integrated use of chemical analyses and biochemical and cellular responses to pollutants, is a sound procedure for detecting impact of anthropogenic contaminants in fresh-water systems. Moreover, since in real field situations aquatic organisms are currently being exposed to multiple chemical contaminants involving different toxicity mechanisms, each contributing to a final overall adverse effect, the use of a large set of biochemical responses may allow us to identify potential hazardous contaminants in the field (van der Oost et al., 2003; Bocchetti et al., 2008).

The present work is intended to study a heavily industrialized site located at the lower course of the Ebro River (Catalonia, Spain). The Ebro catchment is the largest river basin in Spain, covers an area of 85 362 km² and receives the contributions of three million people, including effluents from some heavily industrialized areas. One of these areas is the Flix site, where an organochlorine industry operates since the end of the 19th century. This long operational period, along with the construction of a dam next to the

* Corresponding author. Tel.: +34 934006100.
E-mail address: cbmqam@cid.csic.es (C. Barata).

factory around 1947, resulted in the accumulation of high amounts of heavy polluted sediments in the adjacent riverbed (Fernández et al., 1999). Previous studies have reported that fish collected near Flix had their reproduction, metallothionein and biotransformation enzymatic system altered (Lavado et al., 2006). Within this context, the present work was designed to integrate chemical analyses and biochemical effects of the contaminants present in Flix in two aquatic invertebrate species, the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the crayfish (*Procambarus clarkii*).

Zebra mussel first colonized the lower part of Ebro river in 2001 and now is probably the most abundant invertebrate species in the river system. Furthermore, in a recent study, the use of a large set of biochemical responses allowed to identify specific and distinctive patterns of responses of *D. polymorpha* to organochlorine and metallic contaminants in the lab (Faria et al., 2009). The crayfish species *P. clarkii* is also an introduced and abundant species within the Ebro river basin that have been widely used to monitor environmental contaminants (Escartin and Porte, 1996; Fernandes et al., 2002; Vioque-Fernández et al., 2007). The presence of a sessile filter feeder mussel and a free swimming omnivorous crustacean allows assessing whether differences in feeding regime and in life history strategies are reflected in diverse biochemical responses.

Contaminant analyses included organochlorine compounds and mercury (Hg) in whole mussels or crayfish muscle due to their close association with the chlorine-alkali industry (Fernández et al., 1999; Carrasco et al., 2008). Additionally other metals (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr, As) were also considered to account for agricultural activities occurring in the area (Mañosa et al., 2001). Previous studies have shown that crayfish muscle is one of the preferential bioaccumulation tissue for organochlorine and metallic compounds (Fernandes et al., 2002; Higuera et al., 2006). Unfortunately, mussels in general have little distinctive muscle tissue, thus, whole organisms are usually analyzed (Riva et al., 2008). Biomarkers included the xenobiotic metabolizing phase I enzyme ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity that has been successfully correlated to exposure of crayfish to PCBs (Fernandes et al., 2002); the phase II glutathione S-transferase activity (GST); glutathione (GSH) levels and glutathione reductase, which aids maintenance of GSH levels recycling oxidized glutathione; metallothionein proteins as a marker for metal exposure; antioxidant enzymes involved in detoxifying reactive oxygen species and markers of oxidative tissue damage (lipid peroxidation and DNA strand breaks) (Faria et al., 2009). The above mentioned biomarkers were measured in the main detoxification organ of mussels (digestive gland) and crayfish (hepatopancreas) (Fernandes et al., 2002; Bocchetti et al., 2008). Finally the activity of B esterases was also measured to diagnose exposure to organophosphorous pesticides among other chemicals (Barata et al., 2004). These enzymes were determined in innervated tissues related to food intake: gills in mussels due to their role in filtering and the abductor muscle of crayfish due to its involvement in swimming and hence on foraging behavior (Escartin and Porte, 1996, 1997).

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and preparation

Zebra mussels with shell lengths of 3.3 ± 0.1 cm were collected from five locations in May 2006 by a scuba diver at 3–5 m depth and transported immediately to the lab (Fig. 1). Locations included sites in front of the factory close to the waste dumping site (FT), in front of the Sebes Nature Reserve of Flix located on the river bank opposite to the factory (SR), 2 and 6 km downstream the Flix reservoir dam in the meander (MD) and in front of Ascó village

(AV), respectively, and a reference site (UP) at Riba-roja reservoir dam, which is a large water reservoir (210 Hm³) in the Ebro River, that is situated 10 km upstream from the Flix dam. Crayfish individuals (35 ± 2 g w.w.) were only captured by a hand net on UP, FT and SR sites due to their absence in the other locations. Several physicochemical water parameters were measured during sampling including temperature, oxygen levels, conductivity and pH using hand millimeter probes (CRISON Instruments, Alella, Barcelona).

Just (<1 h) after collection, gills of mussels, digestive glands of mussels and crayfish and muscle tissue of crayfish were dissected and frozen in liquid nitrogen for biochemical determinations. Due to sample constraints, tissue pools of five individuals were used in mussels. Additional samples of whole mussels and individual crayfish abdominal muscles were also collected at each studied site to determine metal and organochlorine residue levels. From 7 to 10 replicates of individual or pools of samples were used for biochemical determinations. For chemical analyses the number of replicates was 3 and 10 for mussel and crayfish, respectively.

2.2. Chemical analyses

For metal analysis, tissue samples were freeze dried prior to digestion. Levels of Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb and Hg were determined in acid digested samples by Perkin Elmer model Elan 6000 inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) following Barata et al. (2005) methods. Samples of similar weight of a certified reference material of dogfish muscle (NRC-DORM-2; LGC Promochem, Middlesex, UK) were digested during each analytical run and measured trace metal concentrations were within the certified range for the metal. Detection and quantification limits were calculated from blank measurements and varied slightly across metals being between 0.003–0.3 and 0.003–0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively.

Organochlorine compounds were extracted and analyzed following minor modifications of procedures described elsewhere (Catalan et al., 2004). Pools of soft tissue from zebra mussel individuals (10–20 individuals) and individual crayfish muscle samples (0.7–2.9 g) were ground with activated sodium sulphate and Soxhlet-extracted with *n*-hexane:dichloromethane (4:1 v/v). At this step, 1,2,4,5-tetrabromobenzene (TBB) and PCB 200 were added as recovery standards. Extracts were concentrated under vacuum and clean-up with sulphuric acid. The final sulphuric acid mixture was re-extracted with *n*-hexane, evaporated just to dryness under a gentle stream of nitrogen and re-dissolved in 50 μL of isoctane for instrumental analysis.

Hexachlorobenzene (HCB), α -, β - and γ -hexachlorocyclohexanes (HCHs), the PCB congeners No. 28, 52, 101, 118, 153 and 180 and *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT were analyzed in a Hewlett-Packard gas chromatograph Model HP-5890 equipped with an electron-capture detector and an HP-7673-A autosampler. The separation was achieved with a 60 m \times 0.25 mm I.D. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenylmethylpolysiloxane (film thickness 0.25 μm). The oven temperature was programmed from 90 °C (holding time 2 min) to 130 °C at 15 °C min^{-1} and finally to 290 °C at 4 °C min^{-1} , keeping the final temperature for 10 min. Injector and detector temperatures were 280 °C and 320 °C, respectively. Injection was performed in the splitless mode, keeping the split valve closed for 35 s. Helium was the carrier gas (1.5 mL min^{-1}) and nitrogen was used as the make-up gas for the detector (60 mL min^{-1}).

For quantification a solution of PCB 142 was added as internal standard to the vial prior to injection in order to correct for instrumental variability. Calibration curves were performed for each compound to be quantified. The quantitative data was corrected for surrogate recoveries. Mean recoveries of spiked TBB and PCB

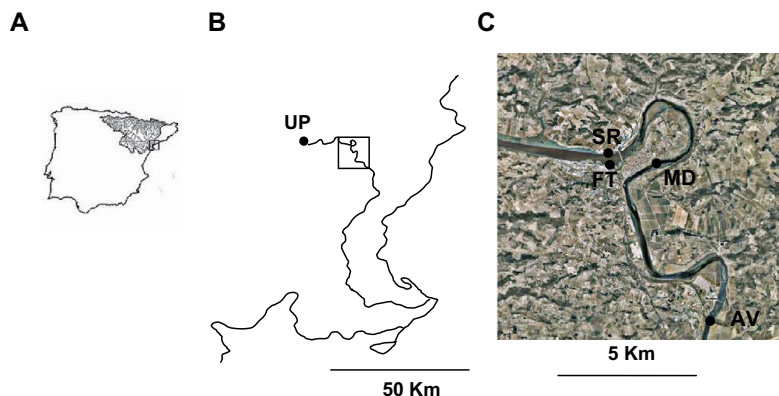


Fig. 1. Site locations within Ebro river basin (A), at the lower course of Ebro river (B), detailed picture of Flix site (C).

200 standards were between $79 \pm 9\%$ and $106 \pm 10\%$, respectively. The quantification of blanks within each batch of analyzed samples was used in order to calculate the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the compounds, these ranged from $0.003\text{--}0.4 \text{ ng g}^{-1}$ for LOD to $0.004\text{--}0.5 \text{ ng g}^{-1}$ for LOQ, on a wet weight basis.

2.3. Biochemical determination

Most biochemical determinations have been described previously (Faria et al., 2009). Hereafter we only provide a brief description. Tissue samples of gills, muscle, digestive gland or hepatopancreas of both species were homogenized in a 1:5 weight:volume (w/v) proportion in ice cold phosphate buffer 100 mM pH 7.4 at 4 °C containing 150 mM KCl and 1 mM EDTA. An aliquot of each homogenate was separated for DNA strand breaks quantification. The remaining homogenates were further centrifuged at 10 000g for 30 min and supernatants were immediately used for determining lipid peroxidation and GSH levels, antioxidant GST and B esterase enzyme activities.

Metallothionein levels (MT) and EROD activity were determined in the cytosolic and microsomal digestive gland/hepatopancreas fractions, respectively. Mussel and crayfish tissue organs were homogenized in 1:5 w/v proportion ice cold 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 20% (w/v) glycerol and supplemented with 0.1 Mm phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) for mussels and with 0.1 mM phenantroline 10 mg mL^{-1} and trypsin inhibitor for crayfish. Homogenates were centrifuged at 10 000g for 30 min. The resulting supernatant was further centrifuged at 100 000g for 60 min to obtain the cytosolic (supernatant) and microsomal (pellet) fractions. Crayfish microsomal pellets were then resuspended in a 2:1 (w/v) proportion of 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 20% (w/v) glycerol 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT) 0.1 mM phenantroline 10 mg mL^{-1} and trypsin inhibitor. Cytosolic and microsomal proteins were measured by the Bradford method (Bradford, 1976) using γ -globulin as standard.

CAT measurements were carried out using a spectrophotometer Cecil-CE 9200 (Cambridge, England) at $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, whereas all the rest of the biomarkers were determined using a Multi-Detection Micro-plate Reader, BioTek® (Vermont, USA). Assays were run at least in duplicate for CAT and quadruplicate for the rest of the biomarkers. EROD activity was determined in the microsomal fraction

of crayfish digestive gland. Essentially, $10 \mu\text{L}$ microsomes were incubated in $300 \mu\text{L}$ of 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.25 mM NADPH, and $4.15 \mu\text{M}$ 7-ethoxyresorufin at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min. The increase in fluorescence resulting from 7-hydroxyresorufin formation was measured at an excitation/emission wave length of 530 nm/590 nm. Quantification was achieved with standard additions of 7-hydroxyresorufin and EROD activity was expressed as fmoles of resorufin $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of total assay proteins. Metallothionein levels were determined by means of a kit – Micro MT spec (Ikzus Environment, Italy), according to Viarengo et al. (1997), based on the colorimetric determination of cysteine residues using the Ellman's reagent. Results were then converted to protein levels (pmol of metallothionein) considering that crayfish and zebra mussels have 18 and 23 cysteine residues, respectively, in each molecule of metallothionein (data provided by the kit manufacturer). CAT activity was measured by the decrease in absorbance at 240 nm due to H_2O_2 consumption ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), in a reaction solution containing 80 mM phosphate buffer, pH 6.5 and 50 mM H_2O_2 . SOD activity was based on the measurement of the degree of inhibition of cytochrome c reduction by free oxygen radicals (O_2^-) released by xanthine oxidase/xanthine reaction. The reaction contained 50 mM phosphate buffer, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 23 μM xanthine, 1.7 mU mL xanthine oxidase and 10 μM cytochrome c. SOD units were determined using a standard curve of 0–2 SOD units mL^{-1} and expressed as U mg^{-1} of total protein. GST activity towards 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was measured in a reaction mixture containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM CDNB and 1 mM GSH. Activity calculation was determined using GST's extinction factor coefficient of $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Glutathione peroxidase activities were measured in reaction mixture containing 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), 2 mM GSH, 2 U glutathione reductase, 0.12 mM NADPH, sodium azide (0.5 mM), 0.2 mM H_2O_2 and 3 mM cumene hydroperoxide (CHP). GPX activity was monitored by following the decrease in NADPH concentration (extinction coefficient $6.2 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), which is consumed during the generation of GSH from oxidized glutathione, using H_2O_2 (Se dependent activity) and cumene hydroperoxide (total GPX) as substrate. Glutathione reductase (GR) activity was also determined by following the decrease of NADPH (0.07 mM), which is consumed by GR during the reduction of oxidized glutathione (0.7 mM). Quantification of GSH was determined fluorometrically using monochlorobimane according to Faria et al. (2009). Results were expressed as nmol GSH per g of tissue wet weight. Lipid peroxidation was determined

using the malondialdehyde (MDA) assay using the reaction of the chromogenic reagent 1-methyl-2-phenylindole with MDA at 45 °C, giving rise to a chromophore with absorbance at 586 nm. Final results were expressed in nmol MDE equivalents g⁻¹ wet weight of tissue. DNA strand breaks were quantified using the DNA alkaline precipitation assay in a reaction solution containing SDS (1%), 50 mM sodium hydroxide (NaOH), 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.06 M of potassium chloride (KCl). After centrifugation at 10 000g, levels of single and double-stranded DNA fragments remaining in the supernatant were labeled with hoescht dye (bis-Benzimide H 33258, Sigma–Aldrich) in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. The resulting complex was then measured using an excitation/emission wave length of 360/450 nm. Blanks containing identical constituents without homogenate and calf thymus DNA standard were used in order to extrapolate DNA concentration. Final results were expressed as µg of DNA strand breaks per g tissue wet weight.

Esterase activity was determined in the gills of zebra mussel and in muscle tissue of crayfish. Acetylthiocholine iodide (ASCh) (2 mM) and S-Phenyl Thioacetate (3 mM) were used as substrates for cholinesterase and carboxylesterase enzyme activities, respectively. Final results were expressed in nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein using the extinction coefficient 13.6 M⁻¹ cm⁻¹.

2.4. Data analysis

Quantile plots, Shapiro–Wilk and Bartlett's tests did not denoted significant (P < 0.05) deviations from normality of measured data. Bartlett's and Levene's tests, however, indicated heterocedastic variances across sites. Therefore, provided the quite large sample size used for biomarker determinations (n = 7–20), data was first log transformed to meet variance homocedasticity and then differences across sites were compared by one way ANOVA followed by post hoc Tukey's multiple comparison tests (Zar, 1996). Due to the small sample size of some contaminant residue analyses (n = 3), differences in contaminant residues across sites were compared by non-parametric procedures using either Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests followed by post hoc Tukey's like multiple comparison tests (Nemenyi tests sensu; Zar, 1996).

Finally, variability patterns across biological samples (n = 7) of contaminant residues (i.e. organochlorine and metallic levels) and of biomarker responses were assessed using Principal Component Analysis (PCA). To account for scale differences between species and variables, data was first log transformed and then auto-scaled prior to analysis (within each species each element was subtracted by its column mean and divided by the standard deviation of its column). To minimize the number of empty spaces in the dataset, not detected contaminant levels were converted to ½ of the detection limit.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical water parameters and contaminant residues

Physicochemical minimum and maximum water parameters including temperature, pH, conductivity and oxygen levels varied little across sites changing between 18.2–20.1 °C, 7.74–8.02, 913–1184 µS cm⁻¹ and 6.35–8.75 mg O₂ L⁻¹, respectively (values taken 10 m offshore, 2 m deep and at 10 am).

The concentrations of heavy metals and organochlorine compounds determined in mussels and crayfish inhabiting the sites affected by the chlorine-alkali industry (Table 1) showed that these species were exposed to complex mixtures of pollutants. In both species caught near the factory (FT), organochlorine compounds

Table 1 Metal (µg g⁻¹ d.w.) and organochlorine (ng g⁻¹ w.w.) contaminant levels measured in pools of whole mussels and muscle of crayfish individuals collected across the studied sites. Data are reported as the mean and standard error. Sample size was 3 and 10–12 for mussels and crayfish, respectively. Organochlorine compounds are reported as hexachlorobenzene (HCB) and the sum of six DDT congeners, three hexachlorocyclohexanes (HCH) and seven polychlorobiphenyls (PCBs). Different letters indicate significant (P < 0.05) differences following the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests depicted in Table 2.

Sites	N	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb	Hg	HCB	DDT	HCH	PCB
		Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE	Mean ± SE
Zebra mussel (<i>D. polymorpha</i>)													
UP	3	0.62 ± 0.15 a	9.77 ± 1.68 a	7.91 ± 1.18 a	92.50 ± 9.56 a	6.19 ± 0.12 c	0.31 ± 0.03 a	0.50 ± 0.15 a	0.10 ± 0.03 a	0.41 ± 0.02 a	5.34 ± 1.04 a	0.51 ± 0.29 a	6.82 ± 1.65 a
SR	3	0.97 ± 0.01 b	10.12 ± 0.22 a	19.05 ± 0.56 b	89.11 ± 3.40 a	4.96 ± 0.08 a	0.56 ± 0.05 a	0.60 ± 0.01 a	0.25 ± 0.01 a	11.45 ± 2.75 b	134.25 ± 18.39 b	0.34 ± 0.11 a	23.23 ± 2.98 b
FT	3	0.99 ± 0.01 b	25.34 ± 2.49 b	35.75 ± 0.90 c	129.83 ± 5.29 b	4.84 ± 0.08 a	1.87 ± 0.42 b	0.71 ± 0.01 a	3.01 ± 0.11 d	78.41 ± 17.93 c	317.16 ± 53.26 c	6.08 ± 2.24 b	104.56 ± 13.54 c
MD	3	1.3 ± 0.05 c	37.77 ± 7.12 b	30.52 ± 2.38 c	136.38 ± 13.43 b	5.35 ± 0.03 b	3.96 ± 0.13 c	0.77 ± 0.09 a	0.87 ± 0.01 c	18.92 ± 2.40 b	113.86 ± 36.67 b	1.82 ± 0.81 b	109.16 ± 10.97 c
AV	3	1.14 ± 0.05 c	28.49 ± 1.62 b	20.2 ± 0.54 b	114.43 ± 1.22 b	5.13 ± 0.10 b	0.77 ± 0.07 a	0.65 ± 0.01 a	0.41 ± 0.01 b	26.78 ± 3.39 b	123.1 ± 33.16 b	5.58 ± 2.58 b	86.13 ± 16.89 c
Crayfish (<i>P. clarkii</i>)													
UP	10	nd	nd	28.73 ± 4.55 a	69.68 ± 3.53 a	0.72 ± 0.06 a	nd	1.13 ± 0.49 a	0.66 ± 0.10 a	nd	0.42 ± 0.04 a	nd	nd
SR	12	1.55 ± 0.49 a	0.53 ± 0.07 a	19.77 ± 2.07 a	64.54 ± 1.34 a	0.75 ± 0.07 a	nd	nd	1.15 ± 0.12 a	14.14 ± 7.99 a	8.53 ± 2.24 b	2.38 ± 1.02 a	12.45 ± 4.75 a
FT	12	1.42 ± 0.21 a	1.01 ± 0.24 a	19.08 ± 2.05 a	66.92 ± 1.92 a	0.64 ± 0.03 a	nd	0.42 ± 0.04 a	2.67 ± 0.44 b	42.08 ± 11.98 b	62.94 ± 21.45 c	1.42 ± 0.47 a	44.27 ± 11.81 b

nd, not detected; empty spaces are missing values.

(apart from HCH in crayfish) and total Hg were high, whereas only in mussels the same pattern was observed for Cd, Zn, Cr, Ni and Cu (Table 1). Indeed, values of those pollutants closely related with the chlorine-alkali industry (Hg, PCBs, DDTs, HCB) at FT were from 4- to 195-fold greater than the local background levels (UP). Interestingly PCBs, Cr, Ni, Cu, Cd and total Hg residue levels in mussels were higher in the meander (MD) situated 2 km downstream from the dam, than at the opposite river shore of the factory within the Flix water reservoir (SR). This difference illustrates the capacity of the river for downstream transport of pollutants. The concentrations of most measured contaminants at the polluted site (FT, Table 1) were lower or within the range of those found elsewhere in polluted areas. Metal levels reported in zebra mussels (*D. polymorpha*) collected from lakes and rivers in Canada, Belgium and Italy were 10–23 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for Cd, 0.22–0.26 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for total Hg, 183–340 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for Zn, 8–53 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for Ni, 4.5–7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for Cr and 28–40 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. for Cu (De Lafontaine et al., 2000; Rutzke et al., 2000; Camusso et al., 2001; Voets et al., 2006). In crayfish (*P. clarkii*), reported levels of total Hg as high as

9 $\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. were found in one of the world's largest Hg contaminated sites (Almaden, Spain; Higuera et al., 2006). Despite that comparative information regarding organochlorine residue levels in crayfish and mussels is scarce, PCB residues as high as 814–2920 ng g^{-1} w.w. were reported in zebra mussels (*D. polymorpha*) from the Great lakes (Hanari et al., 2004) and reported PCB, DDT, HCB and HCH concentrations in zebra mussels (*D. polymorpha*) from Lake Maggiore were 5000, 4000, 13 and 76 ng g^{-1} lipids, respectively (Binelli and Provini, 2003; Riva et al., 2008). Assuming 11% of lipid content (Binelli and Provini, 2003) and a moisture content of 88% (Carrasco et al., 2008), the previous values corresponded to 82, 66, 0.2 and 1 ng g^{-1} w.w., respectively. In crayfish (*P. clarkii*), Fernandes et al. (2002) found that individuals collected in contaminated rivers from Spain had PCB, DDT, HCB and HCH levels of 16, 1.5, 1.7 and 0.2 ng g^{-1} d.w., respectively (corresponding to 2.4, 0.25, 0.25, 0.03 ng g^{-1} w.w., considering a moisture content of 80%). Gitahi et al. (2002) in crayfish (*P. clarkii*) collected in Lake Naivasha (Kenya) found DDT and HCH concentrations of 9 and 8 ng g^{-1} w.w., respectively.

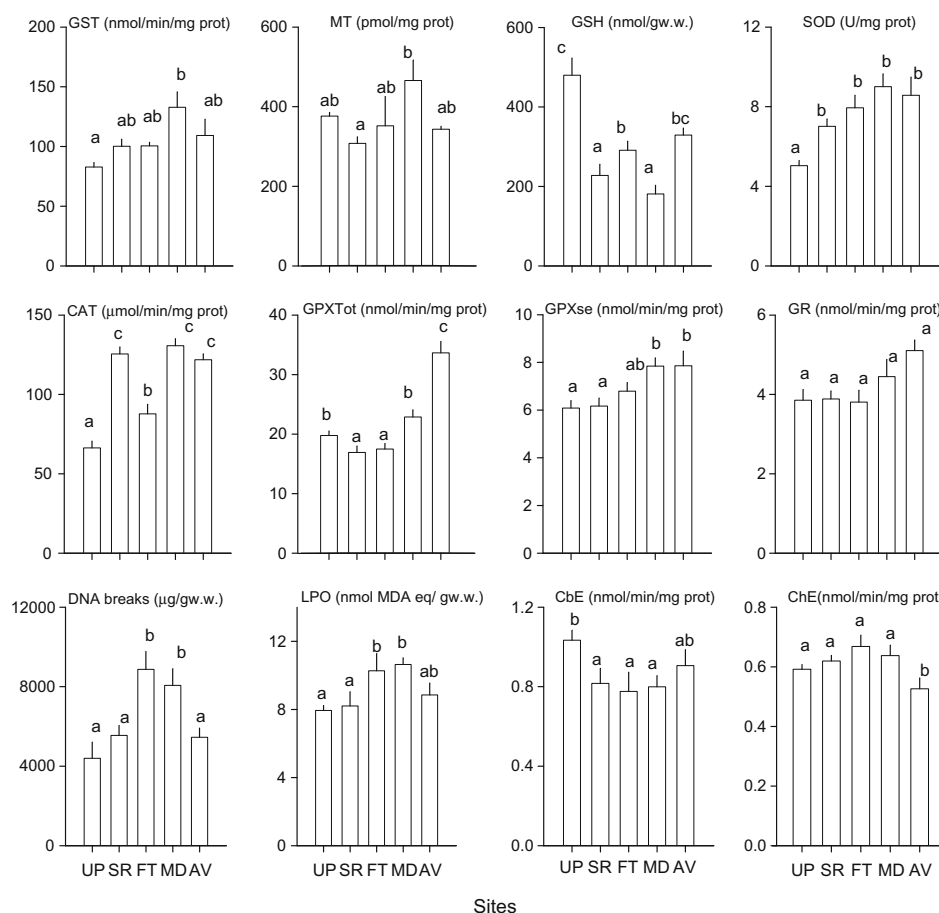


Fig. 2. Levels and activities (Mean \pm SE) of biomarkers in zebra mussels (*D. polymorpha*) collected across the studied Ebro river sites. GST, MT, GSH, SOD, CAT, GPX, GR, DNA breaks, LPO responses were measured in digestive gland, whereas those of CbE and ChE in gills. Different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences across sites following ANOVA and Tukey's post-hoc tests depicted in Table 2.

Table 2

One way ANOVA and non-parametric Kruskal–Wallis (K–W) and Mann–Whitney (M–W) tests results performed on biomarker and contaminant levels of zebra mussel and crayfish. Differences in degrees of freedom are due to differences in sample size and missing values. F, Fisher's coefficient, Sig., significant level.

	df	F	Sig.		df	F	Sig.
ANOVA tests							
Zebra mussel (<i>D. polymorpha</i>)				Crayfish (<i>P. clarkii</i>)			
Digestive gland							
GST	4,54	5,99	<0.001	EROD	2,24	4.12	0.030
MT	4,48	4.83	0.002	GST	2,24	3.63	0.042
GSH	4,54	9.33	<0.001	MT	2,20	4.46	0.025
SOD	4,54	10.60	<0.001	GSH	2,24	12.23	<0.001
CAT	4,54	39.56	<0.001	SOD	2,24	0.59	0.562
GPXTot	4,54	19.97	<0.001	CAT	2,24	8.16	0.002
GPXSe	4,54	5.36	0.001	GPXTot	2,24	1.75	0.196
GR	4,54	2.31	0.069	GPXSe	2,24	1.82	0.184
DNA breaks	4,48	5.39	0.001	GR	2,24	6.31	0.007
LPO	4,50	3.72	0.010	DNA breaks	2,24	4.34	0.025
				LPO	2,24	0.95	0.401
Gills							
CbE	4,54	2.80	0.033	Muscle			
ChE	4,54	3.05	0.025	CbE	2,22	0.37	0.697
				ChE	2,22	0.36	0.705
Non-parametric tests							
Whole individual				Muscle			
Cr	4	K–W	0.011	Cr	1	M–W	0.326
Ni	4	K–W	0.024	Ni	1	M–W	0.126
Cu	4	K–W	0.019	Cu	2	K–W	0.092
Zn	4	K–W	0.023	Zn	2	K–W	0.241
As	4	K–W	0.022	As	2	K–W	0.438
Cd	4	K–W	0.01	Pb	1	M–W	0.157
Pb	4	K–W	0.145	Hg	2	K–W	0.001
Hg	4	K–W	0.011	HCb	1	M–W	0.016
HCb	4	K–W	0.012	DDT	2	K–W	0.001
DDT	4	K–W	0.029	HCH	1	M–W	0.711
HCH	4	K–W	0.028	PCB	1	M–W	0.008
PCB	4	K–W	0.022				

Table 3

Levels and activities (Mean ± SE) of biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*) collected across the studied Ebro river sites. EROD, GST, MT, GSH, SOD, CAT, GPX, GR, DNA breaks, LPO responses were measured in hepatopancreas, whereas those of CbE and ChE in muscle. Different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences across sites following ANOVA and Tukey's post-hoc tests depicted in Table 2.

Biomarkers	Sites		
	UP	SR	FT
EROD (fmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	166.9 ± 39.7 b	64.2 ± 5.6 a	62.1 ± 1.7 a
GST (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	608.6 ± 29.6 a	731.8 ± 36.4 b	686.9 ± 44.9 b
MT (pmol mg ⁻¹ prot)	476.4 ± 46.5 a	566.1 ± 59.8 ab	625.8 ± 56.4 b
GSH (nmol g ⁻¹ w.w.)	3187.2 ± 738.2 b	1021.7 ± 123.7 a	1306.7 ± 324.3 a
SOD (U mg ⁻¹ prot)	7.8 ± 1.1 a	8.2 ± 0.3 a	10.3 ± 1.0 b
CAT (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	413.4 ± 56.0 a	813. ± 84.0 b	678.5 ± 68.2 b
GPXtot (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	29.6 ± 2.0 a	34.6 ± 1.7 a	30.1 ± 1.1 a
GPXse (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	5.3 ± 1.1 a	8.1 ± 1.0 a	7.4 ± 1.6 a
GR (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	5.6 ± 0.8 a	7.5 ± 1.1 b	11.8 ± 2.1 c
DNA breaks (μg g ⁻¹ w.w.)	630.7 ± 27.8 a	789.3 ± 64.9 b	841.0 ± 47.0 b
LPOx (nmol MDA eq g ⁻¹ w.w.)	11.3 ± 2.9 a	13.2 ± 1.3 a	14.4 ± 3.9 a
CbE (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	1.6 ± 0.1 a	1.8 ± 0.2 a	1.8 ± 0.3 a
ChE (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ prot)	3.3 ± 0.4 a	3.8 ± 0.4 a	3.7 ± 0.7 a

3.2. Biomarker responses

The use of a wide battery of biomarkers, allowed to detect biological and potential harmful effects of the chlorine-alkali dumped contaminants into these invertebrate species. In the present study, metallothionein like proteins and EROD activities in digestive glands or hepatopancreas and the activities of B esterases in gills or muscle were used as specific biomarkers of trace metals, co-planar PCBs and organophosphorous/carbamate pesticides, respectively. Variations of antioxidant defences were selected as general stress responses of pollutants, while alterations of lipid peroxidation and genotoxic effects (DNA damage) in digestive glands or hepatopancreas were expected to inform on the onset

of cell damage in field exposed organisms. It is important to note that in zebra mussel it is difficult to extract the digestive gland without excising also some part of the gonads. Hence, biochemical responses measured in the digestive gland are likely to be influenced to some degree by the presence of gonad tissue. Nevertheless, previous field and laboratory studies conducted with zebra mussels exposed to organochlorine compounds and metals, showed that digestive gland biochemical response patterns across pollutants behave similarly to those reported in common mussels (De Lafontaine et al., 2000; Faria et al., 2009).

In mussels, metallothionein levels were higher only in the meander site (MD) and not in other locations (i.e. FT) heavily polluted with metals such as Cd, Hg or Zn (Fig. 2, Tables 2 and 3). In

crayfish, however, the highest metallothionein and metal levels were measured at FT. In zebra mussel Cd and Hg are known to induce the gene expression of metallothioneins and to increase the levels of this protein (Engelken and Hildebrandt, 1999; Lecoœur et al., 2004; Marie et al., 2006; Faria et al., 2009). In other molluscs and crustacean, Hg and Zn are also known to induce the formation of metallothionein proteins (Amiard et al., 2006). Data obtained in crayfish agree with the previous arguments but not entirely in mussel. In the latter species, different contributions of ovarian or testicular tissue within digestive gland samples at FT, especially considering that protein levels could be high in the ovaria, could have decreased the relative amount of metallothionein proteins. Additionally at FT, the presence of a greater proportion of methylmercury, which is known to be a weak metallothionein inducer in zebra mussel (Faria et al., 2009) could also explain the observed results. Indeed in a previous study Carrasco et al. (2008) reported that an important proportion of measured mercury in zebra mussels collected at FT and MD were methylmercury.

The strong and significant decrease of cellular availability of thiol groups observed in exposed mussels and crayfish (Fig. 2, Tables 2 and 3) was of particular interest. Cytosolic GSH provide –SH groups for antioxidant enzymes and chelating functions, representing the first line of defence against many pollutants (Regoli and Principato, 1995; Canesi et al., 1999). In marine organisms acutely exposed to metals, increased levels of GSH have been interpreted as an adaptive strategy to compensate the slower responsiveness of metallothioneins (Regoli and Principato, 1995; Bocchetti et al., 2008). The apparent disagreement between our and previous results was probably related to an unbalance between the use and hence oxidation of GSH by antioxidant enzymes and its biosynthesis and recycling. In the present investigation enzymatic activities that used and oxidized GSH (GST, GPXTot or GPXse) were enhanced in mussels and crayfish collected from contaminated sites (Fig. 2, Tables 2 and 3). Although GR activities, which convert oxidized glutathione (GSSG), to its reduced form (GSH), were unchanged in mussels and increased in exposed cray-

fish (Fig. 2, Tables 2 and 3), the presence of methylmercury could have inhibited the rate-limiting enzyme of GSH biosynthesis, the γ -glutamyl-cysteine synthetase (Canesi et al., 1999). Indeed Carrasco et al. (2008) found high levels of methylmercury in zebra mussels collected at FT site.

In crayfish, EROD activity has been characterized and used successfully to monitor industrial and pesticide pollution in the field (Escartin and Porte, 1996; Fernandes et al., 2002). In the present study the observed decrease of EROD activity (Tables 2 and 3) could be related to the inhibitory effects of Hg and organochlorine residues on this enzyme system (Lavado et al., 2006; Edwards et al., 2007).

Inhibition of B esterases is considered to be specific of exposure to organophosphorous and carbamate compounds. Activities of these enzymes have been well characterized in crayfish and zebra mussels and used to monitor pesticide usage in the field (Escartin and Porte, 1996; Binelli et al., 2006; Vioque-Fernández et al., 2007). In this study the activities of CbE and ChE were inhibited in mussels collected downstream UP and only at AV, respectively but those of crayfish were unchanged (Fig. 2, Table 2). Providing that crayfish cholinesterases are considered to be more sensitive to anticholinergic pesticides than those of mussels (Escartin and Porte, 1997; Binelli et al., 2006; Vioque-Fernández et al., 2007), it is feasible to consider that other factors may have affected the measured activities. Indeed the studies of Frasco et al. (2005) indicated that metals could also inhibit those activities.

A general pathway of toxicity induced by many chemicals (hydrocarbon quinones, nitro-aromatics, biphenyls, metals, Livingstone, 2001; transition metals, Stohs and Bagghi, 1995), relay on the production of reactive oxygen species, leading to a condition of oxidative stress. In the present study the oxidative status of field collected mussels and crayfish was assessed by integrating the activity of antioxidant enzymes with measurements of cell tissue damage. In mussels and crayfish the activities of all antioxidant enzymes but GR or GPX, respectively, increased in those individuals exposed to organochlorine compounds and metals, thus indicating

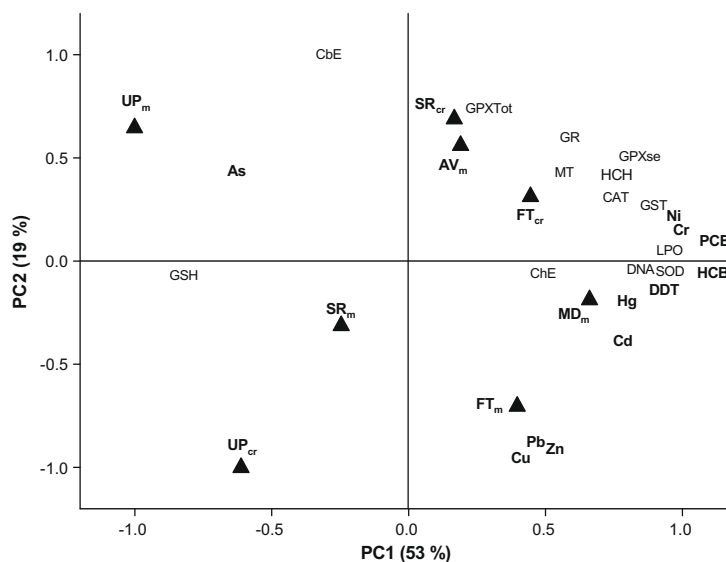


Fig. 3. PCA bi-plots of loadings and site scores for contaminant levels (A) and biomarkers (B) measured in zebra mussels and crayfish collected at the studied sites in Ebro River. The percentage of variance explained by each PC is also depicted. Contaminant and biomarker abbreviations are explained in the text. Site score abbreviations for mussels and crayfish were followed by the subscript m and cr, respectively.

the existence of prooxidant conditions in the contaminated sites (Fig. 2, Tables 2 and 3). Similar patterns have been reported in mussels collected across organochlorine and metallic polluted sites of Hong Kong, Brazilian mangroves and hydrothermal vents (Cheung et al., 2002; Alonso-Torres et al., 2002; Bebianno et al., 2005). Field studies on antioxidant enzyme responses of crustaceans are scarce, but there is also evidence that shrimps and crabs living in locations polluted with metals and PCBs have elevated activities of SOD, CAT and GPX (MacFarlane et al., 2006; Saponjić et al., 2006).

Failure of antioxidant defenses to remove exogenous ROS produced by pollutants either as consequence of inhibition by those compounds or overwhelming by ROS excess, will disrupt the balance of the antioxidant/prooxidant system within the organisms leading to oxidative damage. This is a toxicity phenomenon widely demonstrated in field conditions, which implies the increase in the levels of lipid peroxidation or/and the loss of DNA integrity of the affected organisms (Regoli, 2000; Livingstone, 2001; Regoli et al., 2004). In the present study mussels exposed to high levels of metals and organochlorine compounds had increased levels of lipid peroxidation and DNA strand breaks (Fig. 2, Table 2), whereas in crayfish only the observed increase in DNA damage was significant (Tables 2 and 3). These results clearly evidenced that in those sites contaminated by chlorine-alkali dumping pollutants, prooxidant conditions overwhelmed antioxidant defenses leading to oxidative stress.

3.3. Between species comparison

In summary, in this study the use of a large set of biochemical responses combined with the measurement of contaminant levels in zebra mussels and crayfish allowed to characterize environmental hazards of major contaminants released from a chlorine-alkali industry in river biota. Biochemical responses and pollutant levels have shown that the two species considered in this study exhibit similar bioaccumulation patterns and potential harmful effects. The overall results obtained are summarized in the PCA analysis depicted in Fig. 3 and indicate similar responses for both species. Thus, the horizontal axis (PC1 from left to right) exhibits increasing toxic stress levels from upstream (UP) locations towards the factory margin (FT) and meander sites (MD), diminishing towards the wild reserve margin just opposite to FT (SR) and Ascó village (AV) located 5 km downstream. In both species, the aforementioned stress levels encompass high levels of PCBs, DDTs, HCB and Hg, high activities and levels of antioxidant enzymes, metallothioneins, lipid peroxidation, DNA strand breaks and decreased levels of GSH.

Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Ministry for the Environment, the Catalan Water Agency (ACA) of the Generalitat de Catalunya and the projects CSD2007-00067 and 041/SGTB/2007/1.1. The authors thanks Drs Imanol Cía and Antonio Palau (Universitat de Lleida, Catalunya, Spain) for helping us in mussel sampling.

References

- Alonso-Torres, M., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves De Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 923–932.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., Porte, C., 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricopter larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquat. Toxicol.* 74, 3–19.
- Barata, C., Solayan, A., Porte, C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorous (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 66, 125–139.
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Meldoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75, 354–373.
- Binelli, A., Provini, A., 2003. DDT is still a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. *Chemosphere* 52, 717–723.
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., 2006. New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 62, 510–519.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F., 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquat. Toxicol.* 89, 257–266.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Camusso, M., Balestrini, R., Binelli, A., 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 44, 263–270.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67–76.
- Carrasco, L., Díez, S., Soto, D.X., Catalan, J., Bayona, J.M., 2008. Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. *Sci. Tot. Environ.* 407, 178–184.
- Catalan, J., Ventura, M., Vives, I., Grimalt, J.O., 2004. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4269–4275.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 181–191.
- De Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the StLawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.
- Edwards, P.R., Hryciak, E.G., Bandiera, S.M., 2007. Differential inhibition of hepatic microsomal alkoxyresorufin O-dealkylation activities by tetrachlorobiphenyls. *Chem. Biol. Interact.* 169, 42–52.
- Engelken, J., Hildebrandt, A., 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochem. Cell Biol.* 77, 237–241.
- Escartin, E., Porte, C., 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Ecotox. Environ. Safe.* 34, 160–164.
- Escartin, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2090–2095.
- Faria, M., Carrasco, L., Díez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 149C, 281–288.
- Fernández, M.A., Alonso, C., González, M.J., Hernández, L.M., 1999. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere* 38, 33–43.
- Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., Porte, C., 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environ. Res.* 90, 169–178.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10, 360–375.
- Gitahi, S.M., Harper, D.M., Muchiri, S.M., Tole, M.P., Nganga, R.N., 2002. Organochlorine and organophosphorus pesticide concentrations in water, sediment, and selected organisms in Lake Naivasha (Kenya). *Hydrobiologia* 488, 123–128.
- Hanari, N., Kannan, K., Horii, Y., Taniyasu, S., Yamashita, N., Jude, D.J., Berg, M.B., 2004. Polychlorinated naphthalenes and polychlorinated biphenyls in benthic organisms of a Great Lakes food chain. *Archiv. Environ. Cont. Toxicol.* 47, 84–93.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J.C., Molina, J.A., Esbrí, J.M., Lorenzo, S., 2006. The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Sci. Tot. Environ.* 356, 112–124.
- Karr, J.R., 1999. Defining and measuring river health. *Freshwater Biol.* 41, 221–234.
- Lavado, R., Ureña, R., Martín-Skilton, R., Torreblanca, A., del Ramo, J., Raldua, D., Porte, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ. Pollut.* 139, 330–339.
- Lecoeur, S., Videmann, B., Berny, P., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.* 94, 184–191.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- MacFarlane, G.R., Schreider, M., McLennan, B., 2006. Biomarkers of heavy metal contamination in the red fingered marsh crab, *Parasesarma erythroactyla*. *Archiv. Environ. Cont. Toxicol.* 51, 584–593.

- Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environ. Monit. Assess.* 71, 187–205.
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.P., Boudou, A., 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals* 19, 399–407.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50, 351–361.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat. Toxicol.* 68, 167–178.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 31, 143–164.
- Riva, C., Binelli, A., Provini, A., 2008. Evaluation of several priority pollutants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the largest Italian subalpine lakes. *Environ. Pollut.* 151, 652–662.
- Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from Lakes Erie and Ontario. *Chemosphere* 40, 1353–1356.
- Saponjić, J.S., Borković, S.S., Kovacević, T.B., Pavlović, S.Z., Labus-Blagojević, S.D., Blagojević, D.P., Sačić, Z.S., Radojčić, R.M., Zikić, R.V., Spasić, M.B., 2006. Activity of antioxidant defense enzymes in the Mediterranean Sea shrimp (*Parapenaeus longirostris*): relation to the presence of PCBs and PAHs in the south Adriatic Sea. *Period. Biol.* 108, 117–125.
- Stohs, S.J., Bagghi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 321–336.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.
- Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., Ballesteros, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., López-Barea, J., 2007. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicol. Lett.* 168, 260–268.
- Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L., 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquat. Toxicol.* 79, 213–225.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey.

4.2 Concentracions de COPs en peixos de l'embassament de Flix i transport aigües avall del riu Ebre

Resum

S'ha estudiat el contingut de COPs als teixits musculars de cinc espècies de peixos de l'embassament de Flix per avaluar la presència d'aquests compostos en organismes de diferent grandària i tipus d'alimentació. A més, també s'ha emprat l'espècie depredadora introduïda més gran del tram final del riu Ebre, el silur (*Silurus glanis*), per estudiar la mobilització dels contaminants des de l'embassament de Flix fins a les proximitats del Delta de l'Ebre, 90 quilòmetres aigües avall. Els grups de compostos més abundants han estat l'HCB, els PCBs i els PCEs i les espècies amb majors concentracions han estat les més omnívores: el rutil (*Rutilus rutilus*), la carpa (*Cyprinus carpio*) i el silur. L'avaluació de l'efecte del transport de contaminants aigües avall usant el silur ha mostrat que tot i que les concentracions màximes de la majoria de compostos organoclorats s'han trobat a l'embassament de Flix, a les altres localitats hi ha concentracions del mateix ordre de magnitud tot posant en evidència la gran importància de la mobilització i transport de materials contaminats aigües avall.

Abstract

In order to evaluate the presence of POPs in organisms of different size and diet habits, muscle samples from five fish species from the Flix water reservoir have been studied. In addition, European catfish (*Silurus glanis*), as the biggest invasive predator specie in the last stretch of Ebro River, has been used to study mobilization of pollutants from Flix water reservoir to the Delta, around 90 kilometres downstream. Most abundant groups of pollutants have been HCB, PCBs and PCSs and the species with the highest concentrations have been the omnivorous ones: roach (*Rutilus rutilus*), carp (*Cyprinus carpio*) and European catfish. The evaluation of the effect of the transport of pollutants downstream using European catfish has determined that even finding the highest maximum concentrations from the majority of POPs in the Flix water reservoir samples, concentrations found at other locations were at the same order of magnitude. This shows a mobilization and transport of polluted materials downstream.

4.2.1 Article 2

Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)

David Huertas¹, Joan Grimalt¹, Josep Benito²,
Lluís Benejam² & Emili García-Berthou²

¹*Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain*

²*Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, E-17071 Girona, Spain*

Article accepted at: Science of the Total Environment



ARTICLE IN PRESS

STOTEN-17982; No of Pages 10

Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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

Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)

David Huertas^a, Joan O. Grimalt^{a,*}, Josep Benito^b, Lluís Benejam^b, Emili García-Berthou^b

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

^b GRECO, Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, E-17071 Girona, Catalonia, Spain

HIGHLIGHTS

- Organochlorine compounds (OCs) were analysed in catfish from the Ebro River.
- The OC effluents from a chlor-alkali plant pollute the catfish of the last 100 km.
- The catfish from sites of lower water flows contain more lipid muscle content.
- OC concentrations are correlated to lipids in the catfish living in lower flow sites.
- Uniform PCB congener distributions were observed in the catfish from all Ebro sites.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 May 2015

Received in revised form 24 June 2015

Accepted 24 June 2015

Available online xxxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Wet

Silurus glanis

Hexachlorobenzene

Polychlorobiphenyls

DDTs

Chlor-alkali plants

River pollution

ABSTRACT

European catfish, *Silurus glanis*, were used as sentinel organisms of the influence of recent and past discharges of organochlorine compounds (OCs) from a chlor-alkali plant located in the Ebro River. The fish concentrations of hexachlorobenzene (HCB), polychlorobiphenyls (PCBs) and DDTs were very high along the last 100 km of the river, including the irrigation channels, e.g. 1.2–27 ng/g wet weight of HCB, 6.3–100 ng/g ww of PCBs and 1–270 ng/g ww of total DDT compounds. These concentrations were much higher than those found upstream from the chlor-alkali discharge site, 0.2 ng/g ww for HCB, 5.6 ng/g ww for PCBs and 7.5 ng/g for DDT compounds. These concentrations were also standing out among those previously described in this fish species.

The European catfish collected in sites under lower water flows, Ribarroja reservoir and irrigation channels, showed higher muscle lipid content, 1.09–7.2%, than those from sites of higher current intensities, river bed, 0.27%–0.67%. In these lower water current areas catfish exhibited OC ww concentrations that were correlated to % lipids. These differences suggest that normalization to lipid content is necessary for comparison of the OC accumulation in specimens from riverine systems living under different flow intensities. Accordingly, OC concentrations referred to lipid content showed more uniform downriver distribution which was consistent with a single focal point as main source of these compounds for the European catfish collected in the last 100 km of river stretch. This geographic distribution was also consistent with the uniform composition of PCB congeners in the studied European catfish.

The distribution of DDT compounds was predominated by 4,4'-DDE which is common in most currently examined fish from aquatic environments. However, it included a high proportion of 4,4'-DDD and 2,4'-DDD which was consistent with the high contribution of benthic organisms from anoxic environments in the diet of these fish.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

0048-9697/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin), Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

1. Introduction

Many rivers have received polluted waste containing polychlorobiphenyls (PCBs), DDTs, hexachlorocyclohexanes (HCHs), hexachlorobenzene (HCB) and other organochlorine compounds (OCs). The use and production of most of these compounds has been banned because of their toxicity and high octanol-water partition constants which leads to a strong capacity for bioconcentration (Clark et al., 1990) and biomagnification (Gobas et al., 1999; Catalan et al., 2004). Chlor-alkali plants have often been focal points of the discharges of these compounds in riverine systems. In Europe there are 57 of these industrial factories and about 40 are located at river shores (EU Institute for Prospective Technological Studies, 2008). There is a need for assessment of the impact of the OC inputs of this type of installations downriver, including legacy pollutants and compounds still under production.

Fish are suitable sentinel organisms of these pollutants (Grimalt et al., 2001; Catalan et al., 2004). However, adequate species must be selected according to the community structure of each riverine system. In the present study, we report the use of European catfish (*Silurus glanis*). This is the largest European freshwater fish. It may reach large sizes depending on environmental conditions. The largest specimens may be above 2 m long but they are rare. They reach sexual maturity at 2–3 years of age. They are one of the biggest fish predators in rivers where they can live up to 80 years (Kottelat and Freyhof, 2007; Freyhof and Kottelat, 2008). They are native from Eastern Europe and western Asia and most abundant in the Danube and Volga river basins (Carol et al., 2009). European catfish is nowadays popular among European anglers and has been introduced into many European countries, including France, Italy, the Netherlands, Belgium, Spain, and the United Kingdom (Elvira and Almodovar, 2001). The European catfish was first introduced into the Iberian Peninsula through River Segre (Ebro river basin) around 1974 (Cabistañ, 2003). Soon after, European catfish were also introduced into the lower River Ebro in Mequinenza, Ribarroja and Flix reservoirs for sport fishing (Elvira and Almodovar, 2001), where it is abundant nowadays. More recently this species has been found in the Sau-Susqueda reservoirs of the Ter River basin (Carol et al., 2003). In previous studies, size ranges between 0.14 and 2.1 m have been observed in Catalan waters (Carol et al., 2007).

The present study encompasses the last stretch of the Ebro River from Ribarroja water reservoir to the Delta (about 120 km; Fig. 1). The Ribarroja water reservoir has lentic properties, an area of 2151 ha, width of 300–500 m and the typical maximum depth is 25 m. The littoral area presents a diversity of substrata (rocks, stones and sand) and abrupt shore slopes, with vegetation only in definite zones (Carol et al., 2009). This reservoir and the one located 10 km upstream, Mequinença, retain nearly all the mud and pollutants carried by the rivers Ebro, Cinca and Segre. The river stretch right after Ribarroja contains very low amounts of OCs and other pollutants.

Flix is a small reservoir (320 ha) contained by a fusegate spillway dam located 6 km downriver Ribarroja. It essentially works as a weir, retaining the river flow and deviating the water through an underground channel that bypasses the meander and propels a hydraulic power plant (Palanques et al., 2014). The width of the Flix reservoir ranges between 300 and 400 m and its maximum depth is 9.5 m. Waters have a short residence time, 0.15 days. The littoral area presents poor diversity of substrata and has some shallow slopes with reed (*Phragmites australis*) beds. In general, fish captures in this reservoir are dominated by introduced cyprinids (roach, *Rutilus rutilus*; rudd, *Scardinius erythrophthalmus*; and common carp, *Cyprinus carpio*) (Carol et al., 2003, 2009). However, European catfish, as predators, are also captured regularly.

The Flix reservoir has received the discharges of an industrial installation situated at the right river shore. In 1949 this factory was transformed into a chlor-alkali plant for the production of chlorine, sodium hydroxide and organochlorine compounds (Muñoz, 1994). In 1973, a bicalcic phosphate plant was incorporated to manufacture this feed additive from by-product HCl and phosphorite. This activity was increased in 1992. About 35,000 tons of DDT were produced between 1945 and 1971 (Muñoz, 1994). This factory was the largest Spanish manufacturer of this insecticide. This chlor-alkali plant was also the only PCB manufacturer in Spain and produced 29,000 tons of these compounds between 1959 and 1987 (Breivik et al., 2002). As consequence of these activities 360,000 tones industrial waste accumulated in the Flix Reservoir (Palanques et al., 2014) which retained high amounts of PCBs, DDTs and HCB from the chlor-alkali plant.

The last 100 km section of the Ebro river is essentially devoted to agricultural activities. Tortosa (35,000 inhabitants) is the only medium

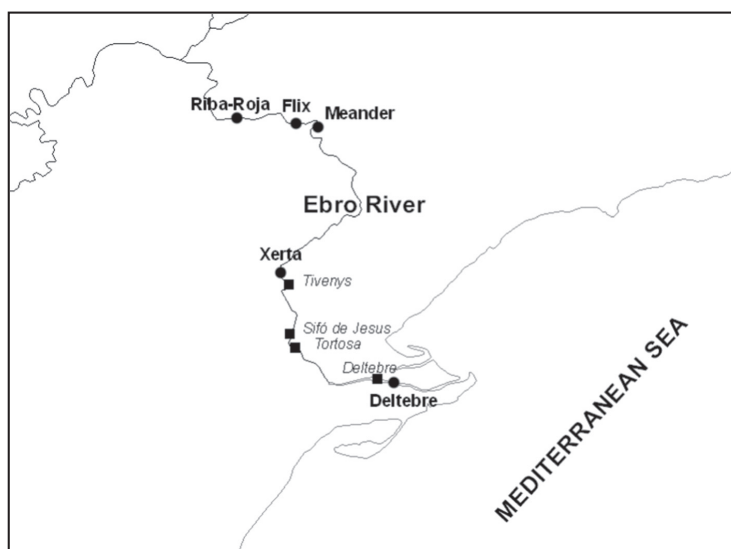


Fig. 1. Sampling sites in the last stretch of Ebro River basin. Circles indicate sites in the river bed and reservoirs. Squares indicate irrigation channel sites.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)..., Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

3

size city at the river shore. The chlor-alkali factory in the Flix reservoir is the only installation that has discharged significant amounts of the above mentioned OCs in the past. Having in mind the low pollution levels of OCs and other pollutants downstream the Ribarroja reservoir due to mud retention, the case reported in the present study constitute a reference example for the OC concentrations that can accumulate as consequence of chlor-alkali plants.

There is a need to ascertain the environmental impact of the activities related with these point sources of OC pollution on nearby environments and those located downriver. The accumulated effects of the atmospheric emissions were evaluated in a previous study (Garí et al., 2014) but the extent of contamination into the Ebro River waters still remain to be assessed. The toxicity of sediments was also evaluated (Bosch et al., 2009) but there is a need to know the concentrations of OCs in the organisms inhabiting the water reservoir and the last stretch of the Ebro River. In the present study, the OC concentrations in European catfish collected along the river have been determined.

Nine sampling sites distributed along the last 120 km of the river were selected (Fig. 1). Five of these points were in the main river bed, Ribarroja, Flix, Meander, Xerta and Deltebre, and the other four were situated in large irrigation channels, Tivenys, Sifó de Jesús, Tortosa and Deltebre, which divert water from the river bed at Xerta weir, about 50 km upstream from the river mouth, to rice fields in the Delta. These channels are drained yearly, so the European catfish caught there originated from the river and had spent less than one year in them. For reference, fish specimens from the Sau reservoir, located in the Ter Basin (central Catalonia) were analysed. This is the study on OCs in European catfish from a river system involving the highest number of sampling sites reported to date.

2. Material and methods

2.1. Locations and sample collection

A total of 58 individuals were collected between February 2005 and July 2006. Most fish were captured by boat or wading electrofishing in shallow sites although Sau fish were caught with purse seines in the limnetic zone (Benejam et al., 2008). Working at 500 V and 13 A was enough potency for fish capture in Flix reservoir and downstream. Fish could be collected still alive. They were transported to the field laboratory where they were measured, weighted and dissected. Total length was measured to the nearest millimetre and total weight to the nearest gramme. All collected muscle tissue fillets were kept in previously cleaned aluminum foil and stored at -20°C until further analysis. Stomach contents for diet analyses were collected as described in Carol et al. (2009) and preserved in 70% ethanol until examination.

2.2. Materials

Solvents for residue analysis, n-hexane (Ref. 1.04371), dichloromethane (Ref. 1.06054), isoctane (Ref. 1.15440), acetone (Ref. 1.00012), concentrated sulphuric acid 95–97% (Ref. 1.00731) and anhydrous sodium sulphate (analytical-reagent grade; Ref. 1.06649) were from Merck (Darmstadt, Germany). Sulphate was activated overnight by heating at 400°C . Cellulose extraction cartridges (20 mm I.D. and 80 mm long) were from Whatman International Ltd. (UK). HCB, HCHs (α -, β -, γ - and δ -isomers), DDTs mixture (2,4'-DDT, 4,4'-DDT, 2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD and 4,4'-DDD), and PCBs mixture (28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) were from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany). 1,2,4,5-Tetrabromobenzene (TBB; Aldrich, Steinheim, Germany) and PCB 200 (Dr. Ehrenstorfer, Wesel, Germany) were used as recovery standards. PCB 142 (Dr. Ehrenstorfer) was used as internal standard. The standard mixtures of HCH isomers, HCB, PCBs, DDTs and surrogate solution composed of TBB and PCB 200 were prepared in isoctane.

2.3. Analytical procedures

The analytical procedures and instrumental methods have been adapted from Berdie and Grimalt (1998) and Vives and Grimalt (2002). Individual muscle tissue samples (3–5 g) were ground with activated sodium sulphate until a fine powder was obtained and then the mixtures were introduced into previously cleaned cellulose cartridges (24 h in Soxhlet). Such mixture was Soxhlet-extracted with 100 mL of n-hexane–dichloromethane (4:1 v/v) for 18 h. At this step, TBB and PCB-200 were added as recovery standards. The lipid content of all samples was determined gravimetrically from an aliquot of the extract. The rest of the extract was concentrated under vacuum to 2 mL and 2 mL of sulphuric acid were added. After vigorous stirring in a Vortex-mixer (2 min) the mixture was centrifuged to remove any foam in the interface and the sulphuric acid layer was discarded. This clean-up step was repeated until a colourless transparent acid layer (2 mL) was obtained (3–5 times). The final sulphuric acid mixture was re-extracted with n-hexane (2×2 mL) and all n-hexane solutions were combined and concentrated by vacuum rotary evaporation (20°C , 20 Torr) to small volumes (ca. 300 μL). The solutions were then transferred to vials and evaporated just to dryness under a gentle stream of nitrogen (10 – 20°C). The cleaned extract was re-dissolved in 50 μL of isoctane for instrumental analysis.

2.4. Instrumental analysis

Samples were analysed in a Hewlett-Packard gas chromatograph Model HP-5890 equipped with an electron-capture detector and an HP-7673-A autosampler. The separation was achieved with a $60\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ I.D. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 μm). The oven temperature was programmed from 90°C (holding time 2 min) to 130°C at $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and finally to 290°C at $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, keeping the final temperature for 10 min. Injector and detector temperatures were 280°C and 320°C , respectively. Injection was performed in the splitless mode, keeping the split valve closed for 35 s. Helium was the carrier gas (1.5 mL/min) and nitrogen was used as the make-up gas for the detector (60 mL/min).

Selected samples were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (HP-5973 MSD, Agilent Palo Alto, USA) with chemical ionization and negative ion recording (NICI). The extracts were injected in a HP-5MS capillary column (30 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25 μm film thickness). Helium was used as carrier gas (1.2 mL/min). Ammonia was the reagent gas (2.5 mL/min). The oven temperature program started at 90°C , which was held for 1 min, followed by a first increase to 130°C at $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and a final ramp to 325°C at $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with a hold time of 10 min. Injector, transfer line and ion source temperatures were 270°C , 280°C and 176°C , respectively.

2.5. Quality assurance

One blank was made for each batch of analysed samples. Mean recoveries of spiked standards in the samples were $55 \pm 11\%$ and $84 \pm 23\%$ for TBB and PCB200, respectively.

OC concentrations were reported on a wet weight (ww) basis and were adjusted for the recovery percentage. Detection and quantification limits were determined as the average signal obtained from the blanks plus three or five times the standard deviation, respectively. Instrumental detection limits ranged between 0.007 and 0.02 ng/g ww (Berdie and Crimalt, 1998). Detection limits ranged between 0.03 and 0.48 ng/g wet weight.

2.6. Statistical analysis

All data sets and statistical procedures were calculated with SPSS® 15.0 version. Geometric means and minimum and maximum

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)..., Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

ARTICLE IN PRESS

4

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

concentration ranges were calculated. Median values were represented in box plots with the percentiles and outliers. Data concentrations of organochlorine compounds were frequently not normally distributed, so conversion into logarithmic values was applied when necessary for statistical analysis. Verification of normality was performed with the Kolmogorov–Smirnov test for biometric data (length, weight and lipid percentage) and for each compound in all species before and after the conversion. For each contaminant, one-half detection limit was assigned to samples with undetectable contaminant concentrations. Pollutants for which concentrations in all analysed samples were below the limits of detection were reported as non-detected. In most cases, statistical evaluations were based on parametric tests due to the normality obtained from original concentrations or after logarithmic conversion of data. In addition, *T*-test was used to examine differences between seasons in Flix samples and ANOVA test with *post-hoc* multi-comparisons were used to evaluate differences between locations. The Scheffé *post-hoc* test was used because groups with different number of samples were compared. Results were considered as significant at *p*-values < 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Length and weight

Mean length and weight in the collected European catfish were 750 ± 374 mm (262–1990 mm) and 2747 ± 7207 g (64–42,000 g), respectively (Fig. 2). No statistically significant differences between length or weight and sample location were observed (ANOVA Test: *F* = 1.819, *p* < 0.083, *n* = 58, and *F* = 1.463, *p* < 0.184, *n* = 57, respectively).

Fish length and weight were positively correlated in all sampled locations, with regression coefficients ranging between 0.849 and 0.992. In general, no significant correlations were found between individual length or weight and the OC concentrations by reference to wet weight in each location. Only European catfish from the Sau water reservoir showed significant trends for all compounds with length (*r*² = 0.641, 0.905, 0.910, 0.993, 0.974 for PeCB, HCB, total HCHs, total DDTs and total PCBs, respectively). Another exception was constituted by HCB, total DDT and PCBs in Xerta (*r*² = 0.940, 0.573 and 0.548, respectively). The European catfish from Sifó de Jesus also showed a correlation between total DDTs and length (*r*² = 0.701). On the other hand, lipid weight normalization of the OC concentrations only showed significant values for PeCB and HCB in specimens captured at the Flix reservoir during summer (*r*² = 0.648 and 0.628, respectively).

3.2. Diet

In the Ebro Channels, the diet of the small European catfish consisted of plants (~10%), invertebrates (~25%) and small fish (~20%) and

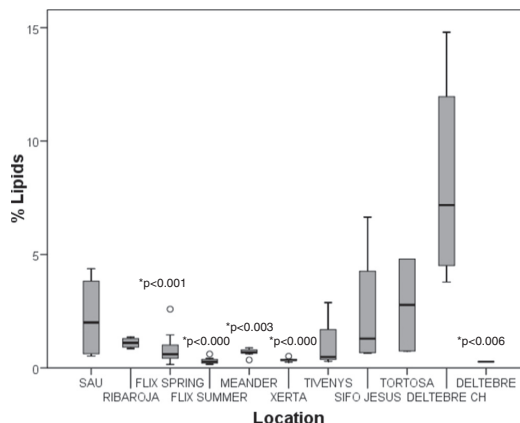


Fig. 3. Box-plots of lipid content of the European catfish collected at each location.

progressively shifted onto a more intensive fish content (~50%) as they grew in length (Carol et al., 2009). In the Flix water reservoir smaller individuals fed mainly on invertebrates (~50%) and when they were longer than 600 mm, crayfish (*Procambarus clarkii*) became a major percentage of their diet habits (between ~60 and 75%). Other fish only represented between 10 and 25% of the diet biomass when they were larger than 900 mm. In Ribarroja reservoir European catfish fed mainly on crayfish independently of their size (more than 50% in 300 mm specimens and between 75 and 100% in specimens up to 1200 mm).

3.3. Lipid content

The lipid content of the European catfish muscle was significantly different between locations (Fig. 3; ANOVA Test: *F* = 8.456, *p* = 0.000). The *post-hoc* contrast (Scheffé) test confirmed that the European catfish from the channels had significantly higher lipid concentrations in the muscle than the European catfish from the Ebro River bed samples, e.g. Flix reservoir, meander, Xerta and Deltebre; *p* < 0.001, *p* = 0.000, *p* < 0.003, *p* = 0.000 and *p* < 0.006, respectively. The European catfish of Sau water reservoir and Ebro Channels had higher percentages (between 1.0 and 8.2%) than those from the Flix reservoir and river bed. This difference may be related to differences in activity according to the average flow strength in these locations. In the Sau and Ribarroja reservoir and in the Ebro irrigation channels after the weir of Xerta current intensities are lower than in the sites within the Ebro River bed. Fish from the

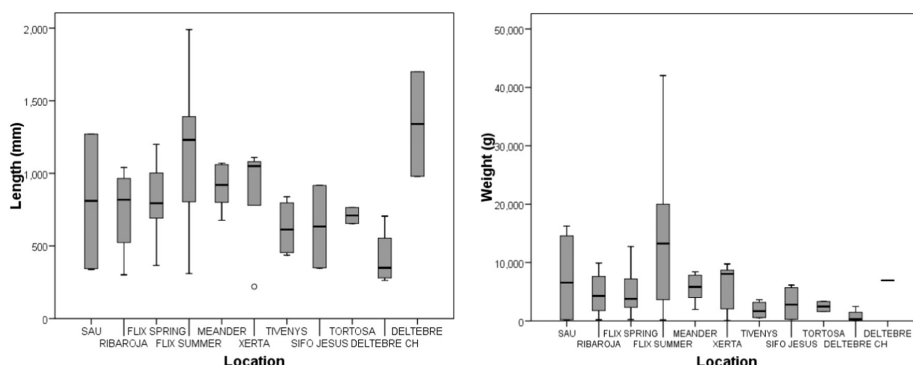


Fig. 2. Box-plots of biometric data of the European catfish collected at each location.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)..., Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

5

former group could likely be less active and accumulate higher proportion of lipids. Differences in food web in sites under higher and lower water flows could also lead to differences in European catfish lipid content.

3.4. Hexachlorobenzene

The mean concentrations of HCB in the European catfish from the Ebro River downstream the Flix reservoir, 1.2–27 ng/g ww (Table 1), are much higher than those reported in any other previous study with European catfish (Danube Delta, 0.02–0.55 ng/g ww, Covaci et al., 2006; Kahramanmaras, 0.05–1.5 ng/g, Erdogru et al., 2005; River Po, 1.7 ng/g, Galassi et al., 1994). In contrast, the European catfish from Ribarroja reservoir (upstream the chlor-alkali discharge site) have HCB levels, 0.2 ng/g ww (Table 1), that are in the order of those reported from these sites (Table 2). Large amounts of HCB were identified in the surroundings of the Flix reservoir as consequence of the atmospheric emissions from the chlor-alkali plant (Garí et al., 2014; Grimalt et al.,

1994). The European catfish results (Table 1) show that the HCB signature of the factory is also noticed in all the river stretch arriving to the delta, including the irrigation channels.

In these irrigation channels the European catfish concentrations are higher than in those from the river bed. Probably lower flow intensities in the channels facilitate the development of trophic chains in which HCB is accumulated and therefore there are higher concentrations of this compound is incorporated in the European catfish. As mentioned above, the sites with lower water flow intensities give rise to European catfish with higher lipid content. Accordingly, normalization of the concentrations in the European catfish to lipid content shows smaller differences between HCB concentrations in specimens from the channels and the river bed (370–1500 ng/g lipid vs 430–700 ng/g lipid, respectively; Table 3) than in wet weight basis (7.2–27 ng/g ww vs 1.2–4.7 ng/g ww, respectively; Table 1).

In any case, one of the main aspects of the present results to be highlighted is the long river stretch section of 100 km in which HCB

Table 1

Geometric means of biometric data and compound concentrations (ng/g wet weight) of European catfish in the studied locations. Range in brackets. Locality codes: SA = Sau; RR = Ribarroja; FS = Flix Spring; FSu = Flix Summer; ME = Meander; XE = Xerta; Tlc = Tivenys channel; Sjc = Sifó de Jesús channel; TOc = Tortosa channel; DEc = Deltebre channel; DE = Deltebre. nd: not detected; nq: not quantified.

Locality	SA	RR	FS	FSu	ME	XE	Tlc	Sjc	TOc	DEc	DE
N	4	4	11	9	9	5	4	4	2	4	2
Length (mm)	661 (350–1270)	675 (301–1040)	787 (366–1200)	1002 (309–1990)	895 (676–1070)	736 (220–1100)	601 (437–838)	567 (348–919)	707 (654–765)	386 (262–705)	1291 (980–1700)
Weight (g)	1844 (230–16,250)	2470 (214–9900)	3420 (259–12,750)	6571 (190–42,000)	4940 (1960–8410)	2460 (64–9740)	1349 (531–3628)	1285 (273–6133)	2315 (1617–3313)	404 (116–2486)	-
% Lipids	1.54 (0.53–4.38)	1.09 (0.86–1.36)	0.59 (0.15–2.6)	0.28 (0.16–0.62)	0.67 (0.35–0.89)	0.35 (0.25–0.52)	0.67 (0.29–2.9)	1.5 (0.65–6.6)	1.7 (0.75–4.8)	7.2 (3.8–15)	0.27 (0.26–0.28)
PeCB	0.03 (nd–0.1) ^a	nd ^b	0.3 (nd–5.4)	0.9 (0.1–8.7)	0.1 (nq–0.4)	0.03 (nd–0.03)	0.2 (0.1–0.9)	0.6 (0.2–3.3)	0.3 (0.2–0.5)	1.8 (0.6–8.6)	nd
HCB	0.2 (nq–1.0)	0.2 (nq–0.4)	4.6 (nq–63.5)	18 (3.1–140)	4.7 (2.0–12)	2.5 (1.8–3.0)	7.6 (3.2–51)	23 (5.9–82)	7.2 (5.4–9.6)	27 (3.8–57)	1.2 (1.1–1.3)
α-HCH	0.050 (0.02–0.13)	0.02 (nd–0.02) ^a	0.1 (nq–1.0)	nd	0.1 (nd–0.2) ^a	nd	0.1 (nd–0.1) ^a	0.1 (nd–0.6)	nd	0.1 (0.1–0.6)	nd
β-HCH	nd	nd	0.2 (nd–3.4)	nd	0.1 (nd–0.3)	nd	0.03 (nd–0.3) ^a	0.1 (nd–1.4)	0.04 (nd–0.1)	0.7 (0.3–2.0)	nd
γ-HCH	0.3 (0.09–1.2)	0.2 (0.1–0.3)	0.3 (0.1–3.8)	nd	0.1 (nq–0.2)	nd	0.1 (nq–0.7)	0.4 (0.1–3.2)	0.1 (nd–0.3)	1.5 (0.9–3.9)	nd
Total HCHs	0.3 (0.1–1.3)	0.2 (0.1–0.3)	0.6 (0.1–8.2)	nd	0.3 (nd–0.6)	nd	0.2 (nd–1.0)	0.6 (0.6–5.2)	0.1 (nd–0.4)	2.3 (1.3–6.5)	nd
PCB 28	1.0 (nq–6.2)	nq	2.5 (nd–37)	1.4 (0.6–3.3)	1.9 (0.4–2.3)	0.8 (0.4–0.9)	1.6 (nd–11)	9.2 (5.7–14)	1.4 (0.8–2.5)	4.3 (1.7–11)	0.2 (nq–0.3)
PCB 52	2.2 (nq–8.3)	0.4 (nd–1.4) ^a	3.8 (nd–28)	1.2 (0.5–2.6)	2.5 (nq–2.8)	0.6 (0.3–0.8)	2.9 (1.5–8.3)	2.1 (nd–7.5)	2.8 (1.8–4.2)	5.4 (1.3–10)	0.2 (nq–0.3)
PCB 101	3.3 (1.0–11)	0.8 (0.3–1.1)	4.4 (nd–47)	1.7 (1.1–5.0)	3.1 (1.4–5.2)	1.4 (0.6–2.4)	3.2 (0.9–13)	5.2 (1.4–37)	1.9 (1.1–3.4)	4.8 (0.9–8.8)	0.3 (nq–0.8)
PCB 118	4.1 (1.8–8.1)	0.5 (nd–1.9)	1.5 (nd–37)	1.0 (0.6–2.9)	1.4 (0.7–3.0)	0.7 (nq–1.9)	5.4 (2.1–10)	12 (4.9–29)	4.6 (2.6–8.2)	4.9 (2.1–6.8)	0.2 (nq–0.7)
PCB 138	5.3 (1.8–14)	1.5 (0.6–2.5)	8.6 (0.3–110)	3.3 (2.1–11)	10 (4.2–20)	4.6 (1.6–9.0)	11 (3.8–34)	21 (16–31)	6.9 (3.1–15)	12 (2.9–21)	1.0 (0.4–2.9)
PCB 153	5.3 (1.7–15)	1.7 (0.7–3.1)	9.6 (0.4–110)	4.0 (2.4–14)	10 (4.1–21)	5.5 (1.9–11)	13 (3.2–39)	24 (19–35)	7.9 (3.4–18)	13 (2.5–24)	2.6 (1.7–3.7)
PCB 180	2.4 (0.9–6.3)	0.4 (nd–2.2)	5.0 (nd–114)	2.6 (1.4–10)	7.3 (2.7–16)	3.6 (1.0–7.8)	11 (3.2–32)	19 (14–28)	7.4 (3.1–17)	9.9 (3.4–16.7)	1.9 (1.4–2.7)
Total PCBs	24 (7.1–69)	5.6 (2.0–12.2)	38 (1.0–460)	16 (9.3–47)	37 (15–70)	17.5 (6.1–34)	50 (16–150)	100 (66–150)	33 (16–70)	56 (15–97)	6.3 (3.5–11)
2,4'-DDE	0.1 (nd–1.1) ^a	0.2 (nd–0.3)	0.3 (nd–4.4)	2.6 (0.7–4.9)	1.6 (0.3–4.9)	1.7 (0.3–4.3)	0.4 (nd–0.9)	1.8 (0.4–11)	0.6 (0.5–0.7)	2.7 (1.9–6.2)	0.7 (nd–7.3)
4,4'-DDE	5.7 (1.1–28)	6.0 (2.3–17)	26 (1.2–210)	10 (5.4–43)	8.0 (3.4–28)	10 (3.3–21)	41 (5.8–160)	98 (61–160)	45 (32.9–61)	170 (97–250)	7.3 (4.3–12)
2,4'-DDD	5.0 (1.4–17)	0.3 (nd–0.7)	7.5 (nd–69)	1.0 (nq–4.0)	1.3 (0.6–2.4)	0.8 (nq–1.8)	4.7 (1.1–30)	18 (5.2–34)	3.0 (1.7–5.3)	5.7 (0.6–27)	nq
4,4'-DDD	2.6 (1.2–5.0)	1.1 (0.5–2.4)	13 (0.1–160)	4.5 (2.4–10)	1.6 (0.6–2.9)	2.2 (1.4–3.8)	12 (4.0–49)	28 (21–39)	12 (9.1–17)	52 (46–66)	2.6 (1.9–3.6)
2,4'-DDT	0.2 (nd–0.5)	0.1 (nd–0.2) ^a	4.9 (nd–76)	2.1 (1.0–7.4)	1.1 (0.3–3.2)	0.8 (nd–3.1)	3.2 (0.8–18)	13 (5.7–59)	3.2 (1.0–5.5)	4.7 (1.2–8.3)	0.7 (0.6–0.8)
4,4'-DDT	1.2 (0.7–2.3)	nd	8.0 (nd–180)	4.5 (0.9–13)	3.2 (0.9–10)	1.4 (0.2–3.9)	6.8 (3.7–31)	16 (10–27)	6.6 (4.2–10)	12 (4.6–26)	3.1 (2.6–3.7)
Total DDTs	16 (4.3–49)	7.5 (2.8–20)	68 (1.3–700)	28 (17–77)	17 (6.0–45)	18 (6.3–37)	72 (16–290)	190 (120–310)	70 (50–100)	270 (190–320)	19 (18–19)

^a >50% of samples not detected or quantified.

^b 100% of samples not detected or quantified.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)..., Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>



Table 2
Comparison of the concentrations of the main groups of organochlorine compounds in Siluridae from different fresh water bodies, including the Ebro River.

Locality	Specie	HCb	Total HCHs	Total PCBs	Total DDTs	References
Danube River, Bulgaria	<i>Silurus glanis</i>	–	–	9.7	30	Stancheva et al. (2013)
Danube Delta, Romania	<i>Silurus glanis</i>	0.02–0.57	0.66–0.72	0.79–2.0	1.8–7.3	Covaci et al. (2006)
Guanting Reservoir, China	<i>Silurus asotus</i>	–	–	–	–	Cheng et al. (2006)
Sir Dam Lake, Kahramanmaras, Turkey	<i>Silurus glanis</i>	0.05–1.5	0.13–2.2	0.39–42	22–960	Erdogru et al. (2005)
Po River, Italy	<i>Silurus glanis</i>	1.7	–	560 ^a	21 ^b	Galassi et al. (1994)
Po River, Italy	<i>Silurus glanis</i>	–	–	190 ^b	–	Squadrone et al. (2013)
Po (Tamaro) River, Italy	<i>Silurus glanis</i>	–	–	94 ^b	–	Squadrone et al. (2013)
Po (Parma) River, Italy	<i>Silurus glanis</i>	–	–	92 ^b	–	Squadrone et al. (2013)
Po (Bormida) River, Italy	<i>Silurus glanis</i>	–	–	96 ^b	–	Squadrone et al. (2013)
Sau water reservoir	<i>Silurus glanis</i>	0.2	0.3	24	16 ^d	This study
Ebro River upstream Flix ^c	<i>Silurus glanis</i>	0.2	0.2	5.6	7.5 ^d	This study
Flix water reservoir ^c	<i>Silurus glanis</i>	4.6–18	nd–0.6	16–38	28.5–68 ^d	This study
Ebro River downstream Flix reservoir ^c	<i>Silurus glanis</i>	1.2–26.5	nd–2.3	6.3–100	17–270 ^d	This study

^a Only 4 congeners (PCB-101, PCB-138, PCB-153 and PCB-180).

^b Congeners PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153 and PCB-180.

^c Only 4,4'-DDE.

^d Mean values of all fish collected in this site.

concentration levels well above background are observed, including the irrigation channels. For instance, in the Mobile River basin high HCB concentrations were found in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) collected nearby the effluents of a DDT manufacturing facility, 213 ng/g wet weight, but the concentrations dropped to 1.5 ng/g wet weight in specimens collected 25 km downriver from this site (Hinck et al., 2009). This strong drop in HCB concentrations may be related with the waters entering from the Alabama River, about 8 km downriver from the factory discharge site which contributes to a mean flow of ca. 330 m³/s of very low HCB polluted waters. This flow may dilute the waters from the Tombigee River in which the factory is located. In contrast, no tributaries of significant flow are found in the Ebro River between the Flix reservoir and the mouth. The results of the present study shows that, in the absence of such dilution effects, the chemical stability and lipophilic properties of HCB involve strong bioaccumulation in European catfish over very long river sections.

3.5. Polychlorobiphenyls

The PCB concentrations in the European catfish collected downstream the Flix reservoir were in the range of 6.3–100 ng/g ww, in the European catfish from the Flix reservoir they were 16–38 ng/g ww and in those collected upstream this site (Ribarroja reservoir) they were 5.6 ng/g. Comparison with literature data shows that the concentrations of these compounds in European catfish from the Danube Delta, 0.79–2.0 ng/g, and from Kahramanmaras, 0.39–4.2 ng/g, were always lower than those found in the Ebro River (Table 2). Another study from Danube River samples (Stancheva et al., 2013) reported slightly higher concentrations (mean value 9.8 ng/g) than those from this previous Danube study. These concentrations were similar to the lowest values reported in the Ebro River study for the sites under the influence of the chlor-alkali plant (Table 2). However, in the European catfish from the Po River, PCB concentrations above those found in the Ebro River have been reported, 560 ng/g (Galassi et al., 1994) or 190 ng/g (Squadrone et al., 2013).

In the irrigation channels the European catfish concentrations were higher than in the river bed downstream Flix reservoir, 33–100 ng/g ww vs. 6.3–37 ng/g ww, respectively (Table 1). Normalization of these data to lipid content decreases the difference between both groups of samples, 720–7600 ng/g lipid vs 2600–5200 ng/g lipid (Table 3). The decrease of this difference is due to the higher lipid content of the European catfish specimens in the channels which may respond to differences in food chain and lower activity of fish because of lower flow intensities in the channels than in the open river bed. This difference between channels and river bed may also involve higher retention of the OCs when they enter into these irrigation systems. As length and

weight do not show significant differences between sampled sites, it is likely that, in this case, age is not determinant of OC accumulation.

The percentage distribution of PCBs was dominated by the more chlorinated and less volatile compounds, e.g. PCB-138, PCB-153 and PCB-180 (Fig. 4). These three congeners could explain more than 50% of the total PCBs mean concentrations in all sampled sites. In addition, the proportion of all congeners was rather constant among all samples, not varying more than a 17% between locations (PCB-28: 1–9%; PCB-52: 3–12%, PCB-101: 5–14%, PCB-118: 4–14%, PCB-138: 21–28%, PCB-153: 22–37% and PCB-180: 10–27%). These results are consistent with a single main source for the occurrence of these compounds in the European catfish collected along the Ebro River. The distribution patterns found in European catfish from other studies showed similar ratios. Hexa- and hepta-CBs represented more than 70% of total PCBs in the specimens from the Danube River and Delta (Stancheva et al., 2013; Covaci et al., 2006) and the Po River (Galassi et al., 1994). In contrast, in European catfish from Kahramanmaras the PCB profile was dominated by the tri- to penta-CB isomers, which constituted between 53 and 90% of the total PCBs (Erdogru et al., 2005).

3.6. DDTs

The concentrations of total DDTs (summed DDE, DDD and DDT) in the European catfish collected in the Flix reservoir, 16–38 ng/g ww, and in the Ebro River downstream Flix, 17–270 ng/g ww, are in general much higher than in European catfish from the Danube Delta in Romania, 1.8–7.3 ng/g, but concentrations of 30 ng/g have been described in Bulgarian samples from this river (Stancheva et al., 2013). These concentrations are similar to those of the lower end of the distributions found in the Ebro River (Table 2). The total DDTs reported in European catfish from the Po River, 21 ng/g (Galassi et al., 1994), are similar to the lower end of those found in the Flix Reservoir (Table 2). In contrast, the concentrations in European catfish from Kahramanmaras, 22–960 ng/g (Erdogru et al., 2005), are much higher than those from the present study. The concentrations in European catfish from the Ribarroja reservoir, 7.5 ng/g ww, are much lower than in the catfish from the Flix reservoir or downriver but still higher than those reported in catfish of the Danube Delta. The concentrations in the European catfish of the Sau reservoir, 16 ng/g, are higher than in the Ribarroja reservoir. The mean concentrations of total DDTs from channel European catfish are higher or of the same order of magnitude than the values reported in the Flix Reservoir, indicating again a significant downstream influence of the compounds released from the chlor-alkali plant.

The concentration of total DDTs in the European catfish from the channels are also higher than those in the European catfish from the river bed downstream Flix reservoir, 70–270 ng/g ww vs. 17–19 ng/g ww, respectively (Table 1). However, if the concentrations are normalized to lipid

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)..., Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

and concentrations (ng/g lipid weight) of European catfish in the studied locations. SA = Sau; RR = Ribarroja; FS = Flix Spring; FSu = Flix Summer; ME = Deltebre channel; DEc = Deltebre channel; DE = Deltebre.

	FS	FSu	ME	XE	Tlc	Sjc	TOc
	11	9	9	5	4	4	2
	787	1002	895	736	601	567	707
40)	(366-1200)	(309-1990)	(676-1070)	(220-1100)	(437-838)	(348-919)	(654-76
	93,420	6571	4940	2460	1349	1285	2315
00)	(259-12,750)	(190-42,000)	(1960-8410)	(64-9740)	(531-3628)	(273-6133)	(1617-3
	0.59	0.28	0.67	0.35	0.67	1.55	1.67
36)	(0.15-2.59)	(0.16-0.62)	(0.35-0.89)	(0.25-0.52)	(0.29-2.88)	(0.65-6.65)	(0.75-4.
	250	320	26	8.0	30	40	15
	(4.9-1800)	(19-4100)	(15-44)	(6.5-9.9)	(24-35)	(30-49)	(9.5-24,
	1000	6400	700	700	1100	1500	380
	(19-40,000)	(650-67,000)	(310-1300)	(420-1100)	(700-1800)	(900-2900)	(200-72
	19	53	21	31	3.9	5.2	nd
a	(0.6-310)	(nd-74.1)	(15-39)	(25-38)	(nd-3.9) ^a	(nd-8.9)	
	110	Nd	22	nd	9.2	10	2.7
	(nd-310)		(8.4-39)		(nd-9.2) ^a	(nd-21)	(nd-2.7)
	56	48	24	38	19	28	6.5
	(12-190)	(nq-69)	(19-42)	(32-46)	(8.8-32)	(19-48)	(nd-6.5)
	380	330	75	160	80	110	31
	(50-2100)	(160-550)	(48-140)	(130-200)	(38-170)	(30-460)	(9.2-11(
	810	470	170	190	280	600	74
	(nq-11,000)	(270-1200)	(61-370)	(110-290)	(26-1500)	(150-1300)	(53-100
	870	410	230	130	440	460	150
l)	(nd-4400)	(240-1300)	(120-360)	(67-250)	(290-750)	(nd-550)	(87-240
	840	610	460	390	470	340	100
l)	(36.1-8100)	(270-3100)	(220-820)	(120-860)	(190-1200)	(740-560)	(70-140
	490	350	210	280	810	780	240
)	(nd-10,000)	(170-4600)	(100-470)	(660-680)	(360-2600)	(430-2200)	(170-35
	1500	1200	1500	1300	1700	1400	360
	(440-19,000)	(490-7100)	(600-3300)	(310-3400)	(820-5000)	(360-2500)	(320-41
	1600	1400	1500	1600	2000	1600	420
l)	(58-20,000)	(6200-8700)	(590-3300)	(360-4300)	(690-5800)	(400-2900)	(380-45
	1800	930	1100	1000	1600	1200	390
l)	(nq-18,000)	(430-6500)	(390-2500)	(200-3100)	(700-4600)	(290-2500)	(360-41
	7300	5500	5200	4900	7600	6600	1800
o)	(370-75,000)	(2600-30,000)	(2200-11,000)	(1200-13,000)	(3400-22,000)	(2200-13,000)	(1400-2
	100	920	230	480	96	110	31
	(nd-700)	(120-2400)	(43-560)	(64-1300)	(nd-170)	(67-160)	(9.8-96,
	4400	3700	1200	2900	6200	6300	2400
00)	(180-74,000)	(1500-27,000)	(520-4400)	(630-7600)	(1300-21,000)	(2300-18,000)	(1300-4
	1300	520	200	320	710	1200	160
l)	(14-42,000)	(94-2500)	(91-390)	(140-550)	(240-1600)	(460-270)	(110-22
	2200	1600	230	630	1700	1800	650
l)	(nd-53,000)	(710-6300)	(85-420)	(290-1200)	(870-3300)	(580-4300)	(350-12
	1500	740	160	480	490	870	130
	(nq-13,000)	(170-4600)	(37-450)	(nd-990)	(170-1400)	(820-910)	(110-14
	2400	1600	470	400	1000	1100	350
l)	(nd-20,000)	(540-5800)	(140-1500)	(43-1200)	(730-1500)	(250-2200)	(210-56
	12,000	10,000	2600	5100	11,000	12,000	3700
00)	(230-200,000)	(4700-48,000)	(920-7100)	(1200-12,000)	(3500-29,000)	(4700-28,000)	(2100-6

3.0



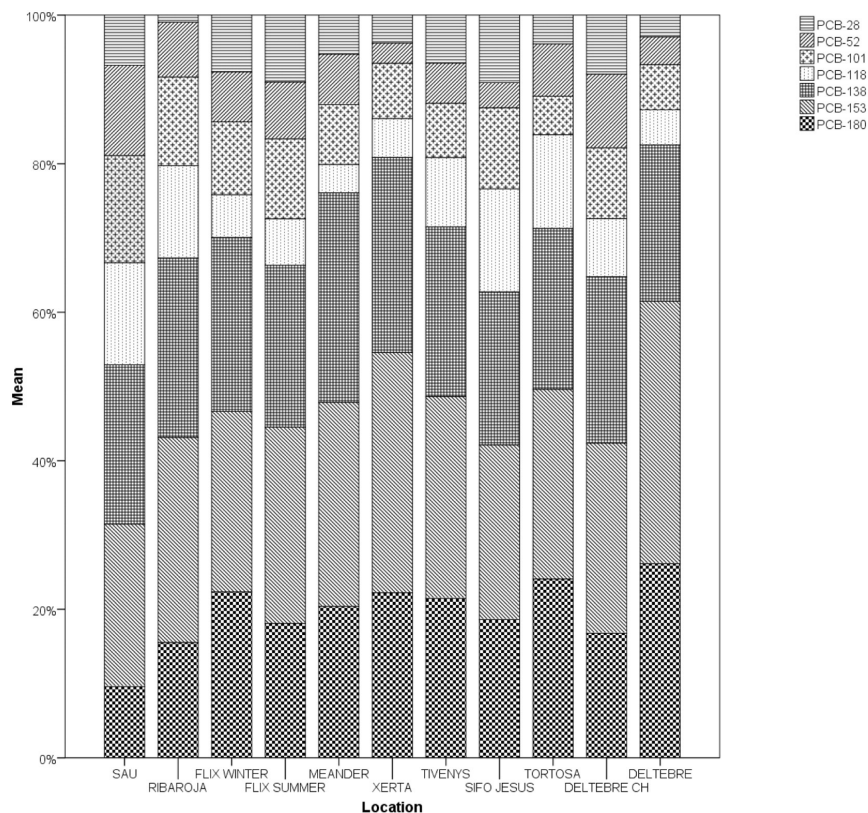


Fig. 4. Average percentage distributions of the PCB congeners in the European catfish collected at each location.

content the differences are smaller, 3700–12,000 ng/g lipid in the channels and 2600–7100 ng/g lipid in the river bed (Table 3). Again, the more uniform values after normalization to lipid content may respond to differences in food sources and activity of the European catfish living in these two environments which lead to higher lipid content in the channel specimens. It also may reflect higher retention of these compounds in the channels.

All DDT distributions in these European catfish are predominated by 4,4'-DDE (Fig. 5). The mean percentages encompassed between 30 and 80% of total DDTs depending on the location. The high predominance of this compound is in agreement with the DDT distributions found in European catfish from other areas (Erdogruel et al., 2005; Covaci et al., 2006; Cheng et al., 2006; Stancheva et al., 2013). DDE is the common derivative of DDT generated after loss of a HCl molecule. This composition contrasts with that observed in the olive oil leaves surrounding the chlor-alkali factory nearby the Flix reservoir. In these leaves, 4,4'-DDT is found in higher concentration than 4,4'-DDE (Gari et al., 2014). Tree leaves are known to adsorb airborne OCs which are passively retained in the surface waxes (Grimalt and van Drooge, 2006). Thus, the composition in this matrix is probably closer to the original DDT mixtures released from the factory than in the European catfish muscle. European catfish have probably accumulated DDT transformed into DDE which was also present in the preys of the Ebro River.

The high abundance of DDD compounds, both 4,4'-DDD and 2,4'-DDD, is another feature of the DDT distributions of the Ebro River. These compounds are generated by fragmentation of DDT in anoxic conditions (Metcalf, 1973) and could originate from polluted sediment

laid on the riverbed. Similar distributions have been found in benthivorous fish (carps, bream and white bream) (Goerke et al., 1979; Covaci et al., 2006) which suggest a close relationship between the high dietary percentage of benthos and muscle composition of OCs.

Downstream from Flix water reservoir the relative percentage of DDEs increases (representing near the 50% of total DDTs) by reduction of DDTs. This is observed along each sampled European catfish until a constant value of 6–20% of total DDTs approximately. However, 4,4'-DDT is still present in samples located far away from the emission site. In other studies, the relative composition of this metabolite represented less than 0.5% or was not detected (Erdogruel et al., 2005; Covaci et al., 2006; Stancheva et al., 2013)

3.7. Hexachlorocyclohexanes

The HCH concentrations in the European catfish from the Sau and Flix reservoirs, 0.3 and nd–0.6 ng/g ww, respectively, and downstream, nd–2.3 ng/g ww, are in the same range than those found in European catfish from Kahramanmaras, 0.13–2.2 ng/g, and slightly higher than those from the Danube Delta, 0.66–0.72 ng/g. The European catfish concentrations upstream the Flix reservoir, 0.2 ng/g, are somewhat lower than in those found in the Danube Delta or Kahramanmaras.

3.8. Organochlorine compounds and lipid content

No significant correlations were found between OC concentrations and lipid content in the Ebro River bed sites, Flix, meander, Xerta,

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

9

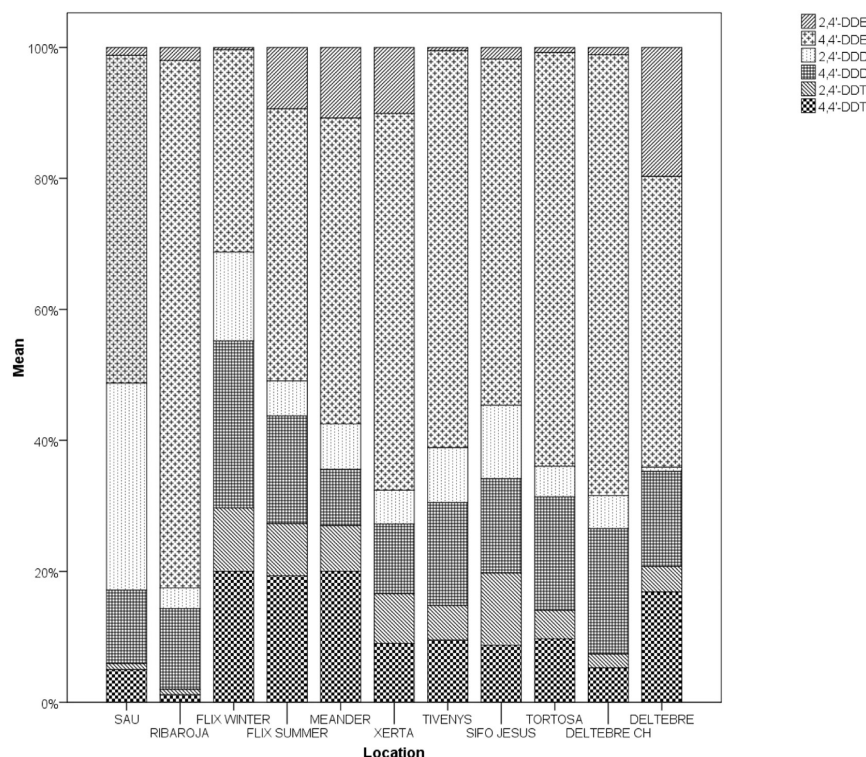


Fig. 5. Average percentage distributions of the DDT compounds in the European catfish collected at each location.

Deltebre, where fish lipid content was lower than in the channels. In contrast, in the channel samples, Tivenys, Sifó de Jesús and Deltebre Channel, significant linear correlations between lipids and concentrations of PeCB ($r^2 = 0.997$ and 0.991 , only in the two first sites), HCB ($r^2 = 0.963$, only in Tivenys), total HCHs ($r^2 = 0.834$, also in Tivenys) were found. PCBs and DDTs also showed similar correlations with lipid content in the channel samples but the p values did not reach statistical significance (Table 4).

Significant correlations were also observed in the European catfish from Sau and Ribarroja for lipid content and the concentrations of PeCB, HCB (only Sau), total HCHs, total DDTs (only Sau) and total PCBs in both locations (Table 4). Accordingly, in the locations with lower flow intensity, e.g. the Sau and Ribarroja reservoirs and the irrigation channels, European catfish have higher lipid content and tend to accumulate more OCs if they have more lipids which suggest a food web

structure approaching steady-state conditions. Conversely, European catfish living in the sites from the main river course have to be more active, involving lower lipid content and OC accumulation not related to food webs in which these compounds would be distributed according to organic matter content.

4. Conclusions

The concentrations of HCB, PCBs and DDT compounds in the European catfish collected downstream the chlor-alkali plant in a river stretch encompassing the last 100 km of the Ebro River reflect the past discharges of these compounds from this factory. In the hydraulic regime of this last stretch, without tributaries of significant flow, the compounds released 100 km upstream, e.g. HCB, PCBs and DDTs, are still found at concentrations above those of the catfish from the

Table 4

Correlation coefficients (r^2) and p values between lipid content (%) and concentration of organochlorine compounds ($\log(\text{ng/g wet weight})$) in the European catfish from different sampling sites. $n = 4$ in all localities.

Locality	PeCB	HCB	Total HCHs	Total PCBs	Total DDTs
Sau	0.844 $p = 0.041^*$	0.993 $p = 0.002^*$	0.861 $p = 0.036^*$	0.947 $p = 0.013^*$	0.952 $p = 0.012^*$
Ribarroja	–	0.5 $p = 0.146$	0.935 $p = 0.017^*$	0.892 $p = 0.028^*$	0.703 $p = 0.081$
Tivenys	0.997 $p = 0.001^*$	0.963 $p = 0.009^*$	0.834 $p = 0.043^*$	0.593 $p = 0.115$	0.566 $p = 0.124$
Sifó de Jesús	0.991 $p = 0.002^*$	0.653 $p = 0.096$	0.55 $p = 0.129$	0.729 $p = 0.073$	0.626 $p = 0.104$
Deltebre channel	0.524 $p = 0.138$	–	0.597 $p = 0.114$	0.679 $p = 0.088$	–

* $p < 0.05$.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin)..., Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

ARTICLE IN PRESS

10

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

reference sites. Thus, the concentrations in the specimens from the irrigation channels, 1.2–27 ng/g ww of HCB, 6.3–100 ng/g ww of total PCBs and 1–270 ng/g ww of total DDT compounds, are much higher than in those collected upstream the chlor-alkali discharge site, 0.2 ng/g ww for HCB, 5.6 ng/g ww for PCBs and 7.5 ng/g ww for DDE in the Ribarroja reservoir.

The OCs in the specimens collected in the channels showed higher concentrations than those found in the specimens from the river bed sites. However, European catfish collected in sites under lower water flow, e.g. Ribarroja reservoir and the irrigation channels after the weir of Xerta, showed higher muscle lipid content, 1.09–7.2%, than those from higher current intensity sites such as those in the river bed, 0.27%–0.67%. Catfish living under high current intensities need to be more active than those in calm waters to stay in their habitats and this is likely reflected in lower lipid accumulation.

These differences suggest that normalization to lipid content is necessary for comparison of the OC accumulation in specimens from riverine systems living under different flow intensities. In the European catfish from the areas under lower water flow, the ww concentrations of most OCs were correlated to muscle lipid content. Accordingly, normalization of the OC concentrations to lipid content provides a more uniform distribution of all OC values measured along the river and the influence of the discharges in the Flix reservoir downriver. In this respect, the uniform distributions of PCB congeners downriver are consistent with a single main source of these compounds for the European catfish collected downriver.

The distributions of DDT compounds are predominated by 4,4'-DDE, as commonly observed in many fish distributions from aquatic environments. However, in these fish there is a high relative proportion of 4,4'-DDD and 2,4'-DDD. This feature is generally found in DDT mixtures from anoxic environments and is consistent with a high dietary contribution of benthic organisms.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Spanish Ministry of Environment and the Catalan Agency for Water Management (ACA). The authors thank the Natural Reserve of Sebes for their assessment during sampling in Flix water reservoir. Help assistance in fish collection and field data recording were performed by Luis Carrasco, Carme Bosch, Romero Roig and David Soto. Mireia Bartrons assisted in some laboratory tasks. Fish were collected under licence of the Departament de Medi Ambient (Catalan Government) and Natural Reserve of Sebes. One of us D.H. thanks the financial support from the Spanish Ministry of Science and Education (FPU, AP2007-01824).

References

- Benejam, L., Benito, J., Ordóñez, J., Armengol, J., García-Berthou, E., 2008. Short-term effects of a partial drawdown on fish condition in a eutrophic reservoir. *Water Air Soil Pollut.* 190, 3–11.
- Berdie, L., Grimalt, J.O., 1998. Assessment of the sample handling procedures in a labor-saving method for the analysis of organochlorine compounds in a large number of fish samples. *J. Chromatogr.* 823, 373–380.
- Bosch, C., Olivares, A., Faria, M., Navas, J.M., del Olmo, I., Grimalt, J.O., Piña, B., Barata, C., 2009. Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry. *Aquat. Toxicol.* 94, 16–27.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C., 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners—a mass balance approach: 1. Global production and consumption. *Sci. Total Environ.* 290, 181–198.
- Cabistañ, J., 2003. *Iniciación a la pesca del siluro*. Ed. Tikal.

- Carol, J., Benejam, L., Pou-Rovira, Q., Zamora, L., García-Berthou, E., 2003. First record of white bream (*Abramis bjoerkna*) in Catalonia (Spain) and new introductions of exotic fish *Alburnus alburnus*, *Sander lucioperca* and *Silurus glanis* into Catalan river basins. *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.* 71, 135–136.
- Carol, J., Zamora, L., García-Berthou, E., 2007. Preliminary telemetry data on the movement patterns and habitat use of European catfish (*Silurus glanis*) in a reservoir of the River Ebro, Spain. *Ecol. Freshw. Fish* 16, 450–456.
- Carol, J., Benejam, L., Benito, J., García-Berthou, E., 2009. Growth and diet of European catfish (*Silurus glanis*) in early and late invasion stages. *Fundam. Appl. Limnol./Arch. Hydrobiol.* 174, 317–328.
- Catalan, J., Ventura, M., Vives, I., Grimalt, J.O., 2004. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4269–4275.
- Cheng, D.X., Yang, Z.Z., Wang, X.T., Sun, Y.Z., Xu, X.B., 2006. Organochlorine pesticides in tissues of Catfish (*Silurus asotus*) from Guanting reservoir, People's Republic of China. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 766–773.
- Clark, K.E., Gobas, F.A., Mackay, D., 1990. Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1203–1213.
- Covaci, A., Gheorghe, A., Hulea, O., Schepens, P., 2006. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. *Environ. Pollut.* 140, 136.
- Elvira, B., Almodovar, A., 2001. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of 21st century. *J. Fish Biol.* 59 (Supplement A), 323–331.
- Erdogru, O., Covaci, A., Schepens, P., 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaraş, Turkey. *Environ. Int.* 31, 703.
- European Commission. Institute for Prospective Technological Studies, 2008. Integrated pollution prevention and control (IPCC). Reference document on best available techniques in the chlor-alkali manufacturing industry (178 pp.).
- Freyhof, J., Kottelat, M., 2008. *Silurus glanis*. The IUCN red list of threatened species Version 2015.1. www.iucnredlist.org (Downloaded on 14 June 2015).
- Galassi, S., Guzzella, L., Battagazzore, M., Carrieri, A., 1994. Biomagnification of PCBs, p,p'-DDE and HCB in the River Po ecosystem (Northern Italy). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 174–186.
- Garí, M., Bosch, C., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2014. Impacts of atmospheric chlor-alkali factory emissions in surrounding populations. *Environ. Int.* 65, 1–8.
- Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W., Haffner, G.D., 1999. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environ. Sci. Technol.* 33, 133–141.
- Goerke, H., Eder, G., Weber, K., Ernst, W., 1979. Patterns of organochlorine residues in animals of different trophic levels from the Weser Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 10, 127–133.
- Grimalt, J.O., van Drooge, B.L., 2006. Polychlorinated biphenyls in mountain pine (*Pinus uncinata*) needles from Central Pyrenean high mountains (Catalonia, Spain). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 61–67.
- Grimalt, J.O., Sunyer, J., Moreno, V., Amaral, O.C., Sala, M., Rosell, A., Antó, J.M., Albaigés, J., 1994. Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content. *Int. J. Cancer* 56, 200–203.
- Grimalt, J.O., Fernandez, P., Berdié, L., Vilanova, R.M., Catalan, J., Psenner, R., Hofer, R., Appleby, P.G., Rosseland, B.O., Lien, L., Massabuau, J.C., Battarbee, R.W., 2001. Selective trapping of organochlorine compounds in mountain lakes of temperate areas. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2690–2697.
- Hinck, J.E., Norstrom, R.J., Orazio, C.E., Schmitt, C.J., Tillit, D.E., 2009. Persistence of organochlorine chemical residues in fish from the Tombigbee River (Alabama, USA): continuing risk to wildlife from a former DDT manufacturing facility. *Environ. Pollut.* 157 (2), 582–591.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin 646 pp.
- Metcalfe, R.L., 1973. A century of DDT. *J. Agric. Food Chem.* 21, 511–519.
- Muñoz, P., 1994. *Alemany a l'Ebre, La colònia química alemanya de Flix (1897–1994)*. El Medol, Tarragona (171 pp.).
- Palanques, A., Grimalt, J.O., Belzunces, M., Estrada, F., Puig, P., Guillén, J., 2014. Massive accumulation of highly polluted sedimentary deposits by river damming. *Sci. Total Environ.* 497–498, 369–381.
- Squadrone, S., Favaro, L., Prearo, M., Vivaldi, B., Brizio, P., Abete, M.C., 2013. NDL-PCBs in muscle of the European catfish (*Silurus glanis*): an alert from Italian Rivers. *Chemosphere* 93, 521–525.
- Stancheva, M., Georgieva, S., Makedonski, L., 2013. Persistent organic pollutants — PCBs and DDTs in fish from the Danube River and from the Black Sea, Bulgaria. CBU International Conference on Integration and Innovation in Science and Education (Prague).
- Vives, I., Grimalt, J.O., 2002. A method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. *J. Chromatogr. B* 768, 247–254.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in European catfish (*Silurus glanis*) living in river areas under the influence of a chlor-alkali plant (Ebro River basin), *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.103>

4.2.2 Article 3

Concentrations of organochlorine compounds in different species of fish living in a polluted water reservoir (Flix, SW Catalonia, Spain)

David Huertas¹, Joan Grimalt¹, Josep Benito²,
Lluís Benejam² & Emili García-Berthou²

¹*Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain*

²*Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, E-17071 Girona, Spain*

Article submitted to: Environmental Science & Technology



Abstract

The study of organochlorine compounds in muscle of freshwater fishes inhabiting a heavy polluted water reservoir revealed differences of bioaccumulation between species. CBs (PeCB and HCB), HCHs, PCBs and DDTs were highly bioaccumulated by carps (*Cyprinus carpio*) followed by roach (*Rutilus rutilus*), rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) and wels (*Silurus glanis*) in Flix water reservoir ecosystem. On the other hand, smaller species had higher mean concentrations of PCSs. Diet and life habits had strong influence in concentrations of pollutants and could explain some bioaccumulation patterns instead of only trophic positions. Overall, elevated concentrations of several organochlorine compounds were found in fishes of Flix water reservoir indicating direct effects of the historical production of the chloro-alkali plant located in the river margin.

1. Introduction

Since second half of the last century, some water reservoirs were created in the last stretch of Ebro River. One of this locations is the Flix reservoir which is located 90 km upstream the Delta and where a chloro-alkali plant dumped a great amount of muds to the riverbed during the last hundred years. Previous studies showed that concentrations of organochlorine compounds in these materials were high, involving mean hexachlorobenzene (HCB) concentrations of 19000 ng/g, total polychlorobiphenyls (PCBs) of 39000 ng/g and summed DDTs/DDEs/DDDs of 1300 ng/g (Risebrough et al., 1983; Grimalt et al., 1988; Amaral et al. 1996). Flix reservoir was built during the 60s and since then these polluted materials have been in a continuous growth reaching between 200000 and 360000 tones. That mud was accumulated under the usual water level and nowadays occupies the major part of the right river margin at this place. As far as was known that these polluted sediments were under the influence of the river water dynamics it was important to recognize which impacts were generated by the pollutants in fishes inhabiting that reservoir. These organic pollutants were selected not only because of their well-known toxic properties but also because they could reflect re-mobilizations of old polluted materials accumulated in the riverbed. Recent studies have determined different mean residence times inside fishes for some organochlorine compounds. Values ranged between some weeks (HCHs), a year (HCB and *p,p'*-DDE) and between 2 and 3 years (*p,p'*-DDT, PCB-28, PCB-52). For those more chlorinated compounds the residence times inside organisms exceed the decade (Catalan et al., 2004).

On the whole, bioconcentration is considered to be a property of those compounds which have a low octanol-water partition constant (Clark et al., 1990) and moreover, level of biomagnification in fishes rises up, in general, in compounds with a high octanol-water partition constant (exception of PCB-180) (Gobas et al., 1999; Catalan et al., 2004). That exception can reflect the low membrane permeability of the highest molecules (Mackay, 1982). All these concepts are regulated by different factors such as physical and chemical properties of the compounds, their bioavailability, the physiologic control of the organism, the lipid content of the tissues and the intra- and inter-specific and environmental variations (Barron, 1990).

The three exposition routes to pollution that affect the aquatic organisms are: water, sediments and the food web. In fishes, direct exposition from the water is produced by the gill-exchange while breathing and by direct skin contact. These values are assumed as 100% of water absorption (Klyszejko & Cierieszko, 1999). In addition, absorption of chemical products stored in sediments is produced by direct skin contact and through the mouth (oral ingestion followed by absorption in the intestinal tract). The exposition routes through the sediments will become

more or less important depending on the behaviour of the fish species because the interaction between the fish and the aquatic environment changes. Finally, in the case of the exposition through the food web, species will behave in a different way according to their feed habits (Vives, 2004).

The analysis of concentrations of organochlorine compounds in different fish-species tissues gave us an idea of their mobilization. That was important in order to found how could they affect the biota and which were the transference mechanisms through the food web because they could become an important problem to higher trophic levels (Fisk et al., 2001; Boon et al., 2002). This study pretend to contribute to the knowledge of the impact caused by a punctual source of organochlorine pollution in some freshwater fish species which are distributed in different trophic levels inside the Flix reservoir ecosystem.

2. Material and Methods

2.1 Freshwater sampled fish species

The European catfish (*Silurus glanis*), also known as wels, is the largest European freshwater fish, being native to eastern Europe and western Asia and most abundant in the Danube and Volga river basins (Carol et al., 2009). Wels is nowadays popular among European anglers and has been introduced to many European countries, including France, Italy, the Netherlands, Belgium, Spain, and the United Kingdom (Elvira&Almodóvar, 2001). The contamination produced by organochlorine compounds in European catfish in freshwater habitats is, however, poorly known, probably because of the difficulty of sampling such a large species in large rivers or lentic ecosystems (Carol et al., 2007). The European catfish was first introduced to the Iberian Peninsula through River Segre (Ebro river basin) around 1974 supposedly by Roland Lorkowsky, a German biologist who illegally introduced 32 young individuals of catfish (Cabistañ, 2003). Soon after, catfish were also introduced to the lower River Ebro in Mequinensa, Riba-roja and Flix reservoirs for sport fishing (Elvira & Almodóvar, 2001), where it is abundant nowadays.

Common carp (*Cyprinus carpio*) is the most well-known freshwater species in Spain and in fact it is the largest cyprinid in Catalan reservoirs (Carol et al, 2009). It was introduced as an ornamental fish in 17th century from Eurasia and Southwest of Asia (Elvira & Almodóvar, 2001) and prefers calm waters or slow currents in mid-temperate regions (2-25°C). In the Flix water reservoir Carol et al, 2009 found the second highest total length median for common carps from a list of 14 studied Catalan reservoirs in 2003. Due to its size, carps have an

omnivorous diet and feeds almost of everything, including aquatic plants, arthropods, zooplankton and even death small fishes. Their behaviour, as a benthic species, usually have been associated with the underwater riverbed zone and it's known that can cause some remobilization of sediments.

Roach (*Rutilus rutilus*) is a freshwater fish which belongs to cyprinids family. It is native to the major part of Europe and western Asia and was introduced in Spain as an "Improvement" of wild stocks between 1910 and 1913. That means that with the introduction of major predator species, native species decreased in number and it was necessary to introduce forage species more closely adapted for life with the predators (Elvira & Almodóvar, 2001). Roach it is easily found in stream waters although it can be also found in calm water reservoirs, lakes and ponds. In Catalonia has been also introduced by anglers in last decades. Typically is a small fish rounding 35 cm and weight about one kilogram. Their alimentary habits consist of little molluscs, insects and larvae, worms, macrophytes and even though some times they eat surface water insects (Bazzanti et al., 1997). As in other studies, roach was chosen because of its abundance and its interesting central position in the trophic web (Chevreuil et al., 1995a, b; Blanchard et al., 1997).

Rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) is also a freshwater fish very widespread in Europe and Asia. It was artificially introduced to Ireland, U.S.A., Morocco, Madagascar, Tunisia, New Zealand, Canada and Spain also for "Improvement" of wild stocks (Elvira & Almodóvar, 2001). This species is morphologically very similar to roach (*Rutilus rutilus*) and usually they are confused. Differences can be found in eyes colour and overcoat in the position of dorsal and ventral fins. Dimensions are also similar because rudds can grow up to 45 cm and prefers light waters in locations with abundance of aquatic vegetation. They feed aquatic plants and also little water surface insects because that species has morphological adaptations to eat in the upper parts of the water column (pelagic zone).

Gambusia holbrooki, also known as eastern mosquitofish, is found principally in freshwater habitats although they can also live in more salty waters. It is native to East and South zones inside the USA but was introduced in Spain in 1921 to control the malaria mosquito (Elvira & Almodóvar, 2001). In this case, successful introductions of this species became a threat for the autochthon fauna and especially because of its aggressiveness. Mosquitofish is classified as small species because males do not grow more than 5 cm of total length. They are used to temperate climates and calm waters, where usually form groups in river and reservoir margins. They feed mainly on terrestrial insects in river margins and other insects of aquatic plants. Sometimes they can also feed on mosquito larvae.

2.2 Sampled location and field work

In the River Ebro, five different species of fishes were caught in Flix reservoir, nearly 85 km upstream the river mouth (Ebro Delta). Flix is a small reservoir that works more as a river rather than as a calm water reservoir because it has short residence time of waters (0.15 days); its width ranges 300-400 m and its maximum depth is 9.5 m (Fig. 1). The littoral area of Flix reservoir presents poor diversity of substrata and has some shallow slopes with reed (*Phragmites australis*) beds. In general, fish captures in this reservoir were dominated in abundance by introduced cyprinids (roach *Rutilus rutilus*; rudd *Scardinius erythrophthalmus*; and common carp *Cyprinus carpio*) (Carol et al., 2006) but wels (*Silurus glanis*), as a predator, and gambusia (*Gambusia holbrooki*), as smallest analyzed species were also captured regularly.

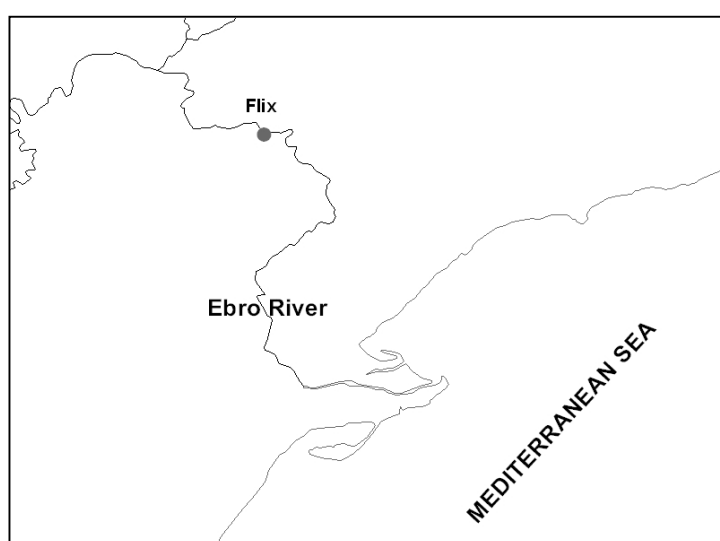


Fig. 1. Map of Flix reservoir location in the last stretch of Ebro River basin

A total of 99 individuals of five different fish species were collected from February to July 2006 as we summarized in table 1. Most fishes were captured by boat or wading electrofishing in shallow sites. Working at 500 volts and 13 amperes it is enough potency to capture fishes in Flix reservoir. By the way, fishes could be collected still alive and were transported to the field laboratory where they could be sexed, measured, weighted and dissected. Total length was measured to the nearest millimeter and total weight to the nearest gram. After that, all muscle tissue filets (for wels (*Silurus glanis*), carp (*Cyprinus carpio*), roach (*Rutilus rutilus*) and rudd (*Scardinius erythrophthalmus*)) and the whole individual (for mosquitofish (*Gambusia holbrooki*)) collected were kept in aluminum foil previously cleaned and stored at -20°C until further analysis.

Table 1. Summary of sampled species inside the Flix water reservoir showing mean and range (in brackets) values for length, weight and lipid content

Common name	Species	Season	N	Length (mm)	Weight (g)	% Lipids
Wels	<i>Silurus glanis</i>	Winter	1	826	5097	0.81
			1	(366-1200)	(259-12750)	(0.15-2.59)
		Summer	9	1130	13927	0.38
			9	(309-1990)	(190-42000)	(0.16-0.62)
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Spring	1	557	3884	1.35
			9	(171-735)	(101-7800)	(0.56-2.81)
		Summer	1	587	4176	1.42
			4	(463-761)	(1960-7940)	(0.46-5.77)
Roach	<i>Rutilus rutilus</i>	Summer	6	163	87	2.69
				(131-223)	(39-198)	(1.90-3.53)
Rudd	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Summer	2	204	183	1.69
			0	(120-258)	(29-335)	(0.48-6.87)
Mosquitofish	<i>Gambusia holbrooki</i>	Summer	2	36	0.65	6.40
			0	(26-48)	(0.20-1.54)	(2.80-13.13)

2.3 Materials

Residue analysis solvents, n-hexane (Ref. 1.04371), dichloromethane (Ref. 1.06054), isooctane (Ref. 1.15440), acetone (Ref. 1.00012), concentrated sulphuric acid 95–97% (Ref. 1.00731) and anhydrous sodium sulphate (analytical-reagent grade) (Ref. 1.06649) were from Merck (Darmstadt, Germany). Sulphate was activated overnight by heating at 400°C. Cellulose extraction cartridges of 20 mm I.D. and 80 mm long were from Whatman Ltd (UK). HCB, HCHs mixture (α -, β -, γ - and δ -), DDTs mixture (*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD and *p,p'*-DDD), PCSs mixture (PeCS, α -HCS, Z- β -HCS, E- β -HCS, Z- α - β -HpCS, β - β -HpCS, E- α - β -HpCS, OCS) and PCBs mixture (28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) were from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany). As a recovery standards solution, 1,2,4,5-tetrabromobenzene (TBB) from Aldrich (Steinheim, Germany) and PCB 200 from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany) were used. The internal standard was PCB 142 also from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany). The standard mixtures of HCH isomers, HCB, PCBs, DDTs and surrogate solution composed of 1,2,4,5-tetrabromobenzene and PCB 200 were prepared in isooctane.

2.4 Analytical procedures

Individual muscle tissue (except the gambusia, which was analysed as a total individual) samples from fishes (3-5 g) were ground with activated sodium sulphate until a fine powder was obtained and was introduced into previously cleaned cellulose cartridge (24h in Soxhlet). This mixture was Soxhlet-extracted with 100 mL of n-hexane–dichloromethane (4:1 v/v) for 18 h. At this step, TBB and PCB-200 were added as recovery standards. The lipid content of all samples

was determined from an aliquot of the extract gravimetrically. The rest of the extract was concentrated under vacuum to 2 mL and 2 mL of sulphuric acid were added. After vigorous stirring in a Vortex-mixer (2 min) the mixture was centrifuged to remove any foam in the interface and the sulphuric acid layer was discarded. This clean-up step was repeated until a colourless transparent acid layer (2 mL) was obtained (3–5 times). The final sulphuric acid mixture was re-extracted with n-hexane (2x2 mL) and all n-hexane solutions were combined and concentrated by vacuum rotary evaporation (20°C, 20 Torr) to small volumes (ca. 300 µL). Solutions were then transferred to vials and evaporated just to dryness under a gentle stream of nitrogen (10–20°C). The cleaned extract was re-dissolved in 50 µl of isooctane for instrumental analysis.

2.5 Instrumental analysis

Samples were analyzed in a Hewlett-Packard gas chromatograph Model HP-5890 equipped with an electron-capture detector and an HP-7673-A autosampler. The separation was achieved with a 60 m x 0.25 mm I.D. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 mm). The oven temperature was programmed from 90°C (holding time 2 min) to 130°C at 15°C/min and finally to 290°C at 4°C/min, keeping the final temperature for 10 min. Injector and detector temperatures were 280°C and 320°C, respectively. Injection was performed in the splitless mode, keeping the split valve closed for 35 s. Helium was the carrier gas (1.5 mL/min) and nitrogen was used as the make-up gas for the detector (60 mL/min).

Secondary confirmation and analysis of polychlorostyrenes (PCSs) were performed on all samples using a GC-MS-NICI. The examination by negative ion chemical ionization mass spectrometry coupled to gas chromatography allowed a structural confirmation of the analyzed compounds. A GC system from Agilent Technologies 6890A coupled to an MS detector 5973N was used. The system was equipped with a 60 m x 0.25 mm I.D. DB-5 column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 mm). Helium was used as carrier gas at a flow of 1.0 mL/min. Ammonia was used as reagent gas at a flow of 1.75 mL/min. The temperature program started at 90°C (with a holding time of 2 min), then increased to 150°C at 10°C/min and to 310°C at 4°C/min with a final holding time of 20 min. Injector, ion source and transfer line temperatures were 250, 176 and 280°C, respectively. The dwell time was 50 ms/channel.



2.6 Quality assurance

A blank was made for each batch of analysed samples and also in each sample the standard recoveries (TBB and PCB 200) have been calculated. Mean recoveries of spiked standards in samples were $61 \pm 14 \%$ and $90 \pm 23 \%$, respectively.

Residue concentrations were reported on a wet weight basis and were adjusted for the recovery percentage. Quantifying the blanks of each batch, detection limits ($nd = x + 3\sigma$) and quantification limits ($nq = x + 5\sigma$) have been determined. In this case “x” was the median and “ σ ” the standard deviation. Detection limit for all organochlorine compounds analysed with the GC-ECD ranged between 0.05 and 0.41 ng/g on a wet weight basis. On the other hand detection limit for PCSs analysed with the GC-MS ranged between 0.002 and 0.008 ng/g also on a wet weight basis.

2.7 Statistical procedures

For all individual organochlorine compounds mean concentrations and the range (minimum and maximum) were calculated. Median values were exposed in the box plots with the percentiles and outliers (Fig. 2 and Fig. 3). Data concentrations of organochlorine compounds were frequently not normally distributed, so a conversion into logarithmic values were applied when was necessary for statistical analysis. Verification of normality was done using the Kolmogorov-Smirnov test for biometric data (length and weight) and for each compound in all species before and after the conversion. For each contaminant, a value of one-half its limit of detection was assigned to samples with undetectable contaminant concentrations only for statistical purposes. Those pollutants for which concentrations in all analysed samples were below the limits of detection were reported as non-detected. The statistical evaluation was based, when was possible, on the use of parametric tests due to the normality obtained from original concentrations or after logarithmic conversion of data. When it was impossible, a non-parametric test (Kruskal-Wallis) was employed. Otherwise, we have used T-test to examine differences between seasons in the same species (wels and common carps) and ANOVA test with *post-hoc* multi-comparisons to evaluate differences between species inside Flix water reservoir. We have employed the Scheffé *post-hoc* test because we compared groups with different number of samples. In non-parametric cases, after a positive Kruskal-Wallis test, inter-paired Mann-Whitney tests with Bonferroni's corrections were used as a *post-hoc* test. Results were considered as significant at p -values <0.05 . Significant differences between seasons and species in some groups of pollutants (sum of HCHs, sum of DDTs, sum of PCBs and sum of PCSs) were expressed for total concentrations because differences between almost all individual congeners inside each group had generated the same results.

Total concentration of HCHs, DDTs, PCBs and PCSs (sum of HCHs, sum of DDTs, sum of PCBs and sum of PCSs, respectively named in this paper) were calculated as the sum of individual congener concentrations according to previous studies (Erdogrul et al., 2005; Lacorte et al., 2006; Antoniadou et al., 2007; De la Cal et al., 2008; Hinck et al., 2008). In this case, sum of HCHs included α -, β -, γ - and δ - isomers. Sum of DDTs represented the sum of six metabolites, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT. Sum of PCBs included seven congeners (28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) which belong to the group known as “target” or “indicator” PCBs (Bachour et al., 1998). Finally, sum of PCSs represented eight individual congeners (1 penta-CS, 3 hexa-CSs, 3 hepta-CSs and octa-CS).

3. Results

Samples collected in different seasons were finally analysed only for the two most abundant species captured in the Flix water reservoir: common carp (*Cyprinus carpio*) and wels (*Silurus glanis*). In this way, at the end seven groups of samples were considered individually depending on species and season. Results of individual organochlorine compounds concentrations analysed in this work were summarized in table 2. Concentrations found in winter wels samples were heterogenic because they had very low values in some individuals (minimums of 1.3 ng/g ww, 0.1 ng/g ww and 1.1 ng/g ww for the sum of DDTs, sum of HCHs and sum of PCBs, respectively) while others showed high concentrations (maximums of 700 ng/g ww, 9.5 ng/g ww and 400 ng/g ww for the sum of DDTs, sum of HCHs and sum of PCBs, respectively).

Mean concentration for the sum of DDTs was 233 ng/g ww, a result that exceeded those found in other studies for this species (54 ng/g ww in Erdogrul et al., 2005; 7 ng/g ww in Covaci et al., 2006; <5 ng/g ww in Cheng et al., 2006 (in *Silurus asotus*)). However, the maximum was similar to wels captured in Turkey (960 ng/g ww in Erdogrul et al., 2005). Mean concentration for the sum of PCBs was also high (129 ng/g ww) and almost each individual sample exceed mean values of other studies (3.4 ng/g ww in Erdogrul et al., 2005; <5 ng/g in Covaci et al., 2006). Anyway, in River Po samples mean concentration for the sum of only 4 PCB congeners (118, 138, 153 and 180) revealed higher concentrations than those found in Flix water reservoir (562 ng/g ww in Galassi et al., 1994). The next two most important pollutants were HCB and the sum of PCSs with mean concentrations of 26 ng/g ww and 17 ng/g ww, respectively. In both cases, these mean levels were at the same order of magnitude as those of the most chlorinated individual congeners of PCBs (PCB-138, PCB-153 and PCB-180) showing the great influence of the chloro-alkali plant located in this reservoir. High concentrations of HCB could be explained by the huge presence of this compound in the sediments laid in the riverbed. In some

cases these concentrations could reach more than the 50% of the total concentrations of organochlorine compounds analysed in sediments (Grimalt et al., 2003).

Summer wels samples had lower concentrations (in comparison with winter samples) for the main group of organochlorine compounds except the HCB. Ranges for the sum of DDTs and PCBs were 17-77 ng/g ww and 9-47 ng/g ww, respectively. These values were in the same order of magnitude that those found in Erdogrul et al. 2005 but still above of samples analysed by Covaci et al., 2006 or Cheng et al., 2006. In this case, comparing mean concentrations of the principal organochlorine groups, HCB was the pollutant with highest values (38 ng/g ww) just above the sum of DDTs (32 ng/g ww), sum of PCBs (18 ng/g ww) and sum of PCSs (10 ng/g ww).

Concentrations in carps (*Cyprinus carpio*) were, generally, high for almost all compounds, being HCB the predominant one in both seasons (spring and summer samples). Overall, it was the most abundant pollutant in 79% of samples. Pentachlorobenzene (PeCB) had the highest concentrations in summer carps tissue with 24 ng/g ww (with the exception of mosquitofish results because for this species the whole fish was analysed). Mean concentrations of HCB were 326 ng/g ww and 276 ng/g ww, in each season respectively. These values were slightly higher than sum of DDTs, sum of PCBs and sum of PCSs, indistinctly of season. HCB mean concentrations in Flix reservoir were strongly higher than elsewhere (0.07 ng/g in Erdogrul et al., 2005; 0.4 ng/g in Covaci et al., 2006; 2.7 ng/g in Hinck et al., 2008). It is known that HCB can easily scatter through the atmosphere and that facilitates the distribution along the closer zones of the chlor-alkali plant located in Flix water reservoir. In recent studies of this compound in olive leaves (Bosch et al. data non-published yet), an area of 2 kilometres around the factory was set as an important drain of HCB through the atmosphere too. Concentrations found for the sum of DDTs (mean values of 290 ng/g ww and 129 ng/g ww in spring and summer samples, respectively) and the sum of PCBs (mean values of 148 ng/g ww and 104 ng/g ww, also respectively) were quite a lot higher than other studies in carps from Indian lakes (14 ng/g ww of DDTs and nearly 1 ng/g ww of PCBs in Erdogrul et al., 2005), from the Danube delta (22 ng/g of DDTs and 9 ng/g of PCBs in Covaci et al., 2006) and from East European countries like Czech Republic and Moldova (97 ng/g of DDTs and 14 ng/g of PCBs in Marsalek et al., 2004; 10 ng/g of DDTs in Sapozhnikova et al., 2005; and 30 ng/g of PCBs in Svobodova et al., 2004) but even lower than results found in the most polluted places (Buffalo River, New York; South-West USA rivers; and the Great Lakes) where mean concentrations could arise 500 ng/g ww for the sum of DDTs and between 94 ng/g ww and 1330 ng/g ww for the sum of only the 4 main congeners of PCBs (118, 138, 153 and 180) (Loganathan et al., 1995; Gerstenberger et al., 1997). Mean values for the sum of HCHs were at the same order of magnitude of those found by Sapozhnikova et al., 2005 in Moldova carps (3 ng/g ww) and Covaci et al., 2006 (1.6 ng/g

ww). Finally, mean concentrations for the sum of PCSs in carps were more or less one order of magnitude higher than those found in wels samples.

In 67% of roach (*Rutilus rutilus*) the most abundant congener was a metabolite of PCS (α -HxCs or OCS) and in the other 33%, HCB was the individual predominant organochlorine compound. The highest concentrations of α -HxCs and OCS were 267 ng/g ww and 268 ng/g ww, respectively while HCB had a maximum concentration of 614 ng/g ww. In this case, mean concentration for the sum of PCSs was 348 ng/g ww while for the HCB was 258 ng/g ww. These extremely high levels of HCB indicate again the influence of the chloro-alkali plant located besides the Flix water reservoir. HCB mean concentration in other studies of this species were much more lower encompassing between 2 ng/g ww and 8 ng/g ww (Galassi et al., 1994; Chevreuil et al., 1995; and Watanabe et al., 1999). In this species mean values for the sum of DDTs and the sum of PCBs were lower than in common carps. Concentrations were 95 ng/g ww and 82 ng/g ww, respectively. Values for total DDTs were similar to those found for the same species in France and Finland (60 ng/g ww of *p,p'*-DDE in Chevreuil et al., 1995; and 51 ng/g ww in Pyysalo et al., 1983) but higher than those found in Italy and in the Caspian Sea (26 ng/g ww of *p,p'*-DDE in Galassi et al., 1994; and 17 ng/g ww in Watanabe et al., 1999). Mean results for the sum of PCBs were lower than those found in France or Italy (470 to 765 ng/g ww in Galassi et al., 1994; 420 to 2500 ng/g ww in Chevreuil et al., 1995; and 1000 to 2000 ng/g ww in Bazzanti et al., 1997) but at the same order of magnitude of Finnish lake samples (66 ng/g ww in Hattula et al., 1978; and 102 ng/g ww in Pyysalo et al., 1983). On the other hand, in Caspian Sea, United Kingdom and Greece, mean concentration for the sum of PCBs were clearly lower, with values between 3 and 33 ng/g ww (Watanabe et al., 1999; Yamaguchi et al., 2003; and Antoniadou et al., 2007). The sum of HCHs in our study was very low and in both, France and Caspian Sea, mean concentrations were higher (22 ng/g in Chevreuil et al., 1995; and 25 ng/g ww in Watanabe et al., 1999).

Rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) were expected to show similar concentrations to those found in roach but instead of this they had lower concentrations for nearly all principal groups of organochlorine compounds analysed. Only for the sum of PCSs, rudd concentrations were higher than roach ones. In 95% of the samples the predominant pollutant was a metabolite of the group of PCSs, exactly in 75% was OCS and in 20% α -HxCs. HCB was the most abundant organochlorine compound only in one sample (5%). Concentrations of these major compounds reached 402 ng/g ww, 556 ng/g ww and 486 ng/g ww, respectively while the maximums for the sum of DDTs and PCBs were 239 ng/g ww and 258 ng/g ww. All samples from this study had higher mean concentrations of HCB than means found for rudds from Italy in Galassi et al., 1994. Furthermore, mean concentration for the sum of DDTs of the present work was slightly higher than mean concentrations of *p,p'*-DDE (47 ng/g ww, as unique value reported) found in

the same paper. On the other hand, mean concentration for the sum of PCBs was 53 ng/g ww, while in Italy samples only the sum of four congeners (118, 138, 153 and 180) reported a mean value of 998 ng/g ww (Galassi et al., 1994).

The last species was mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) which is much smaller than the others and because of that we were forced to use the whole individual fish in each analysis. High concentrations found in this species could be explained by the elevated lipid content (see table 1) of the mixture (body + organs + skin). Anyway, the predominant metabolite in all samples was from the group of PCSs. α -HxCs was the most abundant pollutant in 95% of samples (mean concentration of 2316 ng/g ww) while in the remaining 5% it was OCS (mean concentration of 67 ng/g ww). Concentrations of HCB and the sum of DDTs were quite high with mean values of 198 ng/g ww and 274 ng/g ww, respectively and what is more, mean concentrations of PeCB, sum of PCBs and sum of PCSs were the highest of all fish species (55 ng/g ww, 245 ng/g ww and 2411 ng/g ww, respectively). Investigations done in different species indicated that muscle PCB contents account for near half of the whole body content in salmonids and roach (Niimi&Oliver, 1989; and Chevreuil et al., 1995) so when analysing these overall high concentrations in mosquitofish, the main conclusions should take into account that in this case the whole individual fish was extracted and not only the muscle tissues.

Table 2. Concentrations (mean and range, ng/g wet weight) of organochlorine compounds in different fish species of Flix water reservoir in year 2006t

Compounds	Flix (2006)						
	Wels (Winter) (n = 11)	Wels (Summer) (n = 9)	Carp (Spring) (n = 19)	Carp (Summer) (n = 14)	Roach (Summer) (n = 6)	Rudd (Summer) (n = 20)	Mosquitofish (Summer) (n = 20)
PeCB	1.5 (nd-5.4)	2.4 (0.1-8.7)	21.1 (0.2-57.2)	23.6 (1.0-67.9)	23.2 (2.6-63.1)	7.5 (0.4-39.0)	55.5 (2.9-120.6)
HCB	25.6 (nd-63.5)	38.4 (3.1-139.9)	326.3 (1.5-964.1)	275.5 (33.3-698.5)	258.4 (24.9-613.9)	125.0 (3.4-486.2)	197.7 (45.1-513.4)
α -HCH	0.3 (nd-1.0)	nd ^b	1.9 (0.1-20.5)	0.8 (nd-5.2)	nd ^b	nd ^b	nd ^b
β -HCH	0.5 (nd-3.4)	nd ^b	1.8 (nd-17.3)	0.5 (nd-2.0)	0.7 (0.3-1.3)	0.5 (nd-2.8)	1.6 (nd-4.8)
γ -HCH	0.7 (0.1-3.8)	nd ^b	0.3 (nd-2.2)	0.3 (nd-1.2)	0.3 (nd-0.9)	0.1 (nd-1.0) ^a	0.2 (nd-1.1) ^a
δ -HCH	1.8 (nd-5.7)	0.7 (nd-1.3)	0.1 (nd-1.7) ^a	nd ^b	nd ^b	nd ^b	0.6 (nd-3.4)
<i>o,p'</i> -DDE	0.8 (nd-4.4)	3.0 (0.7-4.9)	8.4 (0.7-58.9)	1.6 (0.1-6.8)	2.2 (0.8-3.7)	1.3 (0.1-5.6)	2.2 (nd-4.7)
<i>p,p'</i> -DDE	72.1 (1.2-214.6)	13.1 (5.4-43.4)	101.1 (7.9-474.1)	56.6 (4.8-192.0)	31.8 (6.2-57.2)	31.5 (5.7-100.4)	126.2 (75.3-213.7)
<i>o,p'</i> -DDD	31.6 (nd-69.0)	1.7 (nd-4.0)	66.4 (0.1-164.7)	23.6 (1.0-75.7)	19.5 (2.8-36.5)	15.7 (1.9-57.6)	31.4 (18.0-80.9)
<i>p,p'</i> -DDD	59.5 (0.1-158.0)	5.2 (2.4-10.0)	81.2 (1.2-175.4)	28.7 (1.2-78.0)	22.5 (2.9-34.6)	19.7 (2.1-54.1)	80.6 (28.8-128.6)
<i>o,p'</i> -DDT	22.5 (nd-75.8)	2.5 (1.0-7.4)	13.0 (nd-98.4)	11.8 (nd-55.9)	11.6 (0.5-29.4)	4.2 (0.3-19.1)	1.8 (nd-12.1)
<i>p,p'</i> -DDT	46.7 (nd-183.0)	6.1 (0.9-12.9)	20.3 (0.6-95.4)	6.3 (nd-26.2)	7.7 (1.0-20.3)	2.3 (0.4-13.5)	31.9 (7.7-85.7)
PCB-28	9.8 (nd-37.4)	1.5 (0.6-2.2)	24.0 (0.5-94.1)	20.2 (0.7-123.2)	23.2 (2.5-71.6)	10.4 (0.9-51.8)	37.4 (11.0-70.6)
PCB-52	8.6 (nd-28.0)	1.3 (0.5-2.0)	10.1 (nd-37.9)	14.5 (0.9-76.2)	12.3 (2.1-34.2)	6.1 (1.0-20.7)	25.9 (13.9-44.7)
PCB-101	12.6 (nd-46.8)	1.9 (1.1-5.0)	17.3 (0.7-78.7)	10.8 (0.6-42.7)	8.2 (1.2-26.2)	6.2 (0.7-31.0)	29.4 (20.7-41.2)
PCB-118	7.4 (nd-34.7)	1.1 (0.6-2.9)	18.4 (0.6-69.4)	5.3 (0.3-22.7)	3.4 (0.5-12.0)	2.4 (0.3-12.8)	12.7 (7.4-25.6)
PCB-138	30.1 (0.3-108.4)	3.9 (2.1-11.3)	26.6 (1.8-77.8)	18.7 (1.3-64.5)	14.6 (1.6-52.1)	10.4 (0.9-70.1)	47.9 (29.1-158.4)
PCB-153	31.2 (0.4-31.2)	4.8 (2.4-13.9)	28.6 (1.8-83.0)	19.8 (1.8-69.3)	11.2 (1.4-35.9)	11.1 (0.9-57.0)	60.0 (36.3-190.5)
PCB-180	28.7 (nd-113.9)	3.3 (1.4-10.4)	23.0 (1.2-80.1)	14.8 (0.8-50.4)	8.6 (0.7-31.2)	6.5 (0.5-15.5)	31.8 (18.3-91.1)
PeCS	4·10 ⁻³ (nd-0.03) ^a	nd ^b	0.01 (nd-0.06) ^a	0.07 (nd-0.68)	0.34 (0.03-1.42)	0.16 (nd-1.89)	0.27 (0.01-0.98)
α -HxCS	2.39 (nd-6.71)	2.24 (0.95-5.39)	16.82 (0.10-64.88)	54.22 (1.26-269.36)	160.32 (9.95-266.91)	178.52 (5.30-555.78)	2316.01 (404.99-5864.11)
Z- β -HxCS	0.40 (nd-0.92)	0.37 (0.13-0.78)	2.48 (0.04-11.56)	1.19 (0.03-4.02)	0.99 (0.09-2.57)	1.15 (0.07-2.99)	1.14 (0.10-9.49)
E- β -HxCS	0.01 (nd-0.05) ^a	4·10 ⁻³ (nd-0.01) ^a	0.01 (nd-0.07)	0.01 (nd-0.08) ^a	0.57 (0.07-1.88)	0.12 (nd-0.63)	0.11 (0.01-0.59)
Z- α - β -HpCS	0.02 (nd-0.60)	0.05 (0.01-0.11)	0.14 (nd-0.39)	0.62 (0.01-5.10)	1.70 (0.19-4.72)	1.57 (0.05-4.69)	1.01 (0.01-14.37)
β - β -HpCS	0.23 (nd-0.80)	0.41 (0.06-1.28)	1.25 (0.01-8.09)	3.15 (0.09-16.14)	9.59 (0.60-19.84)	10.98 (0.22-60.44)	27.08 (4.77-56.76)
E- α - β -HpCS	0.02 (nd-0.05)	0.06 (0.02-0.15)	0.26 (4·10 ⁻³ -0.75)	1.34 (0.02-10.79)	4.25 (0.54-11.11)	3.30 (0.11-9.25)	1.99 (0.09-30.80)
OCS	13.72 (nd-49.92)	6.86 (2.53-13.95)	34.39 (1.33-118.19)	78.01 (2.71-269.99)	170.52 (36.28-267.89)	210.84 (17.24-401.64)	63.66 (5.16-899.20)
Σ HCHs	3.3 (0.1-9.5)	0.7 (nd-1.3)	4.1 (0.3-40.0)	1.6 (nd-5.8)	1.0 (0.3-1.9)	0.6 (nd-3.8)	2.5 (nd-8.0)
Σ DDTs	233.1 (1.3-702.1)	31.6 (16.8-77.1)	290.4 (11.9-1033.3)	128.7 (7.3-405.9)	95.3 (14.1-168.8)	74.6 (12.0-238.8)	274.0 (150.6-441.4)
Σ PCBs	128.5 (1.0-460.8)	17.8 (9.3-47.4)	148.0 (7.0-425.4)	104.1 (6.8-440.3)	81.5 (10.1-263.3)	53.1 (6.7-258.2)	245.0 (154.1-531.7)
Σ PCSs	16.8 (nd-58.4)	10.0 (3.8-21.5)	55.4 (1.5-203.6)	138.6 (4.1-510.8)	348.3 (47.8-492.3)	406.6 (23.8-989.5)	2411.3 (692.0-5935.6)

nd: Not detected.

^a: >50% of samples not detected.^b: 100% of samples not detected.

3.1 Differences between seasons within species

In both cases wels and carp samples were captured in two different seasons. In winter 2006 eleven wels were obtained in Flix water reservoir while in summer of the same year only nine were caught. In addition for common carps, nineteen samples were obtained in spring and fourteen were captured in summer.

In order to study possible differences between samples of same species due to seasonality we compared them for some variables as length, weight and concentrations of all organochlorine compounds. Values of biometrical data and pollutant concentrations followed a normal distribution in wels while for common carps the sum of HCHs, sum of PCBs and the sum of PCSs needed a logarithmic transformation.

The T-Test results for wels indicated no significant differences between seasons for length ($t=1.608$ and $p < 0.136$), weight ($t=1.874$ and $p < 0.093$), PeCB ($t=0.849$ and $p < 0.407$), HCB ($t=0.809$ and $p < 0.429$) and sum of PCSs ($t=1.047$ and $p < 0.316$). On the other hand, other groups of compounds like sum of DDTs, sum of HCHs and sum of PCBs had significant differences between seasons ($t=2.887$ and $p < 0.016$, $t=2.664$ and $p < 0.023$ and $t=2.384$ and $p < 0.042$, respectively).

In the case of common carps results were slightly different. The major part of biometric data and concentrations of pollutants were not significantly different and only one group (sum of DDTs) showed significant differences between spring and summer samples. No statistically significant results of the T-Test were: length ($t=0.817$ and $p < 0.420$), weight ($t=0.452$ and $p < 0.654$), PeCB ($t=0.317$ and $p < 0.753$), HCB ($t=0.593$ and $p < 0.558$), sum of HCHs ($t=0.586$ and $p < 0.562$), sum of PCBs ($t=1.572$ and $p < 0.126$), sum of PCSs ($t=1.175$ and $p < 0.249$) while for the sum of DDTs the significant results were ($t=2.355$ and $p < 0.025$).

As a whole, considering differences in some analysed fields, we have considered seven differenced groups (separating samples from the same species but collected in different seasons) for the analysis and comparisons of organochlorine compounds concentrations between species in the Flix water reservoir.

3.2 OCs concentrations

Before starting the analysis of organochlorine compounds differences between species collected in Flix water reservoir it was important to know which variations in biometrical data existed between them. For this purpose, length and weight were plotted in a logarithmic scale to

observe tendencies (Fig. 2). There was a clear difference between the two bigger species (wels and carps) and the other three smaller fishes (roach, rudd and mosquitofish) in length (mean values from 36 mm in mosquitofish to 1130 mm in summer wels) and in a more noticeable way in the weight (mean values of nearly 14000 g in summer wels and only 0.65 g for the mosquitofish). These data will help afterwards to the interpretation of bioaccumulation patterns and concentrations found in all species.

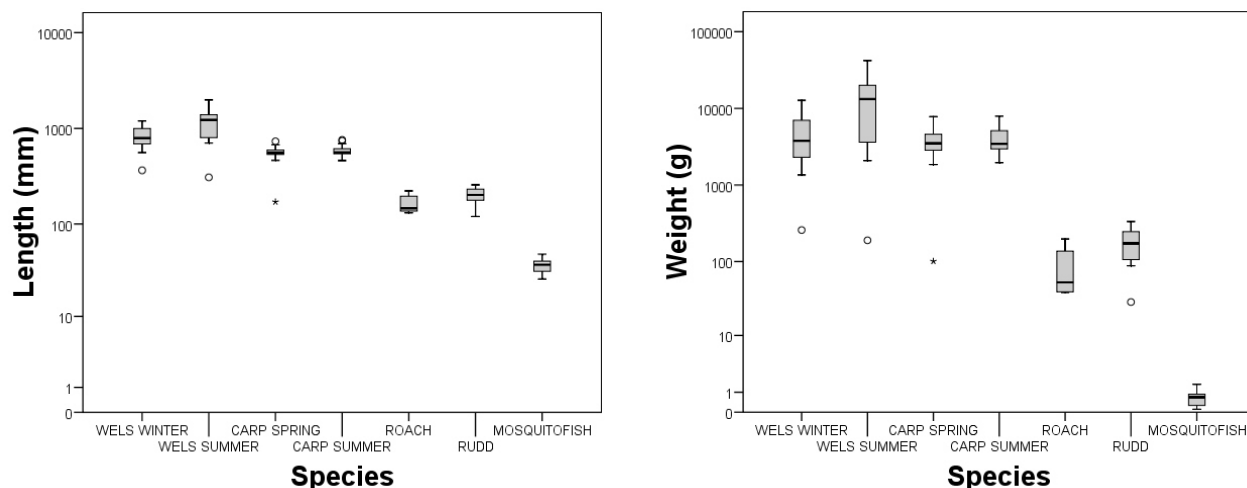


Fig. 2. Box-plot diagrams for Length (mm) and Weight (g) in different fish species samples collected in 2006. Horizontal line shows median values, box is interquartile range; whiskers correspond to non-outlier range. All diagrams are in logarithmic scale.

Some studies reported strong positive relations between length and concentration of organochlorine compounds in freshwater fishes because of its direct relationship with age, and subsequently, with a larger bioaccumulation time (Loganathan et al., 1995; Manchester-Neesvig et al., 2001;). On the other hand, some works suggest that could appear the opposite effect.

Reduction of concentrations in bigger individuals due to the differences in the increase of body lipid content and body burden (Devaux&Monod, 1987). That was called the *dilution effect*.

Anyway, in the present work, no associations (positive or negative) were found for any individual or group of pollutants with the exception of the sum of PCSs that seemed to follow a negative tendency. Pastor et al., 1988 and Covaci et al., 2006, did not point out a relationship between size or weight with the contents of organic contaminants. In our case, for the sum of PCSs, as much smaller was the species (mosquitofish), concentrations increased considerably while the bigger ones (wels) had the lower mean and range concentrations (Fig. 3 (f)).

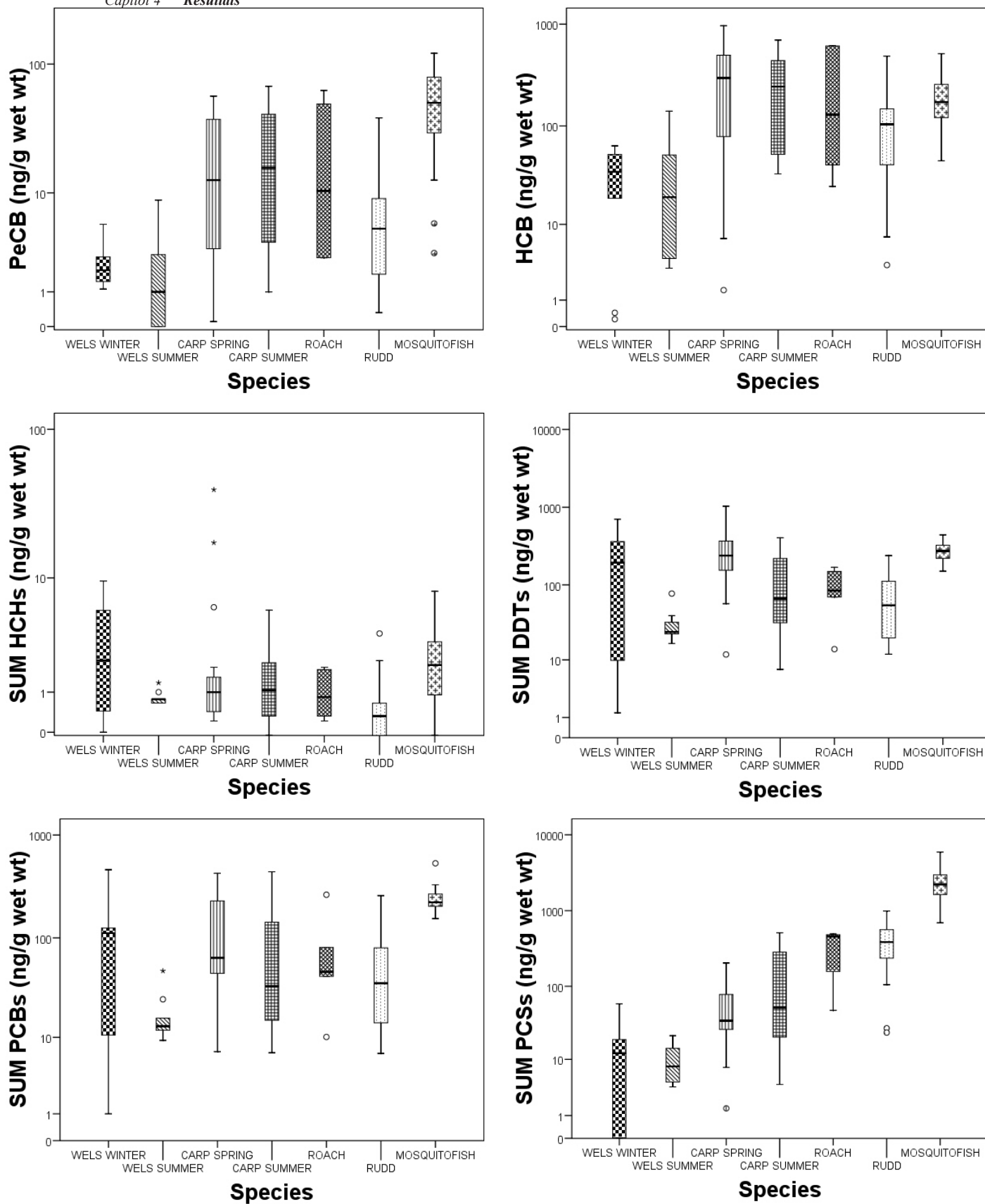


Fig. 3. Box-plot diagrams for concentrations of (a) PeCB, (b) HCB, (c) sum of HCHs, (d) sum of DDTs, (e) sum of PCBs and (f) sum of PCSs in different fish species tissue samples (exception of mosquitofish) collected in 2006. Horizontal line shows median values, box is interquartile range; whiskers correspond to non-outlier range. All diagrams are in logarithmic scale.

In order to find significant differences between species in the bioaccumulation of organochlorine pollutants we have transformed the concentrations into logarithmic values and analysed the normality. For PeCB, sum of HCHs, sum of PCBs and sum of PCSs was enough to use parametric tests (ANOVA and *post-hoc* tests) while for HCB and sum of DDTs normality was not achieved. In those cases non-parametric tests were performed (Kruskal-Wallis with a posterior Bonferroni's analysis). Concentrations were summarised in Fig. 3, where groups of boxplots facilitated the visual comparison between levels of each compound in all sampled species. All the major groups of organochlorine compounds were statistically different at least between two groups.

For PeCB ($F=13.970$ and $p=0.000$) clearest significant differences were between wels and the other species (Fig. 3 (a)). Specifically winter wels samples concentrations were significantly lower than all other species ($p<0.001$, $p=0.000$, $p<0.011$, $p<0.027$ and $p=0.000$) and summer wels samples in relation to carps collected in summer and the mosquitofish ($p<0.018$ and $p=0.000$, respectively). In addition, significant differences were found between rudd samples and mosquitofish samples ($p<0.002$). In the case of HCB the Kruskal-Wallis test was performed ($H=32.995$ and $p=0.000$) obtaining nearly the same results (Fig. 3 (b)). Significantly lower concentrations were found in winter wels samples in comparison with other species except roach ($p<0.002$, $p<0.001$, $p<0.002$, and $p=0.000$) while summer wels samples only in relation to summer carps and mosquitofish ($p<0.002$ and $p=0.000$, respectively). For the sum of HCHs, the ANOVA test found significant differences between median concentrations ($F=2.958$ and $p<0.011$) but the most robust *post-hoc* Scheffé test could not find between which groups demonstrating similar concentrations of these compounds in all species in the Flix water reservoir. In this case, wels concentrations were at the same order of magnitude or even over of the rest of species (Fig. 3 (c)). The sum of DDTs was especially higher in two groups (spring carps and mosquitofish (Fig. 3 (d)) but normality was not achieved so the Kruskal-Wallis test confirmed significant differences between groups ($H=39.298$ and $p=0.000$). Then the *post-hoc* analysis indicated that both mentioned groups had significant higher concentrations in relation to wels and rudd captured in summer ($p=0.000$ in all cases) and, in addition, mosquitofish concentrations were also significant higher than those found in summer carps and roach ($p<0.002$, $p=0.000$, respectively). The ANOVA test for the sum of PCBs indicated differences between the groups analysed ($F=8.726$ and $p=0.000$), mainly between mosquitofish concentrations and wels (both seasons), summer carps and rudd ($p<0.012$, $p=0.000$, $p<0.010$ and $p=0.000$, respectively) but also between spring carps and summer wels ($p<0.029$). Except the values of the whole mosquitofish (not only the tissues), in this case all mean concentrations were not extremely different (Fig. 3 (e)). Finally, the last group of compounds analysed was the sum of PCSs. Mean concentrations increased with the reduction of length and weight of species (Fig. 3 (f)). That means that smaller species had the highest concentrations of these compounds.

The ANOVA test indicated significant differences between groups ($F=36.392$ and $p=0.000$) and they were absolutely obvious. The only group with significantly lower concentrations in relation to nearly all other species (except summer wels) was the called “wels winter” ($p=0.000$ in all cases). On the other hand, mosquitofish samples had significantly higher concentrations than all species except roach ($p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$ and $p<0.010$, respectively). Following the idea mentioned before about higher concentrations in smaller species, rudd had significant higher concentrations than the first three groups (wels of both seasons and spring carps) while roach only with the wels ($p=0.000$, $p=0.000$, $p<0.004$ and $p=0.000$, $p<0.006$, respectively).

The overall impression was that the analysis of the whole individual fish in the species *Gambusia holbrooki* (mosquitofish) conditioned the comparisons because concentrations of nearly all main groups of organochlorine pollutants were higher than in other species. In this case, the inclusion of different tissues and organs increased the results. Anyway, in those species where only muscle tissue was examined we also found significant differences for some compounds, mainly between wels (lower concentrations) and other smaller species with different diet habits (higher concentrations). For the most volatile compounds (PeCB, HCB and sum of PCSs) these differences were clearer than for other groups of pollutants (sum of HCHs, sum of DDTs and sum of PCBs).

3.3 Changes in bioaccumulation patterns

Differences in concentrations of main organochlorine groups analysed were found depending on the species. Fig 4 summarised distribution patterns in all species. PeCB and the sum of HCHs involved low percentages in the sum of total organochlorine pollution while HCB, the sum of DDTs, the sum of PCBs and the sum of PCSs were the most abundant ones but following different distribution models. The sum of DDTs and PCBs were the predominant ones in winter wels representing near the 90% of pollutants. In summer wels and carps (spring and summer) HCB was the most abundant organochlorine compound followed by the sum of DDTs and the sum of PCBs except in summer carps, where the sum of PCSs was higher than these two groups. In the rest of smaller species (roach, rudd and mosquitofish) the main group of organochlorine pollutants were the PCSs involving between nearly the 50% to more than 75% of the total organochlorine compounds pollution. In last three species, HCB, sum of DDTs and sum of PCBs reduced gradually their contribution.

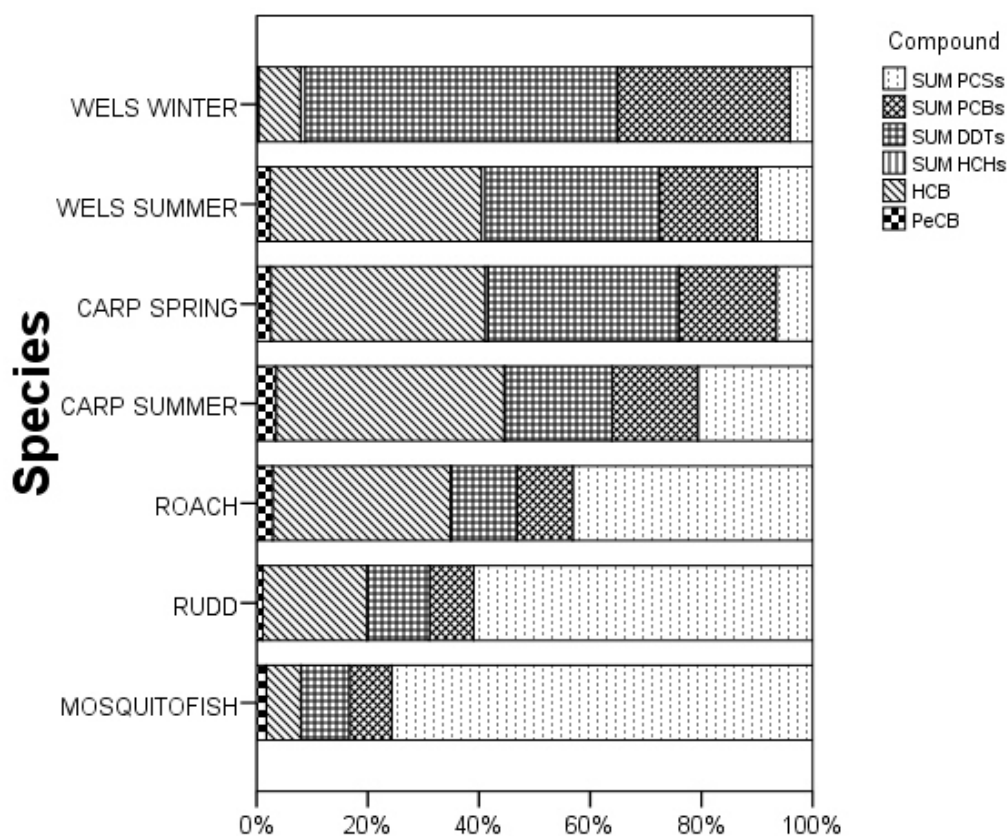


Fig. 4. Percentage distribution bars for concentrations of the main organochlorine compounds groups analyzed (PeCB, HCB, sum of HCHs, sum of DDTs, sum of PCBs and sum of PCSs) in different fish species tissue samples (exception of mosquitofish) collected in 2006.

Compositions of the main groups of organochlorine pollutants with different isomers or congeners (sum of HCHs, sum of DDTs, sum of PCBs and sum of PCSs) were represented in Fig. 5. For the isomers of HCHs (Fig. 5 (a)), the δ - isomer was the most abundant one in wels samples involving more than 50% in mean values indistinctly of season. In carps the α - isomer was found in major concentration (also in Covaci et al., 2006) and in addition with the β - isomer, they became more than the 50% of HCHs in this species. In all the smaller species (roach, rudd and mosquitofish) the most abundant isomer was the β - in conformance with some studies that found this isomer as the predominant in biologic fluids. That is due to its equatorial configuration that facilitates the solubility in lipids (Borga et al., 2001).

In Fig. 5 (b), distribution patterns of DDT metabolites were represented. In mean values, the most abundant metabolite in all species was the main degradation product in aerobic conditions, p,p' -DDE, encompassing between the 35% and nearly the 50% of all metabolites depending on the species. Anyway, p,p' -DDD was found in important percentages in all species and, what is more, the sum of DDDs (o,p' -DDD and p,p' -DDD) was higher, in mean values, than the sum of

DDEs (*o,p'*-DDE and *p,p'*-DDE) in spring carps (also in Covaci et al., 2006), roach and rudd. Goerke et al., 1979, found similar results from Weser Estuary fishes (North Sea). This phenomenon could be explained by two main factors. In first place, diet habits of some species (more benthonic ones) facilitate the bioaccumulation of some degradation products. In second place, underwater mud accumulated for some years could generate anaerobic conditions that help the transformation of DDT into DDD instead of DDE as it would be in aerobic conditions (Metcalf 1973). Briefly, benthivorous fishes focused their diet in the intake of food directly located in the sediment and that could be the reason of higher values of DDDs in their muscle tissues (Covaci et al., 2006). On the other hand, the mosquitofish, as a more pelagic species with different diet habits (invertebrates and water-surface aquatic plants), were not too much influenced by the deep mud and DDEs were found in higher concentrations than DDDs and DDTs. Finally, a remarkable result was the high values of DDT metabolites (*o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT) found mainly in wels, reaching between 15% and 20% of the sum of DDTs. Although we found higher percentages of degradation metabolites in all species, this values suggested a recent input of *p,p'*-DDT or reduced metabolic capacities in the individuals located at top positions of the food web.

Distribution patterns of PCBs were similar to those found in other studies (Chevreuil et al., 1995; Loganathan et al., 1995; Bazzanti et al., 1997; Covaci et al., 2006) with a clear predominance of more chlorinated congeners (PCB-138, PCB-153 and PCB-180) over more volatile compounds (PCB-28 and PCB-52) in almost all species. In wels, carps, rudd and mosquitofish, in mean values, less volatile compounds exceeded the 50% of the total PCBs but in roach, concentrations of volatile compounds PCB-28 and PCB-52 were higher than other congeners and became, in mean percentage, the most abundant congeners in muscle of this species (Fig. 5 (c)). Those observed relative percentages of PCB congeners could be partially supported by the feeding habits of the organisms (Antoniadou et al., 2007). In other studies, not only roach had higher concentrations of more volatile compounds but also carps were more polluted of those PCB congeners (PCB-28, PCB-52 and also PCB-101) (Gerstenberger et al., 1997; Svobodova et al., 2004).

Lastly, distribution patterns of PCSs revealed a similar outline for wels, carps, roach and rudd. The most abundant congener was the octaclorostyrene with more than 50% of mean concentrations in all species. Hexacloro- congeners were the second group in importance with percentages over the 25%. It was remarkable the presence of pentacloro- congeners only in winter wels. Differences with summer samples (of wels and other species) could be explained by cold temperatures, that avoid the facilities of the process of evaporation of more volatile organochlorine compounds. Finally, a clear predominance of hexa- and octa- congeners was plausible also in mosquitofish samples but with a huge percentage of hexa- congeners over the

rest (around 95%). This result led us to think that there were differences between the study of muscle samples (first four fish species) and the whole individual (mosquitofish). As far as we have not found significant differences within species in patterns of other group of organochlorine compounds (HCHs, DDTs and PCBs), we suggest that mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) bioaccumulate the PCSs in a different way, probably because of diet habits, in relation to other fishes or that some PCSs congeners are bioaccumulated differently in other parts of fish (skin or internal organs) in relation to muscle tissue.

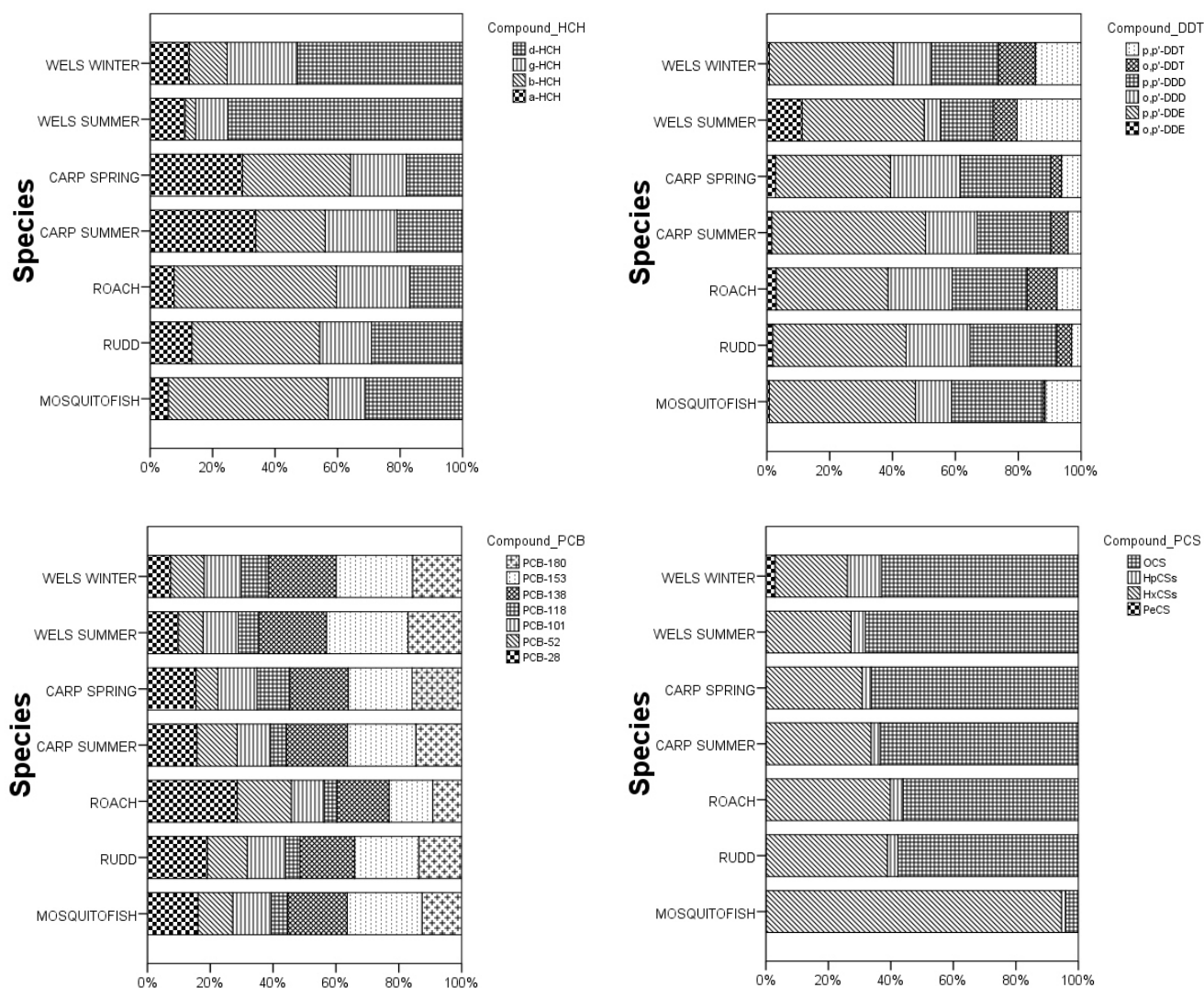


Fig. 5. Percentage distribution bars for concentrations of isomers and congeners of the main organochlorine compounds groups analyzed (sum of HCHs (a), sum of DDTs (b), sum of PCBs (c) and sum of PCSs (d)) in different fish species tissue samples (exception of mosquitofish) collected in 2006.

4. Conclusions

This study provides valuable information about the influence of chloro-alkali plants spills in freshwater food webs (in this case, different species of fish). Concentrations of some groups of organochlorine compounds were extremely high in all species indicating direct contact with polluted mud laid in the riverbed during years. Polychlorobiphenyls (PCBs), hexachlorobenzene (HCB) and polychlorostyrenes (PCSs) are known to be related to chloro-alkali plants and their concentrations were elevated for all analyzed species. In addition, significant differences were found between seasons for same species indicating seasonal variability.

Taking into account only summer muscle samples (same type of sample and season), concentrations of chlorobenzenes (PeCB and HCB), hexachlorociclohexanes (HCHs), polychlorobiphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolites had the same species-sequence, with higher concentrations in carps (*Cyprinus carpio*) followed by roach (*Rutilus rutilus*), rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) and wels (*Silurus glanis*). On the other hand, for the sum of polychlorostyrenes (PCSs) the concentration sequence went from smaller species to bigger ones (rudd > roach > carp > wels). Factors as diet and life habits of those species conditioned levels found in their tissues and furthermore could explain some patterns of PCB congeners or DDT metabolites. In this way, in some species, higher concentrations of volatile PCB congeners were due to different biomagnification degree, which depends also upon the organism's physiology with respect to xenobiotic elimination and the congener's physicochemical properties (Antoniadou et al., 2007). In addition, in Flix water reservoir, polluted sediments have been laid underwater since years so although we found individually higher concentrations of *p,p'*-DDE metabolite, the sum of DDDs was nearly always higher than the sum of DDEs because of an anaerobic degradation of the DDT stored in riverbed sediments.

Significant differences found in mean concentrations of organochlorine compounds between species (mainly between wels and the rest) were more obvious in volatile compounds such PeCB, HCB or sum of PCSs than in sum of DDTs or PCBs. Mosquitofish patterns of PCBs and DDTs were very similar to other species, confirming the availability of comparisons between species (considering that the analysis of whole body contains at least two times more concentration than only muscle tissue). Furthermore, as a singularity, mean concentrations of PCSs increased inversely proportional to mean length and weight, so there was a change in the pattern of bioaccumulation of organochlorine compounds for each species. Percentages of PCSs exceeded the 40% of total organic pollutants reviewed in roach, rudd and specially mosquitofish, and the analysis of whole individuals (mosquitofish) revealed different patterns of distribution for PCSs congeners in comparison with muscle tissue samples. The study of

concentrations of organochlorine compounds in different freshwater fish species proved that there were differences not only because of trophic position but also because of day-life habits. Those conditioned the intake of pollutants and also confirmed the influence of the chloro-alkali plant located in Flix water reservoir in fishes inhabiting on it.

Acknowledgements

The authors would thank the help of the staff from Natural Reserve of Sebes for their assessment during sampling in Flix water reservoir. Help assistance in fish collection and field data recording were performed by Luis Carrasco, Carme Bosch, Romero Roig and David Soto. Mireia Bartrons assisted in some laboratory tasks. Fishes were collected under licence of the Departament de Medi Ambient (Catalan Government) and Natural Reserve of Sebes. D. Huertas would like to thank the financial support received from *Ministerio de Educación y Ciencia* (FPU, AP2007-01824).

Literature cited

- (1) Risebrough, R., de Lappe, B., Walker II, W., Simoneit, B.R.T., Grimalt, J.O., Albaigés, J., García, J., Ballester, A. and Mariño, M. Application of the Mussel Watch Concept in studies of the distribution of hydrocarbons in the coastal zone of the Ebro Delta. *Marine Pollution Bulletin* **1983**; 14, 181-187.
- (2) Grimalt, J.O., Gómez-Belinchón, J.I., Llop, R. and Albaigés, J. Water-phase distribution of hexachlorobenzene in a deltaic environment (Ebro Delta, Western Mediterranean). *Chemosphere* **1988**; 17, 1893-1903.
- (3) Amaral, O.C., Otero, R., Grimalt, J.O. and Albaigés, J. Volatile and semi-volatile organochlorine compounds in tap and riverine waters in the area of influence of a chlorinated organic solvent factory. *Water Research* **1996**; 30, 1876-1884.
- (4) Catalan, J., Ventura, M., Vives, I., Grimalt, J.O. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environmental Science and Technology* **2004**; 38, 4269-4275.
- (5) Clark, K.E., Gobas, F.A., Mackay, D. Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environmental Science and Technology* **1990**; 24, 1203–1213.
- (6) Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W., Haffner, G.D. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environmental Science and Technology* **1999**; 33:133–141.

- (7) Mackay, D. Correlation of bioconcentration factors. *Environmental Science and Technology* **1982**; 16: 274-278.
- (8) Barron, M.C. Bioconcentration. *Environmental Science and Technology* **1990**; 24 (11): 1612-1618.
- (9) Klyszejko, B., Ciereszko, W. Absorption of polychlorinated biphenyls (PCBs) through gills and skin of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Acta Ichthyologica et Piscatoria* **1999**; 29: 99-108.
- (10) Vives, I., Grimalt, J.O., Catalan, J., Rosseland, B., Battarbee, R.W. Influence of altitude and age in the accumulation of organochlorine compounds in fish from high mountain lakes. *Environmental Science and Technology* **2004**; 38: 690-698.
- (11) Fisk, A.T., Hobson, K.A., Norstrom, R.J. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environmental Science and Technology* **2001**; 35: 732-738.
- (12) Boon, J.P., Lewis, W.E., Tjoen-A-Choy, M.R., Allchin, C.R., Law, R.J., de Boer, J., Ten-Hallers Tjabbes, C.C., Zegers, B.N. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. *Environmental Science and Technology* **2002**; 36: 4025-4032.
- (13) Carol, J., Benejam, L., Benito, J., García-Berthou, E. Growth and diet of European catfish (*Silurus glanis*) in early and late invasion stages. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie* **2009**; 174: 317-328.
- (14) Elvira, B., Almodovar, A. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of 21st century. *Journal of Fish Biology* **2001**; 59 (Suplement A): 323-331.
- (15) Carol, J., Zamora, L., García-Berthou, E. Preliminary telemetry data on the movement patterns and habitat use of European catfish (*Silurus glanis*) in a reservoir of the River Ebro, Spain. *Ecology of Freshwater Fish* **2007**; 16: 450-456.
- (16) Cabistañ, J. Iniciación a la pesca del siluro. **2003**. Ed. Tikal.
- (17) Bazzanti, M., Chiavarini, S., Cremisini, C., Soldati, P. Distribution of PCB congeners in aquatic ecosystems: a case study. *Environmental International* **1997**; 23: 799-813.
- (18) Chevreuil, M., Carru, A.M., Chesterikoff, A., Boët, P., Tales, E., Allardi, J. Contamination of fish from different areas of the river Seine (France) by organic (PCB and pesticides) and metallic (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) micropollutants. *Science of the Total Environment* **1995a**; 162: 31-42.
- (19) Chevreuil, M., Granier, L., Carru, A.M. Relationship between biological parameters and bioaccumulation of some organochlorines (pesticides, PCB) by fishes in the river Seine (France). *Water, Air, & Soil Pollution* **1995**; 81: 107-120.

- (20) Blanchard, M., Teil, M.J., Carru, A.M., Chesterikoff, A., Chevreuil, M. Organochlorine distribution and mono-orthosubstituted PCB pattern in the roach (*Rutilus rutilus*) from the river Seine. *Water Research* **1997**; 6: 1455-1461.
- (21) Carol, J., Benejam, L., Alcaraz, C., Vila-Gispert, A., Zamora, L., Navarro, E., Armengol, J., García-Berthou, E. The effects of limnological features on fish assemblages of 14 spanish reservoirs. *Ecology of Freshwater Fish* **2006**; 15: 66-77.
- (22) Erdogrul, O., Covaci, A., Schepens, P. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaras, Turkey. *Environment Internacional* **2005**; 31(5): 703.
- (23) Lacorte, S., Raldúa, D., Martinez, E., Navarro, A., Diez, S., Bayona, J.M., Barceló, D. Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). *Environmental Pollution* **2006**; 140: 471-482.
- (24) Antoniadou, V., Konstantinou, I.K., Goutner, V., Sakellarides, T.M., Albanis, T.A., Bintoudi, E. PCB levels and accumulation patterns in waterbird eggs and in their prey at lake Kerkini, a North-Eastern Mediterranean wetland of international importance. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2007**; 53: 249-260.
- (25) De la Cal, A., Eljarrat, E., Raldúa, D., Durán, C., Barceló, D. Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain). *Chemosphere* **2008**; 70: 1182-1189.
- (26) Hinck, J.E., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Echols, K.R., Gale, R.W., Wieser, C., May, T.W., Ellersieck, M., Coyle, J.J., Tillitt, D.E. Chemical contaminants, health indicators and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. *Science of the total environment* **2008**; 390: 538-557.
- (27) Bachour, G., Failing, K., Georgii, S., Elmadfa, I., Brunn, H. Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer and humans. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1998**; 35, 666-673.
- (28) Covaci, A., Gheorghe, A., Hulea, O., Schepens, P. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. *Environmental Pollution* **2006**; 140(1): 136.
- (29) Cheng, D.X., Yang, Z.Z., Wang, X.T., Sun, Y.Z., Xu, X.B. Organochlorine pesticides in tissues of Catfish (*Silurus asotus*) from Guanting reservoir, People's Republic of China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2006**; 76: 766-773.
- (30) Galassi, S., Guzzella, L., Battegazzore, M., Carrieri, A. Biomagnification of PCBs, p,p'-DDE and HCB in the River Po ecosystem (Northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1994**; 29: 174-186.

- (31) Grimalt, J.O., Sánchez-Cabeza, J.A., Palanques, A., Catalan, J. Estudi de la dinàmica dels compostos organoclorats persistents i altres contaminants en els sistemes aquàtics continentals (in Catalan). **2003**.
- (32) Marsalek, P., Weiss, V., Kolečka, J. Chlorinated hydrocarbon residues in fish from Nové Mlýny reservoirs along Dyje River, Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* **2004**; 73: 275-281.
- (33) Sapozhnikova, Y., Zubcov, N., Hungerford, S., Roy, L.A., Boicenco, N., Zubcov, E., Schlenk, D. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. *Chemosphere* **2005**; 60: 196-205.
- (34) Svobodova, Z., Zlabek, V., Randak, T., Machova, Z., Kolarova, J., Hajslova, J., Suchan, P., Dusek, L., Jarkovsky, J. Profiles of PCBs in tissues of marketable Common Carp and bottom sediments from selected ponds in South and West Bohemia. *Acta Veterinaria Brno* **2004**; 73: 133-142.
- (35) Loganathan, B.G., Kannan, K., Watanabe, I., Kawano, M., Irvine, K., Kumar, S., Sikka, H.C. Isomer-specific determination and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls, polychlorinated/brominated dibenzodioxins and dibenzofurans, polybrominated biphenyl ethers, and extractable organic halogen in carp from the Buffalo River, New York. *Environmental Science and Technology* **1995**; 29, 1832-1838.
- (36) Gerstenberger, S.L., Gallinat, M.P., Dellinger, J.A. Polychlorinated biphenyl congeners and selected organochlorines in Lake Superior fish, USA. *Environmental Contamination and Toxicology* **1997**; 16: 2222-2228.
- (37) Watanabe, M., Tanabe, S., Tatsukawa, R., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., Khuraskin, S.L. Contamination levels and specific accumulation of persistent organochlorines in Caspian Seal (*Phoca caspiaca*) from the Caspian Sea, Russia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**; 37: 396-407.
- (38) Pyysalo, H., Wickström, K., Litmanen, R. A baseline study on the concentrations of chlordane-, PCB- and DDT- compounds in Finnish fish samples in the year 1982. *Chemosphere* **1983**; 12: 837-842.
- (39) Hattula, M.L., Janatuinen, J., Särkkä, J., Paasivirta, J. A five-year monitoring study of the chlorinated hydrocarbons in the fish of a Finnish lake ecosystem. *Environmental Pollution* **1978**; 15: 121-139.
- (40) Yamaguchi, N., Gazzard, D., Scholey, G., Macdonald, D.W. Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predators. *Chemosphere* **2003**; 50: 265-273.

- (41) Niimi, A.J., Oliver, B.G. Distribution of polychlorinated biphenyl congeners and other halocarbons in whole fish and muscle among Lake Ontario salmonids. *Environmental Science and Technology* **1989**; 23: 81-88.
- (42) Manchester-Neesvig, J.B., Valters, K., Sonzogni, W.C. Comparison of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in lake Michigan salmonids. *Environmental Science and Technology* **2001**; 35, 1072-1077.
- (43) Devaux, A., Monod, G. PCB and p,p'-DDE in Lake Geneva brown trout (*Salmo trutta L.*), and their use as bioenergetic indicators. *Environmental Monitoring and Assessment* **1987**; 9: 105-114.
- (44) Pastor, A., Hernández, F., Medina, J., Melero, R., López, F.J., Conesa, M. Organochlorine pesticides in marine organisms from the Castellón and Valencia coasts of Spain. *Marine Pollution Bulletin* **1988**; 19: 235-238.
- (45) Borga, K., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U. Biomagnification of organochlorines along a Barents sea food chain. *Environmental Pollution* **2001**; 113, 187-198.
- (46) Goerke, H., Eder, G., Weber, K., Ernst, W. Patterns of organochlorine residues in animals of different trophic levels from the Weser Estuary. *Marine Pollution Bulletin* **1979**; 10, 127-133.
- (47) Metcalf, R.L. A century of DDT. *Journal of agricultural and food chemistry* **1973**; 21, 511-519.

4.2.3 Supplementary information

Table 1. Concentrations (mean and range, ng/g wet weight) of organochlorine compounds in other fish species than European catfish analyzed in the Ebro River transect downstream the Flix reservoir. nd: not detected. ^a: >50% of samples not detected. ^b: 100% of samples not detected.

Compounds	Meander (2007)	Xerta (2006)		Deltebre (2006)	
	Carp (n = 12)	Carp (n = 10)	Roach (n = 5)	Carp (n = 10)	Roach (n = 5)
Lipids (%)	3.3 (0.4-10.4)	0.6 (0.2-1.4)	1.8 (0.9-2.7)	1.9 (0.3-6.8)	1.7 (0.7-2.5)
PeCB	1.3 (nq-3.1)	0.1 (nd-0.4)	0.5 (0.3-0.7)	0.3 (nd-0.9)	0.5 (0.2-0.7)
HCB	29.8 (1.9-54.9)	6.5 (2.5-12.1)	7.3 (1.2-13.8)	5.0 (1.6-11.7)	7.8 (3.8-12.2)
α-HCH	0.3 (nd-0.3) ^a	0.2 (nd-0.2) ^a	nd ^b	0.3 (nd-0.3) ^a	nd ^b
β-HCH	0.3 (nd-0.3) ^a	nd ^b	0.4 (0.2-0.7)	nd ^b	0.4 (0.2-0.8)
γ-HCH	0.4 (nd-0.5) ^a	0.3 (nd-0.3) ^a	0.5 (nd-0.5) ^a	0.4 (nd-0.6)	nd ^b
δ-HCH	0.5 (nd-0.5) ^a	0.6 (nd-0.6) ^a	0.4 (nd-0.4) ^a	0.8 (nd-0.8) ^a	nd ^b
o,p'-DDE	3.8 (0.2-24.4)	1.4 (nd-3.9)	1.7 (0.7-3.5)	0.6 (0.4-0.9)	0.9 (0.3-1.9)
p,p'-DDE	148.6 (4.3-953.0)	78.4 (12.4-148.4)	26.4 (18.5-39.3)	39.1 (20.2-62.8)	30.6 (9.8-60.1)
o,p'-DDD	32.0 (1.1-181.4)	6.6 (1.8-17.2)	6.4 (3.6-7.6)	5.6 (1.9-9.2)	4.5 (1.8-9.2)
p,p'-DDD	21.0 (0.7-84.2)	9.0 (2.6-17.7)	7.1 (3.6-9.6)	14.8 (4.8-37.8)	6.5 (2.2-11.8)
o,p'-DDT	29.8 (nq-169.6)	5.7 (1.2-16.6)	1.6 (0.8-2.1)	2.2 (nd-10.1)	1.1 (0.3-2.6)
p,p'-DDT	8.9 (0.9-27.5)	4.1 (0.5-9.0)	2.3 (2.0-2.8)	3.3 (1.3-9.4)	1.4 (0.6-2.8)
PCB-28	7.1 (0.7-17.9)	1.9 (0.6-3.9)	3.0 (1.7-3.7)	1.5 (0.7-3.8)	2.0 (0.9-4.8)
PCB-52	10.8 (nq-30.6)	2.1 (0.6-5.0)	3.7 (2.2-4.6)	1.8 (0.7-3.8)	2.2 (1.0-4.4)
PCB-101	20.4 (1.3-58.9)	7.8 (1.5-21.2)	4.2 (2.9-5.2)	4.0 (1.7-7.8)	3.3 (1.2-7.4)
PCB-118	9.9 (0.5-34.4)	4.6 (0.8-12.8)	1.7 (1.2-2.2)	2.8 (0.9-5.9)	1.3 (0.5-3.0)
PCB-138	59.6 (2.9-172.6)	24.1 (3.7-67.7)	9.5 (7.5-13.2)	11.6 (3.1-20.4)	7.3 (2.3-15.5)
PCB-153	68.4 (2.9-207.9)	32.0 (4.2-90.6)	10.3 (7.6-15.1)	14.8 (3.4-28.2)	7.5 (2.5-14.7)
PCB-180	65.8 (2.1-220.8)	22.3 (2.6-67.1)	6.9 (5.4-8.4)	9.7 (1.7-17.0)	4.6 (1.6-9.3)
ΣHCHs	0.5 (nd-0.8)	0.1 (nd-0.6)	0.7 (0.2-1.5)	0.2 (nd-0.9)	0.4 (0.2-0.8)
ΣDDTs	241.5 (8.0-1440.1)	105.0 (19.2-190.1)	45.4 (29.4-62.6)	65.3 (32.3-114.9)	45.1 (15.6-88.5)
ΣPCBs	241.2 (10.4-743.1)	94.9 (14.3-267.8)	39.1 (32.3-51.9)	46.2 (13.2-86.8)	28.1 (10.6-59.0)

4.3 Concentracions de COPs en ous d'ocells del riu Ebre

Resum

L'estudi de les concentracions de COPs a les parts més altes de les xarxes tròfiques fluvials és fonamental. S'han emprat els ous d'ocell de varies espècies que nien en tres localitats del tram final del riu Ebre per establir quins nivells de contaminació tenen a l'Aiguabarreig, l'embassament de Flix i el Delta de l'Ebre. L'ús dels ous d'ocell permet treballar amb un tipus de mostres poc invasives per l'espècie i aporta informació molt valuosa dels nivells de COPs que es troben en aquests organismes durant la seva època de reproducció. A l'embassament de Flix s'han trobat les concentracions mitjanes més altes per la majoria de compostos amb origen predominantment industrial (HCB, PCBs i PCEs). D'altra banda, al Delta hi ha més abundància d'insecticides com els HCHs o els DDTs. També s'han comparat les concentracions de COPs en ous d'una mateixa espècie en dos anys consecutius a l'embassament de Flix, tot trobant que pels compostos més volàtils les concentracions s'incrementen, mentre que pels compostos més pesants hi havia una lleugera disminució. En algunes mostres de Flix s'han trobat concentracions de *p,p'*-DDE que superen els llindars establerts per produir efectes negatius a la supervivència dels pollets.

Abstract

Determination of POPs concentrations in the higher trophic level organisms from fluvial food webs is crucial. Bird eggs from different species nesting at three locations from the last stretch of Ebro River have been employed to establish which levels of pollution exist at Aiguabarreig, Flix water reservoir and the Delta. The use of bird eggs allow to work with low-invasive samples for the specie and adds valuable information about POPs levels in that key organisms during their breeding season. At the Flix water reservoir the mean highest concentrations have been found for those pollutants with an origin predominantly industrial (HCB, PCBs and PCSs). On the other hand, at the Delta there is more abundance of insecticides like HCHs and DDTs. POPs concentrations in bird eggs have been compared for the same specie in consecutive years within the Flix water reservoir, finding that more volatile compounds increase their concentrations while heaviest pollutants had a slightly reduction. At some bird eggs samples from Flix concentrations of *p,p'*-DDE surpassed established thresholds to produce negative toxic effects for the chick survival.

4.3.1 Article 4

Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River)

David Huertas¹, Joan Grimalt¹, Lluís Jover³,
Carola Sanpera² & Xavier Ruiz²

¹*Department of Environmental Chemistry, IDÆA-CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain*

²*Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona,
Av. Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain*

³*Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Barcelona,
Casanova 143, 08036-Barcelona, Spain*

Article accepted at: Science of the Total Environment



ARTICLE IN PRESS

STOTEN-18065; No of Pages 10

Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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

Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River)

David Huertas^a, Joan O. Grimalt^{a,*}, Lluís Jover^c, Carola Sanpera^b, Xavier Ruiz^{b,1}^a Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Catalonia, Spain^b Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain^c Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Catalonia, Spain

HIGHLIGHTS

- Organochlorine compounds (OCs) were analysed in *Ardeidae* from the Ebro River.
- There is a clear influence of the chlor-alkali plant OC emissions in breeding birds.
- High levels of PCBs accumulate in eggs from birds nesting nearby the factory.
- High levels of DDTs accumulate in eggs from birds nesting nearby the factory.
- Some of the observed *p,p'*-DDE egg concentrations may impair reproduction.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May 2015
 Received in revised form 6 July 2015
 Accepted 6 July 2015
 Available online xxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Aquatic birds
 Organochlorine compounds
Ardea purpurea
 Purple Heron
 DDT
 Polychlorobiphenyls
 Polychlorostyrenes
 Hexachlorobenzene

ABSTRACT

Eggs of Purple Heron (*Ardea purpurea*) were collected from three sampled sites inside the Ebro River basin in years 2006 and 2007. These sites were located besides (Flix), upstream (Aiguabarreig) and downstream (Delta) a chlor-alkali plant. Organochlorine compounds (OCs) such as dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs), polychlorobiphenyls (PCBs), polychlorostyrenes (PCSs), hexachlorobenzene (HCB), pentachlorobenzene (PeCB) and hexachlorocyclohexanes (HCHs) were analysed to assess what are the accumulation patterns of these compounds in aquatic migratory birds breeding in the area of influence of the emissions from this industrial installation. Comparison of the egg concentrations between the three sites show higher concentrations of compounds manufactured in the past in the factory (PCBs, *p,p'*-DDT) or by-products of OC synthesis (HCB, PeCB and PCSs) in Flix than in Aiguabarreig reflecting a clear influence from the emissions of the chlor-alkali plant. The eggs collected in the Ebro Delta showed higher concentrations of total DDTs (mainly *p,p'*-DDE) than in the reference site (Aiguabarreig) which could reflect past applications of this insecticide in the area for agriculture. In contrast, HCHs were found in higher concentrations in the Delta and Aiguabarreig than in the Flix Reservoir. These compounds have been used as insecticides in agriculture and were not manufactured in the chlor-alkali plant.

The present results show that despite Purple Herons are migratory birds, the food web transfer of OCs during the breeding season is sufficient for the accumulation of these compounds in the eggs, leading to statistically significant concentration differences between sites. These differences are consistent with the emissions of

* Corresponding author.

E-mail address: joan.grimalt@idaea.csic.es (J.O. Grimalt).¹ In memoriam.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>
 0048-9697/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

these pollutants from industrial or agricultural sources to the aquatic environments. Some of the *p,p'*-DDE concentrations observed in the area nearby the chlor-alkali plant are above the threshold effects for reproductive impairment.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Birds like herons (family *Ardeidae*) inhabit aquatic environments. They generally feed on fish and are located in the top of the food web where exposure to persistent organochlorine compounds (OCs) is highest (De Luca-Abbott et al., 2001; Sakellarides et al., 2006).

In ardeids direct mortality by OC exposure is rare but reproductive failure due to eggshell thickness, high embryo mortality or malformations in chicks have been described (Aurigi et al., 2000; De Luca-Abbott et al., 2001). *p,p'*-DDE has a lot of influence on bird reproduction, causing reduction of the eggshell thickness and sometimes death of chicks, e.g. thinning above 19% has been associated with population declines (Hickey and Anderson, 1968) and linear relationships between the pair breaking the egg during the incubation process and *p,p'*-DDE concentrations ranging 2–8 µg/g have been reported (Cooke et al., 1976). However, the critical concentration ranges of *p,p'*-DDE in eggs for eggshell thinning are species dependent. In birds of prey, a threshold of 2 µg/g was associated with these effects (Pain et al., 1999). In Great Blue Heron 2–3 µg/g were associated with 20% thinning (Thomas and Anthony, 1999). In Black-crowned Night-Heron different values were found for distinct areas: in Rocky Mountains (Colorado) 3.5 µg/g and 20% thinning (McEwen et al., 1984) while in California 15 µg/g and 18% thinning (Ohlendorf and Marois, 1990). In both last cases, egg shell thinning was associated to deleterious effects on reproduction, mainly in the proportion of non-viable eggs and chick mortality.

The assessment of deleterious effects in birds related to other OCs remains imprecise. Concerning reproductive success, low observable effect concentration (LOEC) for total polychlorobiphenyls (PCBs) in cormorants has been reported to be 3.5 µg/g (Tillitt et al., 1992) and values of 30 µg/g have been correlated with embryo mortality (Sakellarides et al., 2006). PCBs have also been described to increase the effect of *p,p'*-DDE (Provini and Galassi, 1999).

Non-invasive monitoring substrates such as feathers and eggs are used widely for assessment of OC concentrations in birds (De Luca-Abbott et al., 2001). The use of eggs involves simple sampling logistics and less stress and disturbance for individual birds than other materials. Bird eggs accumulate OC efficiently. Pollutants are conveyed directly from the mother to the eggs via lipid metabolism (Aurigi et al., 2000), e.g. they are accumulated preferentially during the breeding season. In periods of food shortage only one or two eggs per clutch are laid and these eggs are composed of a high amount of endogenous fat. In periods of food availability eggs are primarily composed of lipids generated by food consumption from the environment (De Luca-Abbott et al., 2001). Accordingly, the use of eggs for assessment of OC exposure has two advantages. First, the time of exposure is known (only the breeding period) and similar for all samples. Second, since all the parents feed of prey caught in the surroundings of the colony, the observed concentrations are related to the OC levels in the ecosystems inhabited by the birds (Focardi et al., 1988; De Cruz et al., 1997; Sakellarides et al., 2006; Malik et al., 2011). Concerning clutch variability of OC measurements, studies of *p,p'*-DDE and PCBs in black-crowned Night-Heron showed much lower within-clutch standard deviations (12–17%) than among inter-clutch variability (83–88%; Custer et al., 1990).

The Ebro watershed covers an area of 85,362 km². The Flix reservoir is located 90 km upstream the mouth. In this location a chlor-alkali plant dumped about 500,000 tones of muds to the riverbed during the last century. In 1949 this factory was transformed into a chlor-alkali plant for the production of chlorine, sodium hydroxide and organochlorine compounds (Muñoz, 1994). In 1973, a bicalcic

phosphate plant was incorporated to manufacture this feed additive using by-product HCl and phosphorite. This activity was increased in 1992. About 35,000 t of DDT were produced between 1945 and 1971 (Muñoz, 1994). This factory was the largest Spanish manufacturer of this insecticide. This chlor-alkali plant was also the only PCB manufacturer in Spain and produced 29,000 t of these compounds between 1959 and 1987 (Breivik et al., 2002). Besides these compounds, large amounts of pentachlorobenzene (PeCB), hexachlorobenzene (HCB) have been released to the environments surrounding the factory because this compound is a by-product of the synthesis of organochlorine solvents (Amaral et al., 1996; Grimalt et al., 1988, 1994; Gari et al., 2014). Polychlorostyrenes (PCs) are also by-products of the manufacture of chlorine with graphite anodes and these compounds have also been found in significant concentrations in the aquatic environments located nearby this reservoir (Carrizo and Grimalt, 2009). The Flix reservoir is therefore a model focal point for the study of the patterns of accumulation of OCs into organisms living in environments under the influence of OC emissions, including bird species.

The present study is aimed to assess what are the OC accumulation patterns in populations of Purple Heron (*Ardea purpurea*) living nearby a focal point of these compounds during the breeding season. For this purpose, we have considered the study of eggs of this species near Flix reservoir in the Ebro River and compared the observed OC distributions in eggs from *Ardeidae* breeding in the Ebro Delta (downriver) and in the Aiguabarreig (upstream).

Purple Heron regularly breed in these three environments. These aquatic birds provide an interesting case for comparison of the accumulation patterns of all these OCs as consequence of focal point releases into aquatic environments. In terms of fauna, this manuscript contributes to the knowledge on OC pollution in European *Ardeidae* which is rather limited (Focardi et al., 1988; De Cruz et al., 1997; Sakellarides et al., 2006) in comparison to the North-American birds of this species (Baker and Sepúlveda, 2009; Thomas and Anthony, 1999; Custer et al., 1997; Elliot et al., 1989; McEwen et al., 1984; Ohlendorf and Marois, 1990).

2. Material and methods

2.1. Study area

Three locations in the Ebro River Basin (Fig. 1) were sampled in two consecutive years, 2006 and 2007. The Aiguabarreig (41°23'59"N, 0°19'38"E) is a freshwater swamp located in the confluence of Segre and Cinca Rivers, two tributaries of the Ebro River, about 35 km upstream the Flix reservoir. This environment is a priori not affected by the factory activities and the toxic mud discharged into the reservoir. Thus, it has been used as reference site.

Within the Ebro River basin, Flix (41°14'14"N, 0°30'44"E) is a small reservoir (320 ha) contained by a fusegate spillway dam. It essentially works as a weir, retaining the river flow and deviating the water through an underground channel that bypasses the meander and propels a hydraulic power plant (Palanques et al., 2014). In this location a chlor-alkali plant has been spilling heavy polluted loads during last century.

The Ebro Delta is located downriver (40°41'20"N, 0°44'25"E), contains many rice fields and constitutes the second Natural Park in Europe for high biodiversity of vertebrates. Pollutants spilled at Flix reservoir are carried downstream by the Ebro River waters and arrive

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

3

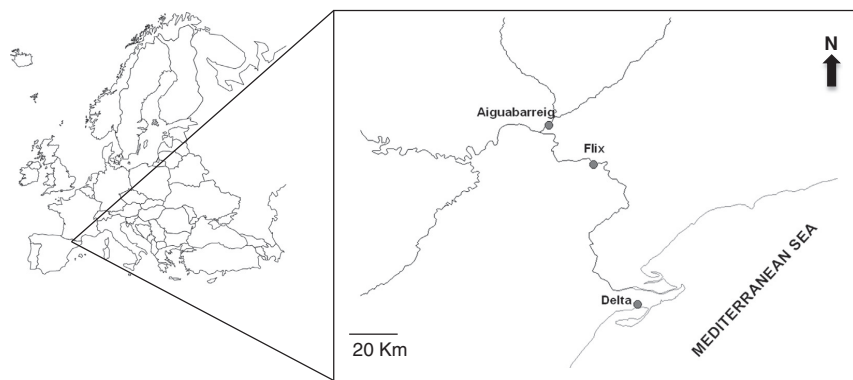


Fig. 1. Map of the Ebro River showing the three sampled sites.

to this environment (Grimalt et al., 1988; Pastor et al., 2004; Risebrough et al., 1983).

2.2. Sample collection

Ardea purpurea is the only fish-predator bird breeding at the Flix water reservoir and present at the other two sampled sites. Conservation status of this species is Least Concern (LC) following the classification from the IUCN Red List. In each colony eggs were collected from different nests. After the localization of the nest, regular controls were established until the egg laying was done. The approach to the nest and collection of eggs was done considering the minimum disturbance to the adults. Mean laying size during 2006 was 4 ± 1 eggs and for each laying the smallest egg was selected. On the other hand, at 2007 this information was not collected.

A total of fifty-five eggs from Purple Heron colonies were sampled. In 2006, eleven eggs were collected from the Flix reservoir and fourteen samples from two colonies located in the Ebro Delta: 3 from Clot colony (South Delta) and 11 from Canal Vell (North Delta). No eggs were sampled in Aiguabarreig in this year. In 2007, ten eggs were sampled in each location (Aiguabarreig, Flix reservoir and Ebro Delta). During each sampling, other biometrical data from the eggs was recorded (length, width and weight of the egg, developmental stage, etc.).

After sampling the shell was broken and the internal content was poured and handled in glass vials to avoid any contact with external surfaces. These vials were tapped with previously cleaned aluminium foil and stored frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.3. Materials

Residue analysis solvents, n-hexane (Ref. 1.04371), dichloromethane (Ref. 1.06054), isoctane (Ref. 1.15440), acetone (Ref. 1.00012), concentrated sulphuric acid 95–97% (Ref. 1.00731) and anhydrous sodium sulphate (analytical-reagent grade) (Ref. 1.06649) were from Merck (Darmstadt, Germany). Sulphate was activated overnight by heating at $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cellulose extraction cartridges (20 mm I.D. and 80 mm long) were from Whatman Ltd (UK). HCB, hexachlorocyclohexane (HCH) mixture (α -, β -, γ - and δ -), DDT mixture (*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD and *p,p'*-DDD), PCS mixture (2,3,4,5,6-pentachlorostyrene -PeCS-, α -2,3,4,5,6-hexachlorostyrene - α -HxCS-, (Z)- β -2,3,4,5,6-hexachlorostyrene -Z- β -HxCS-, (E)- β -2,3,4,5,6-hexachlorostyrene -E- β -HxCS-, (Z)- α , β -2,3,4,5,6-heptachlorostyrene -Z- α , β -HpCS-, (E)- α , β -2,3,4,5,6-heptachlorostyrene -E- α , β -HpCS-, β , β -2,3,4,5,6-heptachlorostyrene - β -HpCS- and octachlorostyrene -OCS-) and PCBs mixture (28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) were from Dr. Ehrenstorfer

(Wesel, Germany). The PCBs considered in this study have been named according to the IUPAC system. As a recovery standards solution, 1,2,4,5-tetrabromobenzene (TBB) from Aldrich (Steinheim, Germany) and PCB-200 from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany) were used. The internal standard was PCB 142 (Dr. Ehrenstorfer; Wesel, Germany). The standard mixtures of HCHs, HCB, PCBs, DDTs and the solutions of recovery standards of 1,2,4,5-tetrabromobenzene and PCB-200 were prepared in isoctane.

2.4. Analytical procedures

From each sampled egg, around 1.5 g were ground with activated sodium sulphate until a fine powder was obtained. This powder was introduced into a previously cleaned cellulose cartridge (24 h in Soxhlet). This mixture was Soxhlet-extracted with 100 mL of n-hexane-dichloromethane (4:1 v/v) for 18 h after addition of TBB and PCB-200 as recovery standards. The lipid content of all samples was determined gravimetrically from an aliquot (20%) of the extract. The rest of the extract was concentrated under vacuum to 2 mL and 2 mL of sulphuric acid were added. After vigorous stirring in a Vortex-mixer (2 min) the mixture was centrifuged to remove any foam in the interface and the sulphuric acid layer was discarded. This clean-up step was repeated until a colourless transparent n-hexane layer (2 mL) was obtained (3–5 times). The final sulphuric acid mixture was re-extracted with n-hexane (2×2 mL) and all n-hexane solutions were combined and concentrated by vacuum rotary evaporation ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 Torr) to small volumes (ca. 300 μL). The solutions were then transferred to vials and evaporated to almost dryness under a gentle stream of nitrogen (10 – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). The cleaned extract was re-dissolved in 50 μL of isoctane for storage purposes. Just before proceeding with the instrumental analysis, vials were evaporated and 100 μL of the internal standard (PCB-142) were added. All target compounds have been corrected with the internal standard during the quantification.

2.5. Instrumental analysis

Samples were analysed in a Hewlett-Packard gas chromatograph (GC) Model HP-5890 equipped with an electron-capture detector and an HP-7673-A autosampler. Separation was achieved with a 60 m \times 0.25 mm I.D. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 μm). The oven temperature was programmed from $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ (holding time 2 min) to $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and finally to $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, holding the final temperature for 10 min. Injector and detector temperatures were $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $320\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. Injection was performed in the

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

splitless mode, keeping the split valve closed for 35 s. Helium was the carrier gas (1.5 mL/min) and nitrogen was used as the make-up gas (60 mL/min).

The analyses of PCSs and confirmation of OC structural assignments were performed by GC coupled to mass spectrometry in negative ion recording and chemical ionization mode (GC-MS-NICI). A GC from Agilent Technologies 6890A coupled to an MS detector 5973 N was used. The system was equipped with a 60 m × 0.25 mm I.D. DB-5 column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 μm). Helium was used as carrier gas (1.0 mL/min). Ammonia was used as reagent gas (1.75 mL/min). The temperature programme started at 90 °C (with a holding time of 2 min), then increased to 150 °C at 10 °C/min and to 310 °C at 4 °C/min with a final holding time of 20 min. Injector, ion source and transfer line temperatures were 250, 176 and 280 °C, respectively. The dwell time was 50 ms/channel.

2.6. Quality assurance

A blank was made for each batch of analysed samples. In each sample the standard recoveries (TBB and PCB-200) were calculated. Recoveries of the spiked standards into the samples ranged between 63 ± 12% and 115 ± 15%, respectively.

Residue concentrations were reported on a wet weight basis and were adjusted for the recovery percentage. Limits of detection and quantification were determined from the average instrumental signal of the blanks plus three and five times the standard deviation, respectively. Detection limits of all OCs analysed by GC-ECD ranged between 0.02 and 0.8 ng/g wet weight. Detection limits for PCSs analysed by GC-MS ranged between 0.001 and 0.022 ng/g wet weight.

2.7. Statistical procedures

Medians, means, percentiles, standard deviations and concentration ranges (minimum and maximum) were calculated for all OCs. Data concentrations were transformed into logarithmic values for normalization. Normality was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test for each compound in each locality and year. Values of one-half the limit of detection were assigned to samples with undetectable contaminant concentrations. Pollutants for which all concentrations in all analysed samples were below the limits of detection were reported as non-detected. The statistical evaluation was based on the use of parametric tests due to the normality obtained with logarithmic conversion of data. A multivariate analysis of variance test with post-hoc multi-comparisons, MANOVA, has been used for examination of the differences between locations and sampling years. In 2007 the Tukey *post-hoc* test was used because groups with identical number of samples ($n = 10$) were compared. Comparison between years was performed with t-tests for examining the differences in each location (Flix and Delta). The results were considered as significant at p -values < 0.05.

The total concentration of HCHs, DDTs, PCBs and PCSs were calculated as the sum of the following individual congeners, HCHs: α -, β -, γ - and δ -isomers, DDTs: *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT, PCBs: congeners 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180, PCSs: 1 penta-CS, 3 hexa-CSs, 3 hepta-CSs congeners and octachlorostyrene.

A canonical discriminant analysis (CDA) was carried out to check whether pollution profiles of individual specimens could be discriminated based on sampling site. CDA is a dimension-reduction technique related to principal component analysis (PCA) and canonical correlation, deriving linear combinations of the quantitative variables that provide maximal separation between the groups (in our case sites) (Belpaire et al., 2008; Bouwman et al., 2008).

3. Results

3.1. Organochlorine compound concentrations in bird eggs

Mean length, width and weight of eggs from each sampled site were not statistically different (MANOVA values $p > 0.05$ for the three cases). In addition, no significant correlation between any egg parametric data and the analysed OCs has been found (p values ranging from 0.086 to 0.889). The individual concentrations of OCs analysed in this study and the sum of the main groups analysed are reported in Table 1. HCB, *p,p'*-DDE, PCB-28, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-180 and OCS were present in 100% of the samples analysed ($n = 55$). Significant differences between locations in some groups of pollutants (sum of HCHs, sum of DDTs, sum of PCBs and sum of PCSs) were expressed as total concentrations because the differences between almost all individual congeners inside each group were also statistically significantly different.

3.2. Polychlorobiphenyls

PCBs were the highest group of OCs found in the eggs examined in this study. The mean concentrations of total PCBs observed in the Ebro River egg samples, 200–880 ng/g ww, were in the same range as those found in other studies: 240–2700 ng/g ww in Lac Grandlieu (de Cruz et al., 1997), 6–790 ng/g ww in Northern Italy (Fasola et al., 1998), 100–280 ng/g ww in the Danube Delta (Aurigi et al., 2000) and 270–1700 ng/g ww in Hong Kong (Connell et al., 2003). The highest mean and maximum concentrations of total PCBs were found in samples collected in the Flix reservoir site in 2006, 880 ng/g ww and 1400 ng/g ww, respectively.

They exhibited significant differences in total PCB concentrations between samples collected in the Flix Reservoir, 520–880 ng/g ww, and those from the other sites (200–260 ng/g ww; Table 1; Fig. 2). These differences were statistically significant. Comparison of the egg concentrations in 2006 and 2007 between Flix Reservoir and the Delta gave rise to MANOVA values with $p = 0.0001$ and $p < 0.008$, respectively. The differences between Flix Reservoir and Aiguabarreig in 2007 were also significant (MANOVA, $p < 0.017$).

These significant differences were also observed for some of the individual congeners. Thus, in 2007 congeners 101, 118, 138, 153 and 180 showed statistically significant differences between Flix and Aiguabarreig and Delta samples (MANOVA, $p < 0.023$ and $p < 0.014$; $p < 0.019$ and $p < 0.0042$; $p < 0.021$ and $p < 0.002$; $p < 0.042$ and $p < 0.009$; and $p < 0.006$ and $p < 0.003$, respectively) while congeners 28 and 52 did not show significant differences between sampled sites.

The distributions of PCB congeners were similar in all locations and between sampling years (Fig. 2c). The congeners with higher degree of chlorination, PCB-118, PCB-138, PCB-153 and PCB-180, were strongly dominant which is consistent with the congener distribution observed in other studies (Focardi et al., 1988; Elliott et al., 1989; Thomas and Anthony, 1999; Provini and Galassi 1999; Jaspers et al., 2006, 2009; Sakellarides et al., 2006). The sum of these four congeners always represented more than 96% in all Ebro River locations and sampling years. PCB-153 was the dominant congener in all sites with mean concentrations ranging between 82 ng/g ww and 320 ng/g ww (the end-members corresponding to samples from the Delta in 2006 and from Flix in 2006, respectively).

3.3. DDTs

These compounds were the second major group of OCs found in the Ebro River sites. Their average concentrations from the three sites and sampling years ranged between 220 ng/g ww and 680 ng/g ww (Table 1; Fig. 2). In 2006, the average concentrations of total DDTs were higher in the samples from the Flix Reservoir (680 ng/g ww) than in the Delta (480 ng/g ww) but in 2007 those from the Delta were highest (360 ng/g ww vs. 250 ng/g ww). In fact, in none of these

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

5

Table 1
Concentrations (mean and range, ng/g wet weight) of organochlorine compounds in eggs of Purple Heron (*Ardea purpurea*) from the sampled locations in years 2006 and 2007.

Compounds	2006		2007		
	Flix (n = 11)	Delta (n = 14)	Aiguabarreig (n = 10)	Flix (n = 10)	Delta (n = 10)
PeCB	0.4 (0.2–1.0)	0.2 (nd–1.2)	0.5 (0.3–1.0)	1.2 (0.2–5.6)	0.5 (0.2–1.0)
HCB	18 (2.4–62)	5.3 (1.1–28)	4.3 (2.2–8.8)	35 (3.1–180)	7.9 (3.9–14)
α-HCH	0.1 (nd–0.3) ^a	0.1 (nd–0.4) ^a	1.2 (nd–3.6)	0.4 (nd–3.9) ^a	0.3 (nd–2.8) ^a
β-HCH	1.0 (nd–3.0)	3.1 (0.7–7.7)	4.4 (2.3–9.2)	5.5 (1.6–16)	7.7 (2.7–26)
γ-HCH	nd ^b	nd ^b	0.9 (nd–3.5) ^a	0.4 (nd–3.8) ^a	0.6 (nd–2.9) ^a
δ-HCH	0.1 (nd–0.9) ^a	nd ^b	1.3 (nd–4.7) ^a	0.5 (nd–5.4) ^a	0.4 (nd–3.9) ^a
<i>o,p'</i> -DDE	1.5 (nd–12)	0.4 (nd–1.0)	1.0 (nd–2.7)	0.4 (nd–1.3)	1.6 (nd–4.4)
<i>p,p'</i> -DDE	660 (82–1600)	460 (88–1300)	220 (51–590)	220 (130–340)	360 (84–1700)
<i>o,p'</i> -DDD	2.8 (nd–23) ^a	0.3 (nd–3.8) ^a	1.5 (nd–2.5)	5.1 (1.3–18)	1.0 (0.7–1.8)
<i>p,p'</i> -DDD	5.1 (0.7–33)	5.2 (nd–22)	1.8 (nd–3.3)	3.7 (nd–11)	3.2 (nd–7.4)
<i>o,p'</i> -DDT	2.1 (nd–17)	0.3 (nd–1.2)	1.3 (nd–1.8)	2.0 (nd–7.6)	0.7 (nd–2.7)
<i>p,p'</i> -DDT	16 (nd–60)	10 (nd–100)	2.2 (nd–4.6)	14 (2.6–81)	2.9 (1.9–5.3)
PCB-28	19 (2.0–65)	2.2 (0.5–8.1)	1.2 (0.6–2.6)	9.3 (1.2–29)	2.0 (0.8–3.3)
PCB-52	3.6 (nd–24)	nd ^b	0.1 (nd–0.5) ^a	2.0 (nd–9.6)	nd ^b
PCB-101	7.2 (nd–25)	1.7 (0.2–7.3)	0.9 (nd–2.1)	8.9 (nd–27)	0.5 (nd–4.6)
PCB-118	40 (14–72)	8.1 (2.1–18)	20 (7.6–36)	27 (15–34)	11 (5.0–20)
PCB-138	240 (160–430)	52 (16–130)	59 (19–120)	130 (45–180)	43 (15–100)
PCB-153	320 (180–490)	82 (20–200)	110 (51–230)	190 (82–240)	83 (32–220)
PCB-180	240 (110–430)	60 (13–150)	71 (33–140)	160 (45–220)	64 (21–180)
PeCS	0.01 (nd–0.06)	0.08 (nd–0.31)	nd ^b	nd ^b	nd ^b
α-HxCs	6.2 (0.43–14)	2.1 (0.38–12)	0.12 (nd–0.95)	6.2 (0.04–35)	0.42 (0.24–0.72)
Z-β-HxCs	0.94 (0.07–2.4)	0.17 (0.03–1.2)	0.003 (nd–0.008)	0.14 (nd–0.74)	0.01 (nd–0.01)
E-β-HxCs	nd ^b	nd ^b	0.001 (nd–0.005)	nd ^b	0.001 (nd–0.004) ^a
Z-α-β-HpCS	0.05 (nd–0.22)	0.02 (nd–0.07)	0.004 (nd–0.01)	0.06 (0.01–0.31)	0.01 (nd–0.03)
β-β-HpCS	0.46 (0.10–1.3)	0.18 (0.03–0.61)	0.005 (nd–0.32)	0.95 (0.03–5.1)	0.14 (0.05–0.22)
E-α-β-HpCS	0.04 (nd–0.27)	0.02 (nd–0.09)	0.01 (nd–0.03)	0.04 (nd–0.18)	0.02 (nd–0.04)
OCS	13 (1.1–45)	2.4 (0.29–14)	1.6 (0.07–14)	7.4 (0.10–43)	0.93 (0.32–1.6)
ΣHCHs	1.1 (nd–3.0)	3.1 (0.7–7.9)	7.9 (2.3–17.7)	6.8 (1.6–21)	8.9 (2.7–29)
ΣDDTs	680 (130–1800)	480 (90–1300)	220 (59–600)	250 (140–460)	360 (90–1700)
ΣPCBs	880 (520–1400)	210 (58–500)	260 (120–530)	520 (190–690)	200 (74–520)
ΣPCSS	20 (1.7–60)	5.0 (0.9–27)	1.8 (0.1–15)	15 (0.2–84)	1.5 (0.7–2.4)

^a > 50% of samples not detected.^b 100% of samples not detected. nd: Not detected.

years there are statistically significant differences between these two sites (MANOVA, $p < 0.731$ for 2006 and MANOVA $p < 0.947$ in 2007).

p,p'-DDE was found in high mean concentration in all sampled sites (Table 1). This compound contributed between 91 and 96% to total DDTs in all locations (Fig. 2a). The proportions of *p,p'*-DDE in each individual egg ranged between 61 and 100%. Within the strong dominance of *p,p'*-DDE, the higher proportion of *p,p'*-DDT in the samples from the Flix reservoir in both 2006 and 2007 is remarkable (Fig. 2). In this respect, the highest mean and maximum concentrations of total DDTs have been found in the samples from this site, 680 ng/g ww and 1800 ng/g ww, respectively.

The mean concentration ranges of *p,p'*-DDE in the eggs studied in the Ebro sites, 220–660 ng/g ww (Table 1), were similar to those found in other studies on heron species: 87–1300 ng/g ww in Lac Grandlieu (De Cruz et al., 1997), 1–480 ng/g ww in Northern Italy (Fasola et al., 1998), 920–1300 ng/g ww in the Danube Delta (Aurigi et al., 2000), 530–1700 ng/g ww in Hong-Kong (Connell et al., 2003) and 77–2200 ng/g ww in Tai Lake (Dong et al., 2004).

3.4. Pentachlorobenzene and hexachlorobenzene

HCB and PeCB were the third major group of OCs in the eggs of Purple Heron from the studied Ebro River sites. The mean concentrations of PeCB at each site and sampling year ranged between 0.2 and 1.2 ng ww whereas the mean concentrations of HCB ranged between 4.3 and 35 ng/g ww (Table 1). The highest mean and maximum concentrations of PeCB and HCB were found in the Flix reservoir site in 2007 (5.6 ng/g ww and 180 ng/g ww, respectively).

The average concentrations of HCB in the Flix Reservoir in 2006 and 2007, 18 ng/g ww and 35 ng/g ww, respectively, were much higher than

those in the Delta and Aiguabarreig (4.3–7.9 ng/g ww). These differences between the concentrations in the Flix Reservoir and the other sites were statistically significant. MANOVA for the Flix Reservoir and Delta concentrations, $p < 0.049$. MANOVA for the Flix Reservoir and Aiguabarreig $p < 0.004$ (Fig. 3b). For PeCB concentrations in the Flix Reservoir were also higher than in the other ecosystems but the differences were not so high, e.g. 0.4 ng/g ww and 0.2 ng/g ww in Flix and the Delta in 2006 and 1.2 ng/g ww in Flix and 0.5 ng/g ww in the Delta and in the Aiguabarreig in 2007 (Table 1). In this case the concentration differences were not statistically significant (MANOVA post-hoc test reported values of $p > 0.05$).

3.5. Hexachlorocyclohexanes

Total HCHs showed higher average concentrations in the Delta, 3.1 ng/g ww, than in the Flix Reservoir, 1.1 ng/g ww, in 2006. These average concentrations were statistically significantly different (MANOVA $p < 0.003$). The same trend was observed in 2007 but with higher concentrations, especially at the Aiguabarreig and the Delta sites in relation with Flix reservoir. Mean concentrations for the sum of HCHs at these sites were 7.9, 8.9 and 6.8 ng/g ww, respectively. In this situation differences were not statistically significant (MANOVA, $p < 0.995$ and $p < 0.939$, respectively).

In both sampling years the distributions of HCHs were predominated by the β-isomer in all locations (Fig. 2b). Technical mixtures of HCHs are predominated by other isomers (α-, γ-, δ-) but the β-isomer is usually the one in highest concentrations in biologic fluids because the equatorial configuration of the chlorine substituents facilitates the solubility in lipids leading to concentration increases when moving up in the food chain (Borga et al., 2001). Mean percent values of this isomer

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>



ARTICLE IN PRESS

6

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

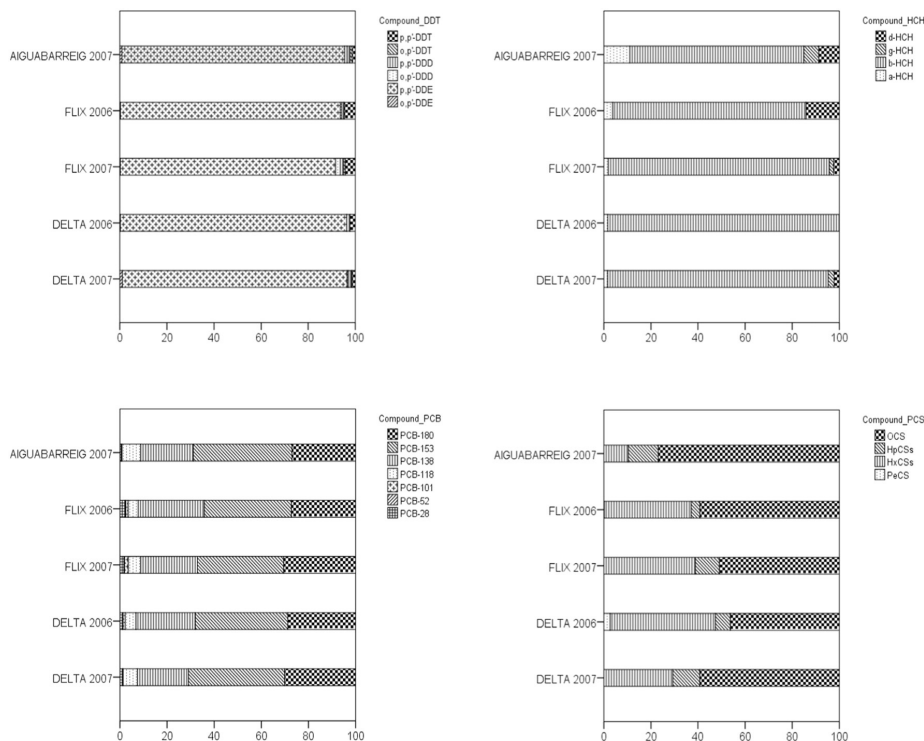


Fig. 2. Relative distributions of metabolites of DDTs (a), isomers of HCHs (b), congeners of PCBs (c) and congeners of PCSs (d) in each sampled site and year of sampling.

ranged between 74–98%, (the end-member samples corresponding to Aiguabarreig 2007 and Delta 2006, respectively; Fig. 2). In samples from Aiguabarreig 2007 higher proportion of the other 3 isomers analysed was observed, with mean percentages of 11%, 6.4% and 8.7% for the α-, γ- and δ-isomers, respectively, was observed.

3.6. Polychlorostyrenes

Total PCSs were in concentrations of 15–20 ng/g ww in the Flix Reservoir eggs and between 1.5 and 5.0 ng/g ww in the Delta and Aiguabarreig (Table 1, Fig. 2). The maximum value was observed Flix in 2007, 84 ng/g ww. Differences between sites were significant (MANOVA p = 0.0001). Significant differences were also observed when considering individual congeners such as OCS (MANOVA, p = 0.0001), α-HxCs (p = 0.0001), β-β-HpCS (p = 0.0001), Z-β-HxC (p = 0.0001), E-β-HxCs (p = 0.0001) and Z-α-β-HpCS (p < 0.001). In contrast, E-α-β-HpCS did not reflect statistically significant differences between sites (MANOVA p < 0.336).

α-HxCs, Z-β-HxCs, Z-α-β-HpCS, E-α-β-HpCS, β-β-HpCS and OCS were found in all samples (Table 1). E-β-HxCs was found in the samples from the Aiguabarreig and the Delta collected in 2007. In addition, the Delta samples of 2006 also contained PeCS (Fig. 2). OCS was the major congener in all locations and sampling years encompassing percentages between 47% and 89% of total PCSs. The second major group was composed of the hexachlorostyrenes ranging between 6.9% (Aiguabarreig 2007) and 46% (Delta 2006). α-HxCs was the major congener in this group. The heptachlorostyrene isomers were dominated by β-β-HpCS.

4. Discussion

4.1. Comparison between locations

The CDA was run on the contaminant data considering only sampling site as a determinant factor and total PCBs and DDTs as major loads of contaminants in the eggs. The first two dimensions of the CDA explained 93.5% of the total variance (Fig. 4). The clusters generated by sampling site have at least one sample overlapping but, in general, the Purple Heron eggs within each sampled site are more similar in their pollution profile (for total PCBs and DDTs) than eggs from different sample sites, indicating a local sampling site specific contaminant pressure.

4.1.1. Polychlorobiphenyls

The high concentrations of PCBs in the eggs collected at the Flix Reservoir site are consistent with the history of production of these compounds in the chlor-alkali plant located in this reservoir showing that despite the discontinuation of this activity there are still remains of these compounds in the aquatic ecosystems surrounding this area. The results are also consistent with the PCB distributions in olive tree leaves which also show that the chlor-alkali plant constituted a focal point of these compounds in the area located around the factory (Garí et al., 2014).

The influence of this focal point is also noticed in the dominance of these compounds among all OCS. As stated above, p,p'-DDE is usually the dominant OC in wild birds as consequence of the past uses of DDT (de Cruz et al., 1977; Herzke et al., 2002; Sakellariades et al., 2006).

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

7

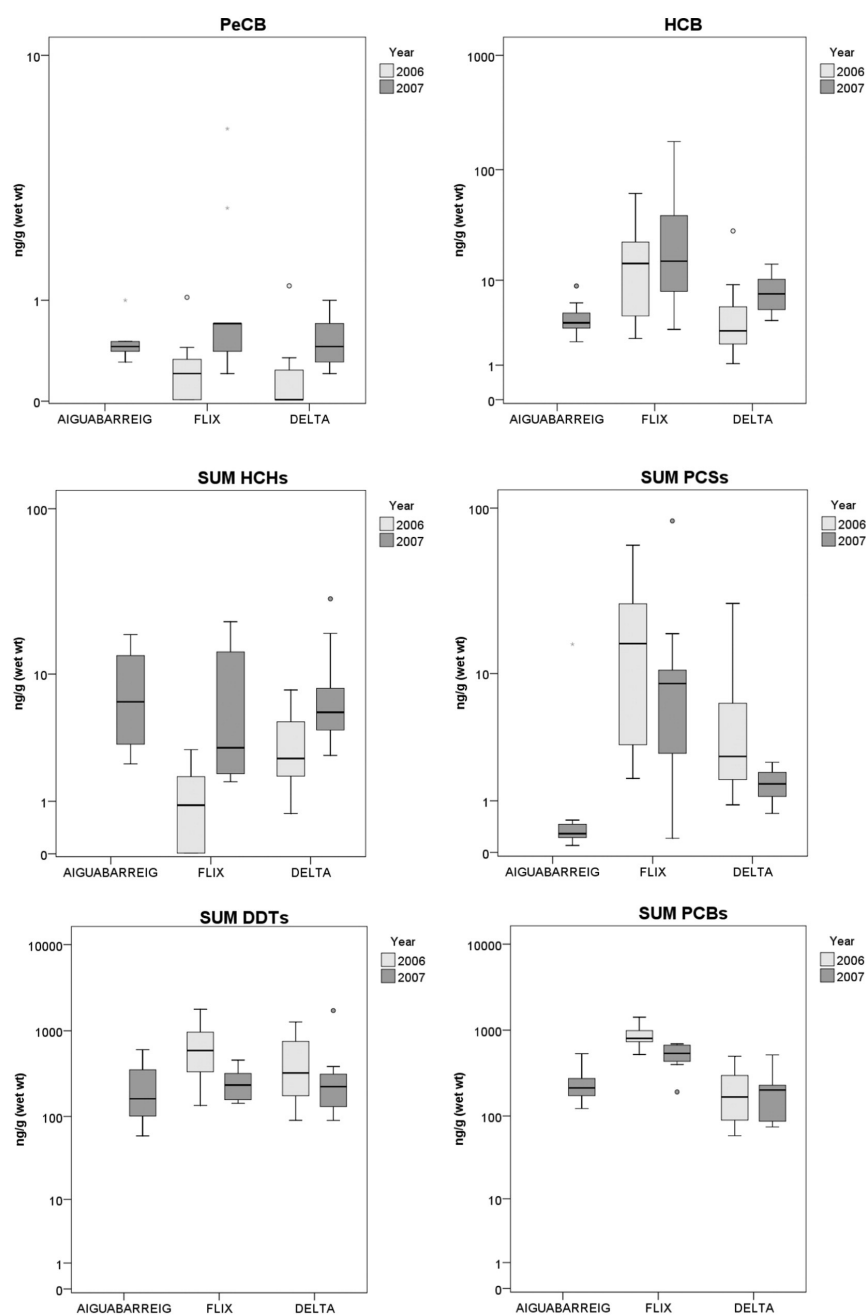


Fig. 3. Box-plot diagrams of the concentrations of the main OC groups (ng/g wet weight) in eggs of Purple Heron (*Ardea purpurea*) collected in 2006 and 2007 in each sampled location. The horizontal lines show the median values, the boxes correspond to the interquartile range and whiskers indicate the non-outlier range.

The higher proportion of these congeners is consistent with their strong lipophilicity, stability and persistence, which leads to bioaccumulation in organisms, particularly those in the top of the food webs (Borga et al., 2001). In this respect, the presence of

chlorine atoms in meta and para positions of the biphenyl rings of these four congeners enhances the resistance to metabolic attack by the cytochrome P450 iso-enzymes (Van den Brink and Bosveld, 2001).

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

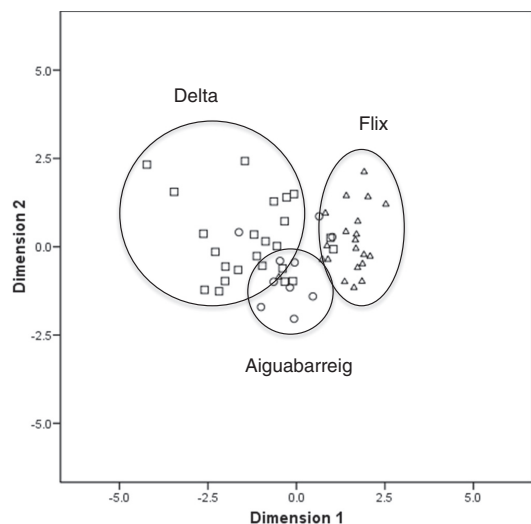


Fig. 4. CDA of eggs collected at three sampled sites along the Ebro River based on their total PCB and DDT concentrations ($n = 55$).

4.1.2. DDTs

As mentioned above, the chlor-alkali plant was the largest DDT manufacturer in Spain. However, this insecticide was also intensively used in the past in the Ebro Delta for agricultural applications. These two independent activities may have contributed to the occurrence of this group of OCS in both environments. In the Aiguabarreig, where agricultural activities were not as intense as in the Ebro Delta and the influence of the emissions from the chlor-alkali plant was very low, the DDT levels in the eggs of breeding Purple Herons were lowest, 220 ng/g ww.

However, significant differences are observed when compounds of the DDT group are considered individually. The main contrast concerns *p,p'*-DDT that occurs in higher concentrations in the Flix Reservoir site, 16–14 ng/g ww, in 2006–2007, than in the other sites (2.2–10 ng/g ww; Table 1). The differences were not statistically significant in 2006 but in 2007 the concentrations in the Flix reservoir, 14 ng/g ww, were significantly higher than in the Delta and Aiguabarreig, 2.2–2.9 ng/g ww (MANOVA, $p < 0.001$ and < 0.007 between the Flix Reservoir and the Aiguabarreig and the Delta, respectively).

The strong predominance of *p,p'*-DDE was in agreement with other studies. This compound is the main metabolite of the insecticide *p,p'*-DDT and the most frequent OC found in wild birds (de Cruz et al., 1997; Herzke et al., 2002; Sakellarides et al., 2006). The difference pointed to recent inputs of parental DDT in females breeding at this sampled site, probably due to ingestion of aquatic preys which were directly in contact with remobilized *p,p'*-DDT stored in the Flix reservoir mud.

4.1.3. Pentachlorobenzene and hexachlorobenzene

As mentioned above, these two compounds were by-products of the synthesis of organochlorine solvents and were emitted to the environment from the chlor-alkali plant. Accordingly, higher concentrations should be expected in the eggs collected in the Flix Reservoir than in the other Ebro sites. This is observed in the case of both compounds but only for HCB with statistical significance. Volatility differences may explain this contrast. The air-octanol distribution constants ($\log K_{oa}$) for HCB and PeCB are 7.38 and 6.28, respectively (Shen and Wania, 2005). The higher volatility of PeCB likely involved lower accumulation of this compound in the ecosystems surrounding the chlor-alkali plant

and therefore lower accumulation in the eggs collected in the Flix Reservoir in comparison with other compounds.

4.1.4. HCHs

These compounds have been used as insecticides and were not synthesized in the Flix chlor-alkali plant. The observed spatial distribution may reflect insecticide uses instead of industrial emissions. Results are consistent with a higher use of this mixture of pesticides in the Delta for agricultural purposes. However, γ -HCH, the isomer of highest activity as insecticide within this group, was not found in the eggs. The properties of this compound, with low octanol-water partition coefficient, $\log K_{ow} = 3.72$ (Xiao et al., 2004), enhance its transport towards the aqueous phase. This property is in strong contrast with that of the β -isomer, that is well-known to be more accumulated in eggs (Dong et al., 2004).

4.1.5. Polychlorostyrenes

The higher concentrations of PCSs in the eggs collected at the Flix Reservoir sites than in the Ebro Delta and Aiguabarreig sites are consistent with higher inputs of these compounds in the Flix Reservoir as consequence of the activities of the chlor-alkali plant.

The observed distributions are similar to those found in the Flix Reservoir dumped mud for what concerns the dominance of OCS and α -HxCs (Carrizo and Grimalt, 2009). However, the heptachlorostyrenes are dominated by β - β -HpCS in the egg distributions and in this mud Z - α - β -HpCS and E - α - β -HpCS are found in higher concentration than β - β -HpCS.

4.2. Differences between years

Lower concentrations in 2007 than in 2006 were observed for total DDTs (250 ng/g ww and 680 ng/g ww, respectively), PCBs (520 ng/g ww and 880 ng/g ww, respectively) and PCSs (15 ng/g ww and 20 ng/g ww, respectively) in the eggs collected in the Flix Reservoir (Table 1; Fig. 3) and the differences were statistically significant (MANOVA $p = 0.0001$, $p = 0.0001$ and $p < 0.007$, respectively). In contrast, the concentrations of HCB and PeCB in this site increased, e.g. 35 ng/g ww and 18 ng/g ww for HCB in 2007 and 2006, respectively, and 1.2 ng/g ww and 0.4 ng/g ww for PeCB, respectively.

HCHs increased in the eggs from the Flix Reservoir, 6.8 ng/g ww and 3.1 ng/g ww in 2007 and 2006, respectively, and the differences were statistically significant (MANOVA $p < 0.0001$). As mentioned above these compounds were not manufactured in the chlor-alkali plant.

The same changes were generally observed in the Ebro Delta. Thus, in 2007 and 2006, the PCBs were 200 ng/g ww and 210 ng/g ww, respectively, DDTs were 360 ng/g ww and 480 ng/g ww, respectively, and PCSs were 1.5 ng/g ww and 5 ng/g ww, respectively. However, the differences were not statistically significant (MANOVA $p < 1.000$, $p < 0.787$ and $p < 0.652$, respectively).

Concerning HCB and PeCB at the Ebro Delta samples, increases in concentration are observed as in the samples from the Flix Reservoir. In 2007 and 2006 the observed concentrations of HCB were 7.9 ng/g ww and 5.3 ng/g ww, respectively, and those of PeCB were 0.5 ng/g ww and 0.2 ng/g ww, respectively. These differences were statistically significant for PeCB (MANOVA, $p < 0.012$).

In relation to HCHs, increases are observed between 2007 and 2006, 8.9 ng/g ww and 3.1 ng/g ww, respectively, and the difference is statistically significant (MANOVA $p = 0.0001$).

Both sites show therefore a parallel change. The observed variation may reflect differences between compounds such as DDTs and PCBs that were no longer produced in the chlor-alkali plant in 2006–2007 showing a declining trend both in the Flix Reservoir and Delta. Conversely, the increases in HCB and PeCB may reflect the continued emission of these by-products as consequence of the sustained production of organochlorine solvents in this period. The stronger changes observed in the Flix Reservoir than in the Delta are consistent with this interpretation

ARTICLE IN PRESS

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

9

since the higher variation is observed closer to the source. The decrease in PCSs may also reflect technical changes in the factory that led to lower generation of these by-products. The increases in HCHs may reflect higher use for agricultural purposes. However, the type of agricultural activity is very different between the two sites, rice in the Delta and olive trees and vineyards nearby the Flix Reservoir. In any case, since only two years are compared, these interpretations must be considered tentatively. The observed time changes may also reflect inter-annual variability in the transfer of the OCs to the specific sites where herons are nesting.

4.3. Potential toxic effects

Some studies correlated reproductive impairment in herons with *p,p'*-DDE concentrations in eggs over 10,000 ng/g ww (Custer et al., 1997). Reduced hatching was observed for *p,p'*-DDE concentrations of 3000 ng/g ww in Great Blue Heron (*Ardea herodias*) eggs (Blus, 1996). In more recent studies, a threshold *p,p'*-DDE level of 1000 ng/g ww in heron eggs was established for the survival of young birds (Connell et al., 2003). In the examined Ebro River samples, the mean concentrations of each site do not overpass 1000 ng/g ww of *p,p'*-DDE but in the Flix Reservoir five samples were in concentrations between 1000 ng/g ww and 2000 ng/g ww, which according to these previous reports, could involve reduced hatching.

Concerning PCBs, a LOEC of 3500 ng/g ww was described for this type of water birds, e.g. Double-crested Cormorant (*Phalacrocorax auritus*), involving lower reproductive success above this limit (Tillitt et al., 1992). This threshold is well above the PCB concentrations observed in the Purple Heron of the present study.

Concerning other effects, studies of micronucleated erythrocytes in blood from chicks of Purple Heron nesting in the Ebro River Basin showed between three and six times higher micronuclei counts in the Flix Reservoir than in Aiguabarreig (Quirós et al., 2008). Chicks from the Ebro Delta showed intermediate values. These results indicate that *Ardeidae* breeding nearby the Flix Reservoir are experiencing genotoxic effects.

5. Conclusions

The concentrations of OCs found in Purple Heron eggs in selected locations of the last stretch of the Ebro River show a clear influence of the emissions of the chlor-alkali plant in the area located nearby this installation. This influence is reflected in higher concentrations of compounds manufactured in the past (PCBs and *p,p'*-DDT) or by-products of OC synthesis (HCB, PeCB and PCSs) than in the reference site (Aiguabarreig) situated upstream of this pollution source. The heron eggs collected in the Ebro Delta show higher concentrations of total DDTs (mainly *p,p'*-DDE) than in the reference site which could reflect past applications of this insecticide in the area for agriculture.

In contrast, HCHs is found in higher concentrations in the Delta and the reference site than in the Flix Reservoir but the differences are not statistically significant. These compounds are used as insecticides in agriculture and were not manufactured in the chlor-alkali plant.

The present results show that despite Purple Heron is a migratory birds, the food web transfer of OCs during the breeding season is sufficient for the accumulation of these compounds in the eggs leading to statistically significant concentration differences between sites. These differences are consistent with the emissions of these pollutants from industrial or agricultural sources to the aquatic environments. Some of the *p,p'*-DDE concentrations observed in the area nearby the chlor-alkali plant are above the threshold effects for reproductive impairment.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Spanish Ministry of Environment and the Catalan Agency for Water Management (ACA). Assistance

from the staff of the Natural Reserve of Sebes during sampling in Flix reservoir is thanked. Egg collection and field data recording were performed by Javier Cotín and Manolo García. Mireia Gascón assisted in some laboratory tasks. Eggs were collected under licence of the Departament de Medi Ambient (Catalan Government) and Parc Natural del Delta de l'Ebre. D.H. would like to thank the financial support received from the Spanish Ministry of Education (FPU, AP2007-01824).

References

- Amaral, O.C., Otero, R., Grimalt, J.O., Albaigés, J., 1996. Volatile and semi-volatile organochlorine compounds in tap and riverine waters in the area of influence of a chlorinated organic solvent factory. *Water Res.* 30, 1876–1884.
- Aurigi, S., Focardi, S., Hulea, D., Renzoni, A., 2000. Organochlorine contamination in bird's eggs from the Danube Delta. *Environ. Pollut.* 109, 61–67.
- Baker, S.D., Sepúlveda, M.S., 2009. An evaluation of the effects of persistent environmental contaminants on the reproductive success of Great Blue Herons (*Ardea herodias*) in Indiana. *Ecotoxicology* 18, 271–280.
- Belpaire, C., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., 2008. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES J. Mar. Sci.* 65, 1483 (1491).
- Blus, L.J., 1996. DDT, DDD and DDE in birds. In: Beyer, N.W., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W. (Eds.), *Environmental Contaminants in Wildlife—interpreting Tissue Concentrations*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 49–71.
- Borga, K., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U., 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents sea food chain. *Environ. Pollut.* 113, 187–198.
- Bouwman, H., Polder, A., Venter, B., Skaare, J.U., 2008. Organochlorine contaminants in cormorant, darter, egret and ibis eggs from South Africa. *Chemosphere* 71, 227–241.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C., 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners—a mass balance approach: 1. Global production and consumption. *Sci. Total Environ.* 290, 181–198.
- Carrizo, D., Grimalt, J.O., 2009. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of polychlorostyrene congener mixtures in sediments, human sera and cord sera. *J. Chromatogr. A* 1216, 5723–5729.
- Connell, D.W., Fung, C.N., Minh, T.B., Tanabe, S., Lam, P.K.S., Wong, B.S.F., Lam, M.H.W., Wong, L.C., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., 2003. Risk to breeding success of fish-eating ardeids due to persistent organic contaminants in Hong Kong: evidence from organochlorine compounds in eggs. *Water Res.* 37, 459–467.
- Cooke, A.S., Bell, A.A., Prest, I., 1976. Egg shell characteristics and incidence of shell breakage for grey herons *Ardea cinerea* exposed to environmental pollutants. *Environ. Pollut.* 11, 59–84.
- Custer, T.W., Pendleton, G., Ohlendorf, H., 1990. Within-clutch and among-clutch variation of organochlorine residues in eggs of black-crowned night-herons. *Environ. Monit. Assess.* 15, 83–90.
- Custer, T.W., Hines, R.K., Melacon, M.J., Hoffman, D.J., Wickliffe, J.K., Bickham, J.W., Martin, J.W., Henshel, D.S., 1997. Contaminant concentrations and biomarker response in great blue heron eggs from 10 colonies on the upper Mississippi River, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 260–271.
- De Cruz, I., Mougin, C., Grolleau, G., 1997. Chlorinated hydrocarbons in eggs of Grey Heron (*Ardea cinerea*) in France (Lac de Grandlieu). *Chemosphere* 5, 1003–1009.
- De Luca-Abbott, S.B., Wong, B.S.F., Peakall, D.B., Lam, P.K.S., Young, L., Lam, M.H.W., Richardson, B.J., 2001. Review of effects of water pollution on the breeding success of waterbirds with particular reference to Ardeids in Hong Kong. *Ecotoxicology* 10, 327–349.
- Dong, Y.H., Wang, H., An, Q., Ruiz, X., Fasola, M., Zhang, Y.M., 2004. Residues of organochlorinated pesticides in eggs of water birds from Tai Lake in China. *Environ. Geochem. Health* 26, 259–268.
- Elliott, J.E., Butler, R.W., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E., 1989. Environmental contaminants and reproductive success of great blue herons (*Ardea herodias*) in British Columbia, 1986–87. *Environ. Pollut.* 59, 91–114.
- Fasola, M., Movalli, P.A., Gandini, C., 1998. Heavy metal, organochlorine pesticide and PCB residues in eggs and feathers of herons breeding in Northern Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 87–93.
- Focardi, S., Leonzio, C., Fossi, C., 1988. Variations of polychlorinated biphenyl congener composition in eggs of Mediterranean water birds in relation to their position in the food chain. *Environ. Pollut.* 52, 243–255.
- Gari, M., Bosch, C., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2014. Impacts of atmospheric chlor-alkali factory emissions in surrounding populations. *Environ. Int.* 65, 1–8.
- Grimalt, J.O., Gómez-Belinchón, J.L., Llop, R., Albaigés, J., 1988. Water-phase distribution of hexachlorobenzene in a deltaic environment (Ebro Delta, Western Mediterranean). *Chemosphere* 17, 1893–1903.
- Grimalt, J.O., Sunyer, J., Moreno, V., Amaral, O.C., Sala, M., Rosell, A., Antó, J.M., Albaigés, J., 1994. Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content. *Int. J. Cancer* 56, 200–203.
- Herzke, D., Kallenborn, T., Nygard, R., 2002. Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: congener-, isomer- and enantiomer specific considerations. *Sci. Total Environ.* 291, 59–71.
- Hickey, J.J., Anderson, D.W., 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science* 162, 271–273.
- Jaspers, V.L.B., Covaci, A., Voorspoels, S., Dauwe, T., Eens, M., Schepens, P., 2006. Brominated flame retardants and organochlorine pollutants in aquatic and terrestrial

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>



ARTICLE IN PRESS

10

D. Huertas et al. / Science of the Total Environment xxx (2015) xxx–xxx

- predatory birds of Belgium: levels, patterns, tissue distribution and condition factors. *Environ. Pollut.* 139, 340–352.
- Jaspers, V.L.B., Covaci, A., Deleu, P., Eens, M., 2009. Concentrations in bird feather reflect regional contamination with organic pollutants. *Sci. Total Environ.* 407, 1447–1451.
- Malik, R.N., Rauf, S., Mohammad, A., Akber Shah Eqani, S.A.M., Ahad, K., 2011. Organochlorine residual concentrations in cattle egret from the Punjab Province, Pakistan. *Environ. Monit. Assess.* 173, 325–341.
- McEwen, L.C., Stafford, C.J., Hensler, G.L., 1984. Organochlorine residues in eggs from black-crowned night-herons from Colorado and Wyoming. *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 367–376.
- Muñoz, P., 1994. *Alemanys a l'Ebre, La colònia química alemanya de Flix (1897–1994)*. El Mèdol, Tarragona, p. 171.
- Ohlendorf, H.M., Marois, K.C., 1990. Organochlorines and selenium in California night-heron and egret eggs. *Environ. Monit. Assess.* 15, 91–104.
- Pain, D.J., Burneleau, G., Bavoux, C., Wyatt, C., 1999. Levels of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, mercury and lead in relation to shell thickness in marsh harrier (*Circus aeruginosus*) eggs from Charente-Maritime, France. *Environ. Pollut.* 104, 61–68.
- Palanques, A., Grimalt, J.O., Belzunces, M., Estrada, F., Puig, P., Guillén, J., 2014. Massive accumulation of highly polluted sedimentary deposits by river damming. *Sci. Total Environ.* 497–498, 369–381.
- Pastor, D., Sanpera, C., González-Solís, J., Ruiz, X., Albaigés, J., 2004. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere* 55, 567–576.
- Provinci, A., Galassi, S., 1999. Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in bird 563 eggs from Calabria (Southern Italy). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143, 91–97.
- Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., Piña, B., 2008. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environ. Pollut.* 155, 81–87.
- Risebrough, R., de Lappe, B., Walker II, W., Simoneit, B.R.T., Grimalt, J.O., Albaigés, J., García, J., Ballester, A., Mariño, M., 1983. Application of the Mussel Watch Concept in studies of the distribution of hydrocarbons in the coastal zone of the Ebro Delta. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 181–187.
- Sakellariades, T.M., Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Lambropoulou, D., Dimou, A., Albanis, T.A., 2006. Accumulation profiles of persistent organochlorines in liver and fat tissues of various waterbird species from Greece. *Chemosphere* 63, 1392–1409.
- Shen, L., Wania, F., 2005. Compilation, evaluation, and selection of physical–chemical property data for organochlorine pesticides. *J. Chem. Eng. Data* 50, 742–768.
- Thomas, C.M., Anthony, R.G., 1999. Environmental contaminants in great blue herons (*Ardea herodias*) from the lower Columbia River and Willamette Rivers, Oregon and Washington, USA. *Environ. Contam. Toxicol.* 18, 2804–2816.
- Tillitt, D.E., Ankley, G.T., Giesy, J.P., Ludwig, J.P., Kurita-Matsuda, H., Weseloh, D.V., Ross, P.S., Bishop, C.A., Sileo, L., Stromborg, K.L., Larson, J., Kubiak, T.J., 1992. Polychlorinated biphenyl residues and egg mortality in double-crested cormorants from the Great Lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1281–1288.
- Van den Brink, N.W., Bosveld, B.T.C., 2001. PCB concentrations and metabolism patterns in common terns (*Sterna hirundo*) from different breeding colonies in The Netherlands. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 280–285.
- Xiao, H., Li, N., Wania, F., 2004. Compilation, evaluation, and selection of physical–chemical property data for α -, β - and γ -hexachlorocyclohexane. *J. Chem. Eng. Data* 49, 173–185.

Please cite this article as: Huertas, D., et al., Organochlorine compounds in Purple Heron eggs (*Ardea purpurea*) nesting in sites located around a chlor-alkali plant (Ebro River), *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.037>

4.3.2 Article 5

Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain)

C. Barata¹, M.C. Fabregat¹, J. Cotín², D. Huertas¹, M. Solé³, L. Quirós¹,
C. Sanpera², L. Jover², X. Ruiz², J.O. Grimalt¹, B. Piña¹

¹*Department of Environmental Chemistry, IDÆA-CSIC,
Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain*

²*Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of Barcelona,
Av. Diagonal 645, 08028-Barcelona, Spain*

³*Institut de Ciències del Mar, ICM-CSIC
Pg. Marítim de la Barceloneta 37-49, 08003-Barcelona, Spain*

Article published at: Environmental Pollution





Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

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

Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain)

C. Barata^{a,*}, M.C. Fabregat^a, J. Cotín^b, D. Huertas^b, M. Solé^c, L. Quirós^a, C. Sanpera^b, L. Jover^b, X. Ruiz^b, J.O. Grimalt^a, B. Piña^a

^a Department of Environmental Chemistry, ID/EA-CSIC, Jordi Girona 18, 08034 Barcelona, Spain

^b Departament de Biologia Animal, Universitat de Barcelona, Avda Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^c Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta 37–49, 08003 Barcelona, Spain

High levels of organochlorine and mercury levels in eggs and feathers were related with altered blood biomarkers of heron nesting chicks.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2009

Received in revised form

7 September 2009

Accepted 13 October 2009

Keywords:

Total oxyradical scavenging capacity

Esterases

Lactate dehydrogenase oxidant stress

Organochlorine compounds

Mercury

Ardeida

ABSTRACT

Blood biomarkers and levels of major pollutants in eggs and feathers were used to determine pollution effects in nestlings of the Purple Heron *Ardea purpurea* and the Little Egret *Egretta garzetta*, sampled on three Ebro River (NE Spain) areas: a reference site, a site affected by the effluents of a chlor-alkali industry and the river Delta. The two impacted heron populations showed mutually different pollutant and response patterns, suggesting different sources of contamination. In the population nesting near the chlor-alkali plant, elevated levels of hexachlorobenzene (HCB) and polychlorobiphenyls (PCBs) in eggs, and mercury in feathers in *A. purpurea* chicks were related with reduced blood antioxidant defenses and increased levels of micronuclei. In Ebro Delta, high levels of plasmatic lactate dehydrogenase in *A. purpurea* chicks and high frequency of micronuclei in blood of both species were tentatively associated with intensive agricultural activities taking place in the area. These results provide the first evidence of a biological response in heron chicks to the release of pollutants at a chlor-alkali plant.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Piscivorous birds such as herons and egrets (family Ardeidae) are suitable bio-indicators of environmental pollution in aquatic systems (Furness and Camphuysen, 1997; De Luca-Abbott et al., 2001; Connell et al., 2003; Champoux et al., 2006). They are top consumers in the trophic chain of aquatic ecosystems, and can potentially accumulate persistent organic pollutants and metals (Mañosa et al., 2001). The combined use of biomarkers and chemical analyses in the last decade has allowed assessing and identifying adverse health effects of endocrine disrupting persistent organic pollutants, pesticides and metals on several waterbirds (Fossi et al., 1994; Cordi et al., 1997; Muir et al., 1999; Vos et al., 2000; Strum et al., 2008). More recently the use of non-lethal biological techniques such as the analyses of biomarkers in blood, and contaminants in feathers and eggs have been applied when studying endangered species (Muir et al., 1999; Vos et al., 2000;

Champoux et al., 2002, 2006; Franson et al., 2002; Murvoll et al., 2006; Quirós et al., 2008).

Antioxidant defenses represent the detoxification pathway of reactive oxygen species (ROS) in aerobic organisms (Livingstone, 2001). When ROS exceed antioxidant defenses, oxidative damage of lipids within cell membranes, of DNA molecules and proteins may occur leading to a pathological condition, generally termed oxidative stress (Livingstone, 2001). In this way, knowledge about the responses of organisms to oxidative stress may provide valuable information about their health status. Recently, some authors (Winston et al., 1998; Regoli, 2000), developed an analytical method to evaluate the total oxyradical scavenging capacity (TOSC) of any given tissue, defined as the capacity of the biological sample to neutralize ROS. For a given tissue lower TOSC values are likely to be related to lower capacity to detoxify ROS and hence a greater susceptibility to oxidative stress. The method was originally developed for rat liver (Winston et al., 1998), but in recent times it has been applied to the blood of birds in environmental surveillance programs (Corsolini et al., 2001). Plasmatic enzymes, such as the activity of lactate dehydrogenase and of B esterases such as butyrylcholinesterase and carboxylesterases may also provide

* Corresponding author. Tel.: +34 9 3400 6100.
E-mail address: cbmqam@cid.csic.es (C. Barata).

valuable information on liver damage and the neurotoxic effects of pesticides in birds, respectively (Champoux et al., 2006; Fossi et al., 1994; Cordi et al., 1997; Strum et al., 2008). The presence of micronuclei in peripheral erythrocytes has also been used to evaluate the environmental impact by genotoxicants in different species, including birds (Kim et al., 2003; Stoncius and Lazutka, 2003; Quirós et al., 2008). Micronucleated cells originate when mitotic cells with chromatid breaks or dysfunctional mitotic apparatus undergo abnormal anaphase distribution of chromatin. The resulting micronuclei can be quantified either by microscopy or by flow cytometry analysis. The latter methodology represents a major advance in terms of sensitivity, reliability and throughput. Indeed in a recent study conducted in the Ebro river (NE Spain), the presence of micronuclei measured by flow cytometry analysis in peripheral erythrocytes in heron nestlings evidenced higher micronuclei counts in samples from sites heavily contaminated with metals, organochlorine residues and pesticides (Quirós et al., 2008).

The Ebro catchment is the largest river basin in Spain, covers an area of 85,362 km² and receives the potential influence of 3 million people, including some heavily industrialized areas. One of these areas is the Flix site, where an organochlorine industry operates since the beginning of the 20th century. This long operational period, along with the construction of a dam next to the factory around 1960, resulted in the accumulation of high amounts of heavy polluted sediments in the adjacent riverbed (Fernández et al., 1999). The surroundings of the Flix dam have become a valuable wetland, with profusion of nesting birds and small mammals. Pollutants originated at Flix site are carried downstream by the Ebro river to its Delta 90 km away, an UNESCO wildlife and bird reserve (Pastor et al., 2004). Ebro Delta land is also affected by an intensive agricultural activity, with significant impact on wildlife (Mañosa et al., 2001). Therefore both Flix and the Ebro Delta could be considered impacted sites. Aiguabarreig, a marsh site and bird sanctuary located upstream of Flix represents an appropriate reference site due to its high ecological value (Quirós et al., 2008).

The aim of this study is to test the usefulness of using a set of non-destructive markers to monitor environmental hazards of organochlorine and metallic persistent pollutants in nestlings of two engaged piscivorous bird species (*Ardea purpurea* and *Egretta garzetta*) along the Ebro river (NE Spain). By combining and comparing the response of blood biomarkers with levels of selected pollutants in eggs and feathers it was intended to identify potential contaminants causing detrimental effects on the studied bird species. Nestlings instead of adults were used to minimizing the effect of bioaccumulation because the time of exposure is known and similar for all samples. Furthermore, since all chicks are provisioned with prey caught by parents in the surroundings of the colony, the results should reflect only the impact of pollutants ingested at that site. Provided that herons and egrets and persistent organic and metallic pollutants are distributed world wide, the methods and results obtained in this study may apply or be used to assess the effects of pollution in other areas of concern.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and tissue preparation

A total of 37 eggs and feathers and blood samples of 59 chicks from two species were sampled and analyzed from three locations in the eastern portion of the Ebro basin, Aiguabarreig, Flix and Ebro Delta (Fig. 1, Table 1). Egrets do not nest in Flix, neither in surrounded areas, thus the study was restricted to Aiguabarreig and Ebro Delta site. Sampling was conducted in spring 2006 at two time periods. First, one egg per nest was collected at the end of the laying period. Later, chicks were sampled 1 week before the estimated peak fledging time. During sampling, unusual adverse climatic and river flow conditions limited the number of eggs and chicks sampled in the same locations and species. To avoid pseudoreplication, only one egg and one

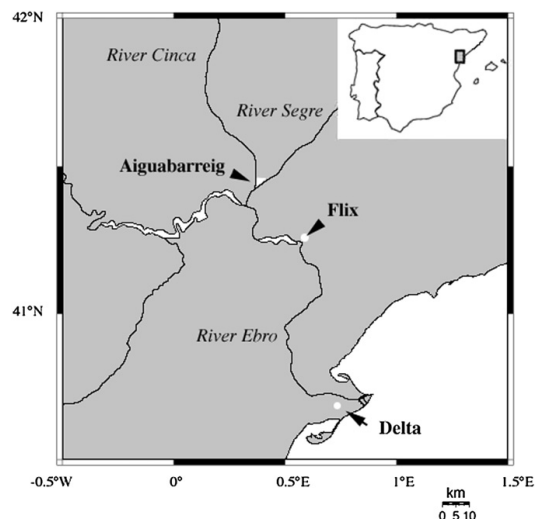


Fig. 1. Map of sampling sites in NE Spain. The inset shows the approximate position of the sampling area in the Iberian Peninsula.

chick per nest were sampled. Chicks were measured with a digital caliper (0.1 mm) for tarsus length and weighed with a Pesola spring balance to the nearest gram. In all chicks two feathers from the back were obtained for metal analyses. In 45 chicks 1 ml of blood was extracted using a heparinized syringe by puncture of the tarsal vein and transferred to heparinized vials and kept refrigerated at 4 °C. In the lab blood samples were split into two 0.5 ml aliquots. One was preserved cold and immediately used for micronuclei determination by flow cytometry as described in Quirós et al. (2008). The remaining was centrifuged at 1500 rpm for 2 min and the plasma gently removed, frozen with liquid N₂ and stored at -80 °C until biomarker determination. Entire eggs (37) were labelled and kept refrigerated in individual glass containers packed with cotton to avoid breakage until arriving at laboratory. Eggs were kept frozen (-20 °C) until organochlorine residue analysis.

2.2. Contaminant analyses

2.2.1. Metal analysis

For metals analysis, feathers were washed with a 0.1 molar NaOH solution and dried out at 50 °C. Levels of Cu, Hg and Pb were determined in acid digested samples by Perkin Elmer model Elan 6000 inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) following Barata et al. (2005). Samples ($n = 3$) of similar weight of a certified reference material of Human Hair (CRM 397, Commission of the European Community) for Hg and Pb and lobster hepatopancreas (Tort 2, National Research Council, Canada) for Cu were digested during each analytical run. Mean \pm SD recoveries ($n = 6$) were 98.5 ± 2.1 , 99.1 ± 4.0 and 100 ± 4.8 for total Hg, Cu and Pb, respectively, therefore no corrections were done. Detection and quantification (LOD/LOQ) limits were calculated from blank measurements ($n = 10$) being these values (in ng/g): 0.01/0.02, 0.07/0.19 and 0.19/0.29 for Hg, Pb and Cu, respectively.

2.2.2. Organochlorine compound analysis

Organochlorine compounds were extracted and analyzed following minor modifications of the procedures of Catalan et al. (2004). The egg content (1.5 g) of individual eggs was separated from the shell, weighed, ground down with activated sodium sulphate to obtain a fine powder and then introduced into previously cleaned cellulose cartridge. This mixture was Soxhlet-extracted during 24 h with *n*-hexane-dichloromethane (4:1 v/v) adding 1,2,4,5-tetrabromobenzene (TBB) and PCB 200 as recovery standards. Extracts were concentrated under vacuum and cleaned-up with sulphuric acid until a colourless transparent *n*-hexane layer was obtained. Extract solutions were then transferred to vials and evaporated just to dryness under a gentle stream of nitrogen (10–20 °C). The cleaned extract was redissolved in 50 μ l of isoctane for instrumental analysis.

Hexachlorobenzene (HCB), α -, β - and γ -hexachlorocyclohexanes (HCHs), the congeners of PCB nos. 28, 52, 101, 118, 153 and 180, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT were analyzed in a Hewlett-Packard gas chromatograph Model HP-5890 equipped with an electron-capture detector and an HP-7673-A autosampler. Separation was achieved with a 60 m \times 0.25 mm I.D. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA) coated with 5% phenyl methyl

Table 1

Sample size (*n*) and descriptive statistics for chick morphometric measurements and levels of heavy metals and organochlorine residues by species and sampling points. Within each species, different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences following Student's *t*-test or ANOVA and post hoc Tukey's tests for *A. purpurea* or *E. garzetta* data, respectively. Abbreviations are explained in the text. Differences in sample size are due to missing values.

Sampling	<i>n</i>	Weight ^a	Tarsus ^b	Hg ^c	Pb ^c	Cu ^c	<i>n</i>	HCB ^d	DDTs ^d	HCHs ^d	PCBs ^d
<i>A. purpurea</i> chicks and feathers							<i>A. purpurea</i> eggs				
Aiguabarreig	7	659.2 ± 89.9a	83.9 ± 7.1a	1.6 ± 0.2a	1.4 ± 0.2a	8.7 ± 0.4a	10	4.1 ± 1.2a	223.7 ± 55.2a	8.2 ± 2.1b	262.2 ± 45.3a
Flix	10	646.5 ± 65.8a	88.4 ± 5.8a	8.16 ± 1.1b	1.7 ± 0.1ab	8.1 ± 0.3a	5	18.2 ± 10.4b	684.4 ± 144.3b	1.3 ± 0.4a	878.8 ± 86.5b
Delta	4	792.5 ± 144.1a	113.2 ± 13.7a	2.4 ± 0.2a	2.1 ± 0.2b	11.3 ± 0.6b	14	5.5 ± 2.1a	477.3 ± 98.8b	3.1 ± 0.8a	205.3 ± 38.3a
<i>E. garzetta</i> chicks and feathers							<i>E. garzetta</i> eggs				
Aiguabarreig	16	318 ± 18.2A	67.3 ± 2.7A	1.6 ± 0.3A	0.7 ± 0.2A	10.7 ± 1.1A	4	3.4 ± 1.2A	556.5 ± 111.2A	1 ± 0.2A	426.1 ± 145.3A
Delta	22	328.6 ± 10A	69.1 ± 1.8A	1.7 ± 0.1A	0.9 ± 0.1A	12.3 ± 1A	4	11.8 ± 2.2B	550.2 ± 119.7A	6 ± 4.2A	532.4 ± 200.3A

^a Grams, average ± standard error.

^b Millimeters, average ± standard error.

^c Metal levels in feathers, µg/g dry weight, average ± standard error.

^d Organochlorine residues in egg, ng/g wet weight, average ± standard error.

polysiloxane (film thickness 0.25 mm). The oven temperature was programmed from 90 °C (holding time 2 min) to 130 °C at 15 °C/min and finally to 290 °C at 4 °C/min, keeping the final temperature for 10 min. Injector and detector temperatures were 280 and 320 °C, respectively. Injection was performed in the splitless mode, keeping the split valve closed for 35 s. Helium was the carrier gas (1.5 ml/min) and nitrogen was used as the make-up gas for the detector (60 ml/min). For quantification a solution of PCB 142 was added to the vial prior to injection in order to correct for instrumental variability. Calibration curves were performed for each compound. Data were corrected for surrogate recoveries. The mean recoveries for TBB and PCB 200 were 63 ± 12 and 115 ± 15%, respectively. The quantification of blanks (*n* = 10) within each batch of analysed samples was used in order to calculate the limits of detection (LOD) of the compounds, these ranged between 0.02 ng/g for HCB, 0.04–0.09 ng/g for PCBs, 0.06–0.33 ng/g for HCHs and 0.09–0.84 ng/g for DDTs.

2.3. Biochemical determinations

TOSC was determined using gas chromatography (Winston et al., 1998; Corsolini et al., 2001). Two radicals were measured: peroxy radicals (ROO• TOSC) were generated by the thermal homolysis of 20 mM 2,2'-azo-bis-(2-methylpropionamide)-dihydrochloride (ABAP) in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. Hydroxyl radicals (OH• TOSC) were generated from the Fenton reaction of iron-EDTA (1.8 mM Fe³⁺, 3.6 mM EDTA) plus ascorbate (180 mM) in 100 mM potassium phosphate buffer. Reactions were conducted at 35 °C in gastight sealed vials (Mininert valves, Supelco) in a final volume of 1 ml, and 200-µl aliquots of the headspace were analyzed at 10- to 12-min intervals for a total duration of 96 min; ethylene production was measured with a 6000 Vega Series 2 (ICU 600 Carlo ERBA Instruments) gas chromatograph equipped with a Supelco (Bellefonte, PA) packed Alumina F1 80/100 and a flame ionization detector. The oven, injection and detector temperatures were, respectively, 80, 80 and 120 °C; helium was the carrier gas (1 ml/min flow rate), and a split ratio 20:1 was used. TOSC values were quantified from the equation $TOSC = 100 - \frac{[SA]}{[CA]} \times 100$; where [SA] and [CA] are the integrated areas calculated under the kinetic curve produced during the reaction course for, respectively, sample (SA) and control (CA) reactions. Samples were diluted to obtain experimental TOSC ranging from 20 to 40, which generally corresponded to 2 µl of plasma in the assay. For all the samples, a specific TOSC (referred to 1 µl of plasma) was calculated.

Plasmatic enzymatic activities were measured at 42 °C in a Multi-Detection Microplate Reader, BioTek® (Vermont, USA) following the methods described by Diamantino et al. (2001). For lactate dehydrogenase activity (LDH) determination, the reaction mixture contained 100 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 mM NaOH, 0.2 mM NADH and 1 mM pyruvate. LDH activity was evaluated by using the extinction factor coefficient of 6.3 mM/cm and expressed in international units ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) per 1 l of plasma. BChE and CbE activities were determined using the Ellman method in the presence of 1 mM butyrylthiocholine for BChE or 0.6 mM phenylthioacetate for CbE and 0.3 mM 5,5'-dithiobis-2-dinitrobenzoic acid (DTNB), and the increase of absorbance measured at 405 nm. Activities were expressed as µmol/min per ml of plasma. Plasmatic proteins were also measured by the Bradford method using γ-globulin as standard.

2.4. Data analysis

Quantile plots and Shapiro-Wilks tests showed that data was normally distributed. Therefore differences in biometrical, contaminant residues and biochemical responses across sites and between species were compared by ANOVA procedures using Student's *t*-tests or one way ANOVA tests followed by post hoc Tukey's like multiple comparison tests for *A. purpurea* data (Zar, 1996). Relationships between the studied parameters were assessed using parametric Pearson correlation coefficients.

3. Results

3.1. Biometric measurements and contaminant residues

As expected from the sampling scheme, no significant differences in size among chicks of *A. purpurea* or *E. garzetta* were found across sites (Table 1).

Eggs and feathers of both species nesting at Aiguabarreig and Ebro Delta sites showed similar levels of contaminants except for Hg and Cu, which were significantly different ($P < 0.05$, based on *t*-tests). Analysis of the presence of different pollutants in eggs and feathers of *A. purpurea* nestlings showed significant variations in pollution loads among the three studied populations (Table 1). The Flix population showed maximal levels of Hg in feathers, and HCB, DDT and total PCBs in eggs, whereas the Aiguabarreig population showed the lowest levels for all analysed contaminants. The Ebro Delta population showed significant high levels of Pb and Cu in feathers and DDTs in eggs; in the case of the two heavy metals, the levels surpassed the values obtained in the Flix population, suggesting that the source for these pollutants should be downstream Flix. In contrast, *E. garzetta* chicks showed much less variation in contaminant loads among populations, as only HCB showed significantly high levels in eggs collected in the Ebro Delta population compared to the Aiguabarreig population (Table 1).

3.2. Biochemical responses

From the six biochemical parameters analyzed in the plasma of chicks (Table 2), only levels ROO• TOSC and the activities of BChE and CbE differed significantly between egrets and herons chicks at Aiguabarreig and Ebro Delta sites ($P < 0.05$ based on *t*-tests). Biochemical parameters in the plasma of *A. purpurea* chicks showed a similar profile to the one observed with contaminant levels (Table 2). The Aiguabarreig population showed a lower impact than the other two populations, whereas the Flix population showed a significantly low scavenging capacity (ROO• TOSC and Total TOSC). In addition, the Delta population showed a significant increase on LDH activity, indicating again a specific pollution source downstream Flix. None of the studied biochemical parameters showed significant differences between the Aiguabarreig and Delta populations of *E. garzetta* (Table 2). Table 2 also includes the data on MN abundance in chicks blood (Quirós et al., 2008), which agrees with the general picture of a low impact in the Aiguabarreig site compared to the other two sites. In this case, the difference between sites was observed with both species.

Table 2

Sample size (*n*) and descriptive statistics for protein levels, total scavenging capacity (TOSC) for peroxy and hydroxyl radicals (ROO[•], OH[•]), their sum (TOT), butyrylcholinesterase (BChE), carboxylesterase (CbE) and lactate dehydrogenase (LDH) activities and number of micronucleus (MN). Within each species different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences following ANOVA and post hoc Tukey's tests for *A. purpurea* and Student's *t*-tests for *E. garzetta* data. Differences in sample size are due to missing values.

	<i>n</i>	Protein ^a	ROO [•] TOSC ^b	OH [•] TOSC ^b	TOT TOSC ^b	BChE ^c	CbE ^c	LDH ^d	MN ^e
<i>A. purpurea</i>									
Aiguabarreig	5	25.0 ± 0.7 a	17.42 ± 1.22 a	2.70 ± 0.27 a	20.10 ± 1.31 a	0.21 ± 0.02 a	2.03 ± 0.23 a	290 ± 61 a	12.1 ± 2.6 a
Flix	10	27.9 ± 2.2 a	11.11 ± 0.65 b	2.22 ± 0.14 a	13.68 ± 0.75 b	0.22 ± 0.02 a	2.90 ± 0.20 a	216 ± 20 a	68 ± 12.1 b
Delta	4	26.7 ± 5.0 a	14.10 ± 5.95 a b	2.78 ± 0.22 a	16.87 ± 3.15 a b	0.22 ± 0.01 a	2.32 ± 0.52 a	444 ± 50 b	68.6 ± 10.8 b
<i>E. garzetta</i>									
Aiguabarreig	11	28.4 ± 2.4 A	10.90 ± 0.57 A	4.68 ± 2.28 A	15.59 ± 2.29 A	0.28 ± 0.02 A	0.27 ± 0.02 A	252 ± 14 A	18.9 ± 5.8 A
Delta	15	28.3 ± 2.1 A	10.07 ± 0.97 A	2.67 ± 0.13 A	12.73 ± 0.94 A	0.27 ± 0.02 A	0.31 ± 0.03 A	244 ± 29 A	30.3 ± 5.1 B

^a mg/ml plasma, average ± standard error.

^b TOSC units/μl plasma, average ± standard error.

^c μmol/min per ml plasma, average ± standard error.

^d μmol/min per l plasma, average ± standard error.

^e Counts per 50,000 particles counted (data from Quirós et al., 2008).

3.3. Relationships

Bivariate comparison of trace metals in feathers, biometric, plasmatic biochemical parameters and the frequency of micronuclei (MN) are depicted in Table 3. For brevity, only the sum of TOSC radicals (TOT TOSC) was considered. Most biochemical parameters and trace metals were independent of chick size, except for Cu and LDH in *A. purpurea* and Cu and Pb levels in *E. garzetta*. In all these cases, larger animals showed higher levels than smaller ones (Table 3). Several biochemical parameters in plasma also showed significant ($P < 0.05$) correlation with trace metals in feathers, but only for *A. purpurea*. In this species, levels of Hg were inversely related with TOT TOSC values and both Hg and Cu levels were positively related with MN indexes and LDH activities, respectively (Table 3, Fig. 2). A further partial correlation analysis accounting for tarsus length still denoted a significant ($P < 0.01$; 0.64, $n = 15$) relationship between LDH and Cu. These results indicate that the above mentioned relationships were unaffected by size. Conversely, no significant correlations were observed between metal levels and any of the studied biomarkers for *E. garzetta* samples (Table 3, Fig. 2). Organochlorine levels were measured in whole eggs and hence could not be compared with measured responses in chicks.

4. Discussion

Except for Cu and Hg levels in feathers, which were greater in *E. garzetta* and *A. purpurea* chicks, respectively, contaminant levels were similar in the studied two species regardless of their market size differences. Although *A. purpurea* eats larger (and presumably more contaminated) fish than the small mosquito fish and cray fish typically eaten by *E. garzetta* (Gonzalez-Martin et al., 1992), differences in prey contaminant load could only explain the observed greater levels of Hg in the bigger species. The highest Cu levels found in feathers of *E. garzetta* could be either related to a higher content of this metal in the diet (e.g., Cu in the carapace of crayfish) or due to interspecific differences (Kim and Koo, 2008).

Organochlorine compound levels in eggs from Flix and the Ebro Delta nesting sites of the studied heron species (HCB 3.4–18.2 ng/g ww, DDTs 223.7–684.4 ng/g ww, PCBs 262.2–878.8 ng/g ww), were moderate in relation to ranges reported in previous studies from North America (Mississippi, CA), Europe (Dabube Delta, N Italy) and Asian (Hong Kong) contaminated sites in great blue, grey and black-crowned night herons, little and great egrets (3–20 ng/g ww of HCB, 200–6000 ng/g ww PCB, 100–12,000 ng/g ww DDTs; Elliott et al., 1989; Custer et al., 1997; Fasola et al., 1998; Aurigi et al., 2000; Connell et al., 2003; Henny et al., 2008). The concentrations of Pb,

Cu and total Hg at the contaminated studied sites (0.9–2.1, 8.1–12 and 1.7–8.1 μg/g ww, respectively) were within the range reported elsewhere in feathers of heron nestlings (0.1–9, 3–9 and 0.4–2 μg/g ww, respectively; Fasola et al., 1998; Custer et al., 2007, 2008), the exception being the quite high levels of Hg (>30 μg/g ww) reported by Henny et al. (2002) in heron and egret nestling feathers from Carson River (Nevada).

Concentrations of *p,p'*-DDE and PCBs above 4000 and 12,000 ng/g ww in eggs could be regarded as concentrations affecting reproductive success in herons (Fasola et al., 1998). In the present study, over 95% of measured total DDT levels were *p,p'*-DDE and averaged levels of DDTs and PCBs in eggs were roughly one order of magnitude lower than those reported to affect the reproduction of herons.

A study on mercury effects on birds from the Carson River (NV) found severe adverse health effects of Hg in heron and egret chicks having 30–35 μg/g ww of Hg in their feathers (Henny et al., 2002). Studying the distribution of heavy metals in two heron species from Korea, Kim and Koo (2008) concluded that levels of Cu and Pb in feathers ranking from 9–30 to 0.2–0.5 μg/g ww, respectively, were within the background levels of wild herons and far below those having adverse effects.

The above mentioned Hg levels are about four fold the average level of the Flix population, the most contaminated one in our study. Similarly, levels of Cu and Pb found in our study are within the background range for herons. Taking this into consideration it is unlikely that the measured contaminants could cause acute effects on the studied populations. However, sublethal effects are likely to occur at much lower concentrations than those at which pathological effects become pronounced.

The studied biochemical response in plasma and of micronuclei frequency in blood of chicks varied across species and nesting sites. TOT TOSC ranks in both species (12.16–20.48 U/μl plasma) were of similar magnitude to those reported by Corsolini et al. (2001) in Adélie and Emperor penguins from Wood Bay, North Victoria (10–25 U/μl plasma). Activity levels of BChE varied little in both species (0.21–0.28 μmol/min per ml), but plasmatic CbE activities in *E. garzetta* (0.27–0.31 μmol/min per ml) were ten fold lower than those of *A. purpurea* (2–2.9 μmol/min per ml). Reported values for plasmatic B esterase activities were highly variable across bird species ranging from 0.7 to 5 μmol/min per ml for BChE and from 0.2 to 11 μmol/min per ml for CbE (Fossi et al., 1996). According to Fossi et al. (1996), B esterase activities tend to change depending on specimen size or species diet. In our study the observed differences in CbE activities between chicks of *E. garzetta* and *A. purpurea* could be explained by differences in weight (a factor of 2) since both are piscivorous. Measured plasmatic LDH activities in the studied chick

Table 3
Bivariate Pearson correlations of log transformed studied parameters by species. Abbreviations are explained in the text.

Species	TOT TOSC	LDH	MN	BChE	CbE	Lt	W	Hg	Pb	Cu
<i>A. Purpurea</i>										
Proteins	0.08 (18)	-0.19 (18)	-0.08 (18)	0.31 (18)	0.27 (18)	0.13 (18)	0.20 (17)	0.10 (18)	-0.0 (18)	-0.21 (18)
TOT TOSC		0.24 (18)	-0.41 (18)*	-0.27 (18)	-0.44 (18)*	0.32 (18)	0.35 (17)	-0.57 (18)**	0.04 (18)	0.39 (19)
LDH			0.05 (18)	0.29 (18)	-0.22 (18)	0.47 (18)*	0.46 (17)*	-0.43 (18)*	0.35 (18)	0.78 (18)***
MN				0.01 (18)	0.14 (18)	0.16 (19)	-0.22 (17)	0.64 (19)***	0.37 (19)	0.05 (19)
BChE					0.31 (18)	0.27 (18)	0.35 (17)	0.11 (18)	-0.02 (18)	0.12 (18)
CbE						-0.39 (18)	-0.37 (17)	0.39 (18)	-0.24 (18)	-0.28 (18)
Lt							0.90 (17)***	0.05 (21)	0.26 (17)	0.62 (21)***
W								-0.24 (17)	-0.14 (17)	0.38 (17)
Hg									0.16 (21)	-0.28 (21)
Pb										0.35 (21)
<i>E. garzetta</i>										
Proteins	-0.14 (14)	-0.28 (14)	-0.43 (12)	0.39 (14)	0.28 (14)	-0.07 (13)	0.30 (14)	0.27 (14)	0.14 (14)	-0.31 (14)
TOT TOSC		-0.28 (13)	-0.22 (14)	0.01 (14)	-0.27 (14)	-0.25 (15)	-0.35 (16)	0.38 (16)	-0.37 (16)	-0.22 (16)
LDH			0.35 (13)	0.06 (14)	-0.08 (14)	0.11 (14)	-0.12 (15)	0.08 (15)	0.38 (15)	0.01 (15)
MN				0.11 (12)	0.06 (12)	-0.13 (27)	-0.23 (27)	-0.08 (27)	-0.22 (27)	-0.12 (27)
BChE					0.34 (14)	0.14 (13)	0.22 (14)	-0.03 (14)	0.27 (14)	-0.23 (14)
CbE						-0.24 (13)	-0.17 (14)	0.10 (14)	0.30 (14)	-0.18 (14)
Lt							0.88 (38)***	-0.19 (37)	0.37 (38)**	0.52 (38)***
W								0.08 (38)	0.29 (38)	0.36 (38)**
Hg									-0.04 (38)	0.44 (38)***
Pb										0.56 (38)***

Sample size is depicted between brackets. Differences in sample size are due to missing values *0.05 < P < 0.1; **0.01 < P < 0.05; ***P < 0.01.

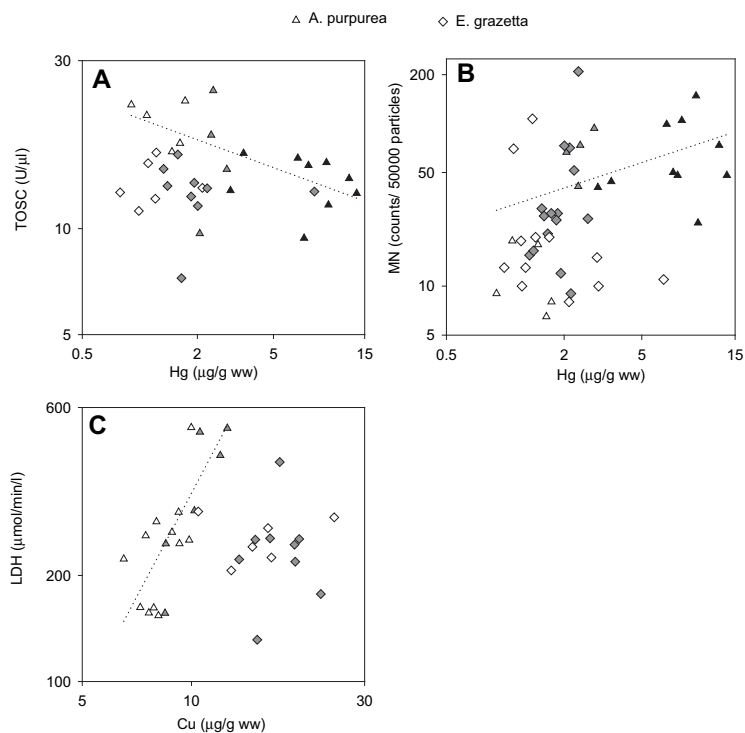


Fig. 2. Bi-plots of mercury levels in feathers versus total scavenging capacity – TOT TOSC (A), micronucleated erythrocytes MN (B) and of levels of Cu versus lactate deshydrogenase – LDH (C) in *A. purpurea* and *E. garzetta*. Each symbol corresponds to a single chick. Dotted lines indicate significant linear relationships, which only occurred in *A. purpurea* ($P < 0.05$). White, black and grey symbols correspond to values from Aiguabarreig, Flix and Delta sites, respectively. Data are depicted in log scale.

species (216–444 U/l) were comparable to those reported in nestlings and fledglings of great egret and great blue herons (200–1700 U/l; Hoffman et al., 2005; Champoux et al., 2006).

Reported nesting site effects on ROO•/TOT TOSC and micronuclei frequency provided the first evidence of detrimental effects of pollutants released by a chlor-alkali plant in chicks from heron species. In particular, nestling populations of *A. purpurea* chicks near the chlor-alkali plant showed the highest frequency and levels of micronuclei, Hg, HCB, DDTs and PCB and a reduced buffering capacity detoxify ROS (lowest values for ROO• or TOT TOSC). Moreover TOT TOSC was inversely related with mercury levels in feathers and micronuclei frequency. The observed lack of biological responses in *E. garzetta* chicks could be related to the absence of nesting sites at the most contaminated location (Flix). Exposure to various organic and inorganic contaminants are known to reduce TOT TOSC in bivalves and fish species and increase oxidative stress (Regoli, 2000; Regoli et al., 2005). More specifically, lab exposures showed that Cd, Cu, PCBs and PAHs caused oxidative stress, diminishing TOSC in bivalves (Lehmann et al., 2007; Company et al., 2008). Although there are no reported studies on effects of mercury in TOT TOSC, there is substantial information indicating that mercury decreases antioxidant defenses causing oxidative stress in adults and nestlings of egrets and herons (Hoffman et al., 2005; Henny et al., 2002). Therefore the observed site differences in ROO• or TOT TOSC in *A. purpurea* chicks agrees with previous studies and could be related to exposure to contaminants such as Hg, PCBs or DDTs.

Plasmatic B esterases like those in liver are known to act as alternative target sites for anticholinergic compounds, thus protecting brain and muscle cholinesterases from inhibitory substances (Chambers et al., 1994). Activity levels of B esterases were similar across sites in both species, thus indicating low or no exposure to anticholinergic compounds. This finding is environmentally relevant since the use of large quantities of organophosphate and carbamate insecticides in Ebro's Delta in the past decades had dramatic effects in wildlife (Mañosa et al., 2001).

Like the other parameters, only in *A. purpurea* were there significant differences across sites in LDH activity with chicks nesting at the Ebro Delta showing the greatest activities. LDH activities were also positively related with levels of Cu in feathers, and although marginally ($0.05 < P < 0.1$), inversely related with Hg. Exposure to mercury chloride and to the PCB mixture Aroclor 1254 has been observed to increase plasmatic LDH of the quail *Coturnix coturnix* (Dieter, 1974). In contrast, methylmercury inhibited plasmatic LDH activities of great egret nestlings (Hoffman et al., 2005). In the present study, total mercury levels measured in feathers were likely to be mainly methylmercury given that this is the preferred bioaccumulative form through the aquatic food web and for piscivorous birds that are at the top of the food chain (Henny et al., 2002). Under this point of view, the observed inverse relationship between LDH activity and Hg in chicks agrees with previous studies. In contrast, the observed higher LDH activities in Ebro Delta chicks and its direct correlation with Cu levels in feathers are difficult to explain. Observed differences in Cu levels and probably of LDH activities across Ebro Delta with the other studied nesting sites may be related to differences in diet or habitat related as Ebro Delta colonies were located near the sea (Champoux et al., 2006). Alternatively, the widespread use of herbicides such as propanil and endosulfan in the Ebro Delta (Mañosa et al., 2001), with known oxidative stress and LDH effects in mammals (Omurtag et al., 2008; Rankin et al., 2008) may have affected *A. purpurea* plasmatic parameters. Indeed, increased oxidative stress levels in chicks nesting at Ebro Delta may also explain the quite high frequency of micronuclei reported by Quirós et al. (2008) in both species.

In summary our results support previous findings (Quirós et al., 2008) and provide the first evidence of an association of biological responses with pollutants released by a chlor-alkali plant in chicks from heron species. In particular, in this study two impacted sites with altered biological responses on chick blood parameters have been identified: *A. purpurea* chicks nesting in a chlor-alkali impacted area (Flix) showed high frequency of micronuclei and high levels of Hg, HCB and PCB and a reduced buffering capacity to detoxificate reactive oxygen species. In Ebro Delta, biological response changes included high levels of plasmatic LDH in *A. purpurea* chicks and high frequency of micronuclei in blood of both species. We tentatively relate these alterations to the intensive agricultural activities taking place at the Ebro Delta.

Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Ministry for the Environment, the Catalan Water Agency (ACA) of the Generalitat de Catalunya and GRACCIE and AQUATOXIGEN (CSD2007-00067, CGL2008-01898) from the Spanish Ministry of Science. The authors thank Dr. Vendrell (CID, CSIC) for kindly providing the gas chromatograph to measure TOSC.

References

- Aurigi, S., Focardi, S., Hulea, D., Renzoni, A., 2000. Organochlorine contamination in bird's eggs from the Danube Delta. *Environmental Pollution* 109, 61–67.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., Porte, C., 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology* 74, 3–19.
- Catalan, J., Ventura, M., Vives, I., Grimalt, J.O., 2004. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environmental Science and Technology* 38, 4269–4275.
- Chambers, J.E., Ma, T., Scott Boone, J., Chambers, H.W., 1994. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sciences* 54, 1357–1364.
- Champoux, L., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Trudeau, S., Hontela, A., Boily, M., Spear, P., 2002. Assessment of contamination and biomarker responses in two species of Herons on the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment* 79, 193–215.
- Champoux, L., Rodrigue, J., Trudeau, S., Boily, M.H., Spear, P.A., Hontela, A., 2006. Contamination and biomarkers in the great blue heron, an indicator of the state of the St. Lawrence River. *Ecotoxicology* 15, 83–96.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Medioni, A., Camus, L., Colacó, A., Serrão-Santos, R., Bebianno, M.J., 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *Science of the Total Environment* 389, 407–417.
- Connell, D.W., Fung, C.N., Minh, T.B., Tanabe, S., Lam, P.K.S., Wong, B.S.F., Lam, M.H.W., Wong, L.C., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., 2003. Risk to breeding success of fish-eating Ardeids due to persistent organic contaminants in Hong Kong: evidence from organochlorine compounds in eggs. *Water Research* 37, 459–467.
- Cordi, B., Fossi, C., Depledge, M., 1997. Temporal biomarker responses in wild passerine birds exposed to pesticide spray drift. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 2118–2124.
- Corsolini, S., Nigro, M., Olmastroni, S., Focardi, S., Regoli, F., 2001. Susceptibility to oxidative stress in Adelle and emperor penguin. *Polar Biology* 24, 365–368.
- Custer, T.W., Hines, R.K., Melancon, M.J., Hoffman, D.J., Wickliffe, J.K., Bickham, J.W., Martin, J.W., Henshel, D.S., 1997. Contaminant concentrations and biomarker response in great blue heron eggs from 10 colonies on the upper Mississippi River. USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 260–271.
- Custer, T.W., Custer, C.M., Eichhorst, B.A., Warburton, D., 2007. Selenium and metal concentrations in waterbird eggs and chicks at Agassiz National Wildlife Refuge, Minnesota. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 103–109.
- Custer, T.W., Golden, N.H., Rattner, B.A., 2008. Element patterns in feathers of nesting black-crowned night-herons, *Nycticorax nycticorax* L., from four colonies in Delaware, Maryland, and Minnesota. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81, 147–151.
- De Luca-Abbott, S.B., Wong, B.S.F., Peakall, D.B., Lam, P.K.S., Young, L., Lam, M.H.W., Richardson, B.J., 2001. Review of effects of water pollution on the breeding success of waterbirds, with particular reference to ardeids in Hong Kong. *Ecotoxicology* 10, 327–349.

- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere* 45, 553–560.
- Dieter, M.P., 1974. Plasma enzyme activities in Coturnix quail fed graded doses of DDE, polychlorinated biphenyl, malathion and mercuric chloride. *Toxicology and Applied Pharmacology* 27, 86–98.
- Elliott, J.E., Butler, R.W., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E., 1989. Environmental contaminants and reproductive success of great blue herons *Ardea herodias* in British Columbia, 1986–87. *Environmental Pollution* 59, 91–114.
- Fasola, M., Movalli, P.A., Gandini, C., 1998. Heavy metal, organochlorine pesticide, and PCB residues in eggs and feathers of herons breeding in northern Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 87–93.
- Fernández, M.A., Alonso, C., González, M.J., Hernández, L.M., 1999. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere* 38, 33–43.
- Fossi, M.C., Massi, A., Leonzio, C., 1994. Blood esterase inhibition in birds as an index of organophosphorus contamination: field and laboratory studies. *Ecotoxicology* 3, 11–20.
- Fossi, M.C., Lari, L., Casini, S., 1996. Interspecies variation of “B” esterases in birds: the influence of size and feeding habits. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 525–532.
- Franson, J.C., Hoffman, D.J., Schmutz, J.A., 2002. Blood selenium concentrations and enzyme activities related to glutathione metabolism in wild emperor geese. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2179–2184.
- Furness, R.W., Camphuysen, K., 1997. Seabirds as monitors of the marine environment. *ICES Journal of Marine Science* 54, 726–737.
- Gonzalez-Martin, M., Ruiz, X., Llorente, G.A., 1992. Breeding parameters, feeding habits and nestling growth in a recovering population of purple herons from the Ebro Delta, Spain. *Miscellanea Zoologica* 16, 147–160.
- Henny, C.J., Hill, E.F., Hoffman, D.J., Spalding, M.G., Grove, R.A., 2002. Nineteenth century mercury: hazard to wading birds and cormorants of the Carson River, Nevada. *Ecotoxicology* 11, 213–231.
- Henny, C.J., Anderson, T.W., Crayon, J.J., 2008. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, metals, and trace elements in waterbird eggs, Salton Sea, California, 2004. *Hydrobiologia* 604, 137–149.
- Hoffman, D.J., Spalding, M.G., Frederick, P.C., 2005. Subchronic effects of methylmercury on plasma and organ biochemistries in great egret nestlings. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 3078–3084.
- Kim, J., Koo, T.-H., 2008. Heavy metal distribution in chicks of two heron species from Korea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 740–747.
- Kim, S.R., Kim, T.H., Ryu, S.Y., Lee, H.J., Oh, H., Jo, S.K., Oh, K.S., Park, I.C., Kim, J.C., Kang, C.M., Kim, S.H., 2003. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. *In Vivo* 17, 433–438.
- Lehmann, D.W., Levine, J.F., Law, J.M., 2007. Polychlorinated biphenyl exposure causes gonadal atrophy and oxidative stress in *Corbicula fluminea* clams. *Toxicologic Pathology* 35, 356–365.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42, 656–666.
- Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro Delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment* 71, 187–205.
- Muir, D., Braune, B., DeMarch, B., Norstrom, R., Wagemann, R., Lockhart, L., Hargrave, B., Bright, D., Addison, R., Payne, J., Reimer, K., 1999. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review. *Science of the Total Environment* 230, 83–144.
- Murvoll, K.M., Skaare, J.U., Moe, B., Anderssen, E., Jenssen, B.M., 2006. Spatial trends and associated biological responses of organochlorines and brominated flame retardants in hatchlings of North Atlantic kittiwakes (*Rissa tridactyla*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1648–1656.
- Omurtag, G.Z., Tozan, A., Azehirli, A.O., Azener, G., 2008. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *Journal of Pineal Research* 44, 432–438.
- Pastor, D., Sanpera, C., González-Solís, J., Ruiz, X., Albaigés, J., 2004. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere* 55, 567–576.
- Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., Piñaa, B., 2008. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (NE Spain). *Environmental Pollution* 155, 81–87.
- Rankin, G.O., Racine, C., Sweeney, A., Kraynie, A., Anestis, D.K., Barnett, J.B., 2008. In vitro nephrotoxicity induced by propanil. *Environmental Toxicology* 23, 435–442.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50, 351–361.
- Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Fattorini, D., Gorbi, S., 2005. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquatic Toxicology* 75, 43–52.
- Stoncius, D., Lazutka, J.R., 2003. Spontaneous and benzo[a]pyrene-induced micronuclei in the embryos of the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.). *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538, 31–39.
- Strum, K.M., Alfaro, M., Haase, B., Hooper, M.J., Johnson, K.A., Lancot, R.B., Lesterhuis, A.J., López, L., Matz, A.C., Morales, C., Paulson, B., Sandercock, B.K., Torres-Dowdal, J., Zaccagnini, M.E., 2008. Plasma cholinesterases for monitoring pesticide exposure in nearctic-neotropical migratory shorebirds. *Omitologia Neotropical* 19, 641–651.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 71–133.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine* 24, 480–493.

4.4 Concentracions i biomagnificació de COPs dins de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix

Resum

L'embassament de Flix ha servit de localització única per a l'estudi de la transferència dels COPs en una xarxa tròfica fluvial complexa. S'han establert les concentracions mitjanes de cada una de les matrius (abiòtiques o biòtiques) que conformen la cadena tròfica. Els sediments i el biofilm (adherit) tenen les concentracions de COPs més altes. A partir del fitoplàncton (amb concentracions molt baixes), hi ha un increment gradual de les concentracions de tots els compostos estudiats fins assolir els nivells més alts als peixos i ous d'ocell. Els factors de biomagnificació han estat més elevats als consumidors primaris que als depredadors. Aquests factors arriben a ser de 145 per alguns compostos. Això indica que a partir de concentracions de COPs petites, es poden arribar a assolir nivells molt alts que poden ser perjudicials per les espècies que es troben a la part alta de la xarxa tròfica.

Abstract

Flix water reservoir has been a unique location for the study of POPs transfer inside a complex fluvial food web. Mean concentrations from each one of the matrices from the trophic web (biotic and abiotic) have been established. Sediments and biofilm have the highest POPs concentrations. From the phytoplankton (with low concentrations) there is a gradual increase in concentrations for all analysed compounds. Highest levels have been found in fish and bird eggs. Biomagnification factors have been higher in primary consumers than in predators. These factors reached values of 145 for some pollutants. This suggests it is quite easy to reach high levels of pollution from low POPs concentrations and became dangerous for those species located in higher parts of food webs.

4.4.1 Article 6

Concentrations and distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides along the food web from Flix water reservoir, Ebro River, Spain

David Huertas¹, Joan O. Grimalt^{1*}

¹*Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water
Research (IDÆA-CSIC), Jordi Girona 18, 08034-Barcelona, Catalonia, Spain*

**Author for correspondence. E-mail: joan.grimalt@idaea.csic.es.*

Fax: +34932045904. Phone: +349340061001

Article submitted to: Water Research



Abstract

Concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides, such as dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and metabolites, polychlorinated benzenes (PeCB and HCB) and hexachlorocyclohexanes (HCHs) were measured in sediments and biota from different food web compartments collected in 2006 at Flix water reservoir. Organochlorine compounds (OCs) are of specific relevance in areas such as those receiving the discharges of chlor-alkali plants where they were synthesized. Flix water reservoir is one of those singular cases and provide an end-member case for the study of the food web relations leading to the accumulation of these pollutants along a complete riverine food web. The highest concentrations of most OC groups were found in the benthic zone (sediments 0.2-21 $\mu\text{g/g}$ and biofilm 14-282 $\mu\text{g/g}$). The mean concentrations of PeCB, HCB, total PCBs and total DDTs increase between 1 and 2 orders of magnitude from 0.1-1 $\mu\text{g/g}$ in phytoplankton, zooplankton and macrophytes to 10-40 $\mu\text{g/g}$ in fishes and bird eggs. Biomagnification factors (BMF) were higher in primary consumers than in top predators. They range from 1 to 145 proving a strong accumulation pattern along the local food web, including fish and birds. HCB, total DDTs and total PCBs were the most abundant OCs in all food web compartments analysed at Flix.

1. Introduction

The Flix water reservoir is located 90 km upstream the mouth of Ebro river, SW of Catalonia (Fig. 1). It is a small reservoir (320 ha) contained by a fusegate spillway dam that essentially works as a weir, retaining the river flow and deviating the water through an underground channel that bypasses the meander and propels a hydraulic power plant (Palanques et al., 2014). The width of the Flix reservoir ranges between 300 and 400 m and its maximum depth is 9.5 m. Waters have a short residence time, 0.15 days. The littoral area presents poor diversity of substrata and has some shallow slopes with reed (*Phragmites australis*) beds.

At this location a chloro-alkali plant dumped about 500,000 tons of muds to the riverbed during the last century. In 1949 this factory was transformed into a chlor-alkali plant for the production of chlorine, sodium hydroxide and organochlorine compounds (Muñoz, 1994). In 1973, a bicalcic phosphate plant was incorporated to manufacture this feed additive using by-product HCl and phosphorite. This activity was increased in 1992. About 35,000 tons of DDT were produced between 1945 and 1971 (Muñoz, 1994). This factory was the largest Spanish manufacturer of this insecticide. This chlor-alkali plant was also the only PCB manufacturer in Spain and produced 29,000 tons of these compounds between 1959 and 1987 (Breivick et al., 2002). Besides these compounds, large amounts of PeCB and HCB have been released to the environment surrounding the factory because this compound is a by-product of the synthesis of organochlorine solvents (Amaral et al., 1996; Grimalt et al., 1988; 1994; Gari et al., 2014). The use and production of most of these compounds has been banned because of their toxicity and high octanol-water partition constants which leads to a strong capacity for bioconcentration (Clark et al., 1990) and biomagnification (Gobas et al., 1999; Catalan et al., 2004).

Compound biomagnification factors (BMF) in a food web can be defined as the ratios between their concentrations in the organisms (CB) and their diet (CA). This factor depends on compound chemical stability, hydrophobicity, organism interactions and degradation reactions. BMF is very relevant for the more toxic pollutants as it may increase at highest foodweb levels, e.g. for the top predators (Fisk et al., 2001). Mostly all OCs studied in the present work (PeCB and HCB, HCHs, PCBs and DDTs) have properties that give them strong biomagnification potential. Concentrations of OCs found at lower trophic level organisms can be increased by 1 or 2 orders of magnitude to predators at the same food web, producing a huge rise of the toxicity risk potential for this organisms (Burreau et al., 2006).

As a single pollution input of OCs, the Flix water reservoir is therefore a model focal point for the study of the patterns of accumulation of these compounds into local food web organisms

living under the influence of a chlor-alkali plant. Therefore, there is a need to ascertain the environment impact of the OC inputs including legacy pollutants and compounds still under production at all trophic levels. Previous studies have shown high concentrations of these compounds in these sediments, e.g. 19, 39 and 1.3 $\mu\text{g/g}$ for HCB, PCBs and total DDTs, respectively (CHE, 2015). The toxicity of sediments and the accumulated effects of the atmospheric emissions were evaluated in previous studies (Bosch et al., 2009 and Gari et al., 2014, respectively) but the extent of contamination into the different food web compartments still remain to be assessed. The present study aims to evaluate the occurrence of the most important organochlorinated pollutants such as PCBs, DDTs, HCHs, PeCB and HCB in different compartments from the riverine food web of Flix water reservoir, including the analysis of sediment, biofilm, phyto and zooplankton, macrophytes, crustaceans, mollusks, fish and bird eggs.

2. Material and Methods

2.1 Samples

A total of 178 samples have been collected during 2006 and 2007. Three sediment cores were sampled at different points within the riverbed at the Flix water reservoir. Analyses have been performed up to 4 cm depth (eleven samples in total), considering this fraction as the one available for the species living at the benthic zone. Five biofilm samples were sampled including floating biofilm collected at the middle of the stream. Four phytoplankton samples were filtered from collected water using Niskin bottles between 2 and 2.5 meters depth from a boat also at the middle of the stream. Four samples of zooplankton were sampled using surface nets attached to the boat. Six macrophytes samples were collected including the most representative species at Flix water reservoir (*Cerathophyllum demersum*, *Lemna gibba* and *Myriophyllum* sp.). Twenty crayfish (*Procambarus clarkii*) were captured using special cages at both shores of the riverbed. Eight pools of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) were collected from three sampling points size-classifying samples in three levels.

Regarding upper trophic levels, twenty mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) were analysed as the smallest fish in the reservoir. In general, fish captures in this reservoir are dominated by introduced cyprinids (roach, *Rutilus rutilus*; rudd, *Scardinius erythrophthalmus*; and common carp, *Cyprinus carpio*) (Carol et al., 2003 and 2009). A total of six, twenty and thirty-three samples were analysed, respectively. However, wels (*Silurus glanis*), as predators, were also captured regularly. A total of twenty samples have been included in this study. As a top predator



bird at Flix water reservoir, twenty-one samples of purple heron eggs (*Ardea purpurea*) were collected during 2006 and 2007.

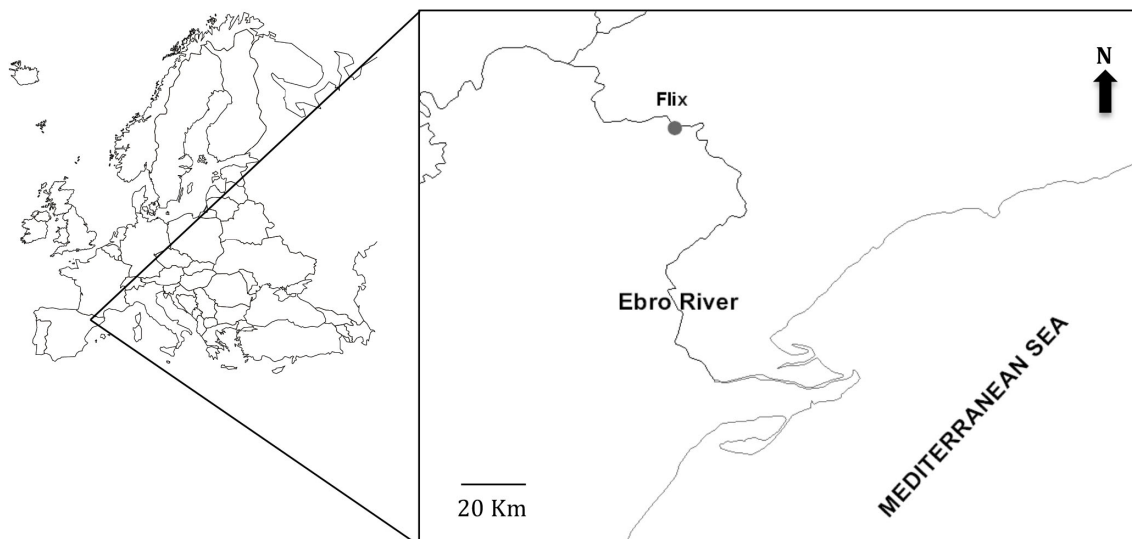


Figure 1. Map of the location of the Flix water reservoir within the Ebro River.

2.2 Chemicals

Residue analysis solvents, n-hexane, dichloromethane, isooctane, acetone, methanol, concentrated sulphuric acid 95–97% and anhydrous sodium sulphate (analytical-reagent grade) were from Merck (Darmstadt, Germany). Sulphate was activated overnight by heating at 400°C. GF/F filters (47 mm diameter and 0.7 µm porous) and cellulose extraction cartridges (20 mm I.D. and 80 mm long) were from Whatman Ltd (UK). HCB, hexachlorocyclohexane (HCH) mixture (α -, β -, γ - and δ -), DDT mixture (*o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD and *p,p'*-DDD), and PCBs mixture (28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) were from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany). PCBs analysed for this study has been named according to the IUPAC system. As a recovery standards solution, 1,2,4,5-tetrabromobenzene (TBB) from Aldrich (Steinheim, Germany) and PCB-200 from Dr. Ehrenstorfer (Wesel, Germany) were used. The internal standard was PCB 142 (Dr. Ehrenstorfer; Wesel, Germany). The standard mixtures of HCHs, HCB, PCBs, DDTs and the recovery standards solution of 1,2,4,5-tetrabromobenzene and PCB-200 were prepared in isooctane.

2.3 Sample preparation

In order to compare concentrations at different trophic levels, most related extraction methods and chemical analyses were performed. However, different methodologies were used for the determination of selected OCs in sediment and biota samples depending on the matrix. For the sediments, prior to the extraction, samples were freeze-dried and then extraction of 0.5 grams was performed by sonication following the methodology developed at Salvadó et al., 2012. Phytoplankton filters were also freeze-dried and extracted by sonication including a first step with methanol to eliminate any water residue. For the rest of samples, between 1.5 and 5 g grams of fresh sample were grounded with activated sodium sulphate until a fine powder was obtained. This powder was introduced into a previously cleaned cellulose cartridge (24h in Soxhlet). This mixture was Soxhlet-extracted with 100 mL of n-hexane–dichloromethane (4:1 v/v) for 18 h after addition of TBB and PCB-200 as recovery standards. The lipid content of all samples was determined gravimetrically from an aliquot (20%) of the extract. The rest of the extract was concentrated under vacuum to 2 mL and 2 mL of sulphuric acid were added. After vigorous stirring in a Vortex-mixer (2 min) the mixture was centrifuged to remove any foam in the interface and the sulphuric acid layer was discarded. This clean-up step was repeated until a colourless transparent n-hexane layer (2 mL) was obtained (3–5 times). The final sulphuric acid mixture was re-extracted with n-hexane (2x2 mL) and all n-hexane solutions were combined and concentrated by vacuum rotary evaporation (20°C, 20 Torr) to small volumes (ca. 300 µL). The solutions were then transferred to vials and evaporated to almost dryness under a gentle stream of nitrogen (10–20°C). The cleaned extract was re-dissolved in 50 µl of isooctane for storage purposes. Just before proceeding with the instrumental analysis, vials were evaporated and 100 µl of the internal standard (PCB-142) were added. All target compounds have been corrected with the internal standard during the quantification.

2.4 Instrumental analysis

Samples were analysed in a Hewlett-Packard gas chromatograph (GC) Model HP-5890 equipped with an electron-capture detector and an HP-7673-A autosampler. Separation was achieved with a 60 m x 0.25 mm I.D. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 mm). The oven temperature was programmed from 90°C (holding time 2 min) to 130°C at 15°C/min and finally to 290°C at 4°C/min, holding the final temperature for 10 min. Injector and detector temperatures were 280°C and 320°C, respectively. Injection was performed in the splitless

mode, keeping the split valve closed for 35 s. Helium was the carrier gas (1.5 mL/min) and nitrogen was used as the make-up gas (60 mL/min).

The confirmation of OC structural assignments were performed by GC coupled to mass spectrometry in negative ion recording and chemical ionization mode (GC-MS-NICI). A GC from Agilent Technologies 6890A coupled to an MS detector 5973N was used. The system was equipped with a 60 m x 0.25 mm I.D. DB-5 column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) coated with 5% phenyl methyl polysiloxane (film thickness 0.25 mm). Helium was used as carrier gas (1.0 mL/min). Ammonia was used as reagent gas (1.75 mL/min). The temperature program started at 90°C (with a holding time of 2 min), then increased to 150°C at 10°C/min and to 310°C at 4°C/min with a final holding time of 20 min. Injector, ion source and transfer line temperatures were 250, 176 and 280°C, respectively. The dwell time was 50 ms/channel.

2.5 Quality assurance

A blank was made for each batch of analysed samples. In each sample the standard recoveries (TBB and PCB-200) were calculated. Mean recoveries of the spiked standards into the samples were $55 \pm 2 \%$ and $104 \pm 17 \%$, $60 \pm 15 \%$ and $117 \pm 23 \%$ and $60 \pm 14 \%$ and $89 \pm 24 \%$, respectively for the sediments, phytoplankton and the rest of matrixes.

Residue concentrations were reported on a dry and lipid weight basis and were adjusted for the recovery percentage. Limits of detection and quantification were determined from the average instrumental signal of the blanks plus three and five times the standard deviation, respectively for each different used methodology. Detection limits of all OCs analysed by GC-ECD for sediment samples ranged between $9 \cdot 10^{-5}$ and $8 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{g/g}$ dry weight. Those limits for the phytoplankton were between 0.01 and 0.52 $\mu\text{g/g}$ lipid weight and for the rest of samples $4 \cdot 10^{-5}$ and 0.28 ng/g lipid weight.

2.6 Statistical procedures

SPSS® 15.0 version was used for the treatment and calculation of data sets and statistical procedures. Means and concentration ranges were calculated. Median values were represented in box plots with the percentiles and outliers. Data concentrations of organochlorine compounds were frequently not normally distributed, so conversion into logarithmic values was applied when necessary for statistical analysis. Verification of normality was performed with the Kolmogorov-Smirnov test for all data including each compound in all species before and after

the conversion. For each contaminant, one-half detection limit was assigned to samples with undetectable contaminant concentrations. Pollutants for which concentrations in all analysed samples were below the limits of detection were reported as non-detected. In most cases, statistical evaluations were based on parametric tests due to the normality obtained from original concentrations or after logarithmic conversion of data. Results were considered as significant at p -values < 0.05 .

3. Results and discussion

3.1 Concentrations and profiles of OCs along the food web

Sediment results are expressed in a dry weight basis as a consequence of its analytical procedure. For the rest of matrixes, the statistical analysis of lipid percentages showed significant differences between species (ANOVA TEST, $F=31.556$, $p=0.000$, Fig. 2). Mean lipid percentages were higher but not significantly in macrophytes (3.9%) and significantly higher in mosquitofish (6.9%) in comparison with biofilm ($p=0.000$), phytoplankton ($p<0.006$), crayfish ($p=0.000$), zebra mussel ($p<0.002$), rudd ($p=0.000$), carp ($p=0.000$) and wels ($p=0.000$). Purple heron eggs (8.9%) had higher mean percentage of lipids in comparison with all the other matrixes analysed (p values ranging from 0.000 to 0.002). Therefore, all samples except sediments have been normalized by their lipid content, in order to achieve a better comparison between different trophic positions.

have remained quite unaltered in the first 4 cm. On the other hand, mean concentrations of total PCBs were 0.2 µg/g. This value is high compared with other studies (< 2 ng/g at Danube Delta in Covaci et al, 2006 and maximums of 0.2 µg/g found the Rhine Delta, The Netherlands, in Winkels et al., 1998) but lower than chlorobenzenes or total DDTs. The congeners profile for the PCBs indicated a major contribution from the high chlorinated compounds (22%, 20% and 23% for PCB-138, PCB-153 and PCB 180, respectively) in comparison with the most volatile compounds (all of them below the 15%) (Fig. 4). Finally, the lowest mean concentration of the studied OCs was obtained for the total HCHs, with a mean value of 7 ng/g. This result indicates clearly that the chloro-alkali plant was not producing this kind of compounds and their provenience it is due to agricultural uses along the region (Covaci et al., 2006). Distribution of HCHs isomers showed a major contribution of β-HCH (66%) in comparison with the rest of isomers (21% for α-HCH and 13% for δ-HCH).

3.1.2 Biofilm, phytoplankton, zooplankton and macrophytes

Biofilm collected at Flix water reservoir was a mixture of matrix attached to the sediment or shore rocks. Concentrations of OCs were higher than those found at the sediment for all analysed compounds. Mean concentrations for PeCB and HCB were 14.1 and 282.2 µg/g. These values are about fifteen times higher than the ones found at the sediments, indicating a huge effect at this step in the bioaccumulation process through the food web. In addition, also total DDTs were at higher concentrations with a mean value of 118.3 µg/g. There was still a huge influence of the *p,p'*-DDT metabolite (48%) but a shift was detected with higher percentages of *p,p'*-DDD (22%), *o,p'*-DDD (14%) and *p,p'*-DDE (7%) in comparison with the values reported for the sediment (Fig. 3). Concentrations of total PCBs were also higher than in sediments reaching a mean value of 15.7 µg/g. The distribution of congeners was almost the same than the one reported at the sediments, with higher contribution of less volatile compounds in comparison with the lower chlorinated PCBs (Fig 4). Percentages were 19% for PCB-138, PCB-153 and PCB-180 and between 10 and 15% for PCB-28, PCB-52 and PCB-101. These results are coherent with the production of PCBs at the chlor-alkali plant and their accumulation in the sediments loaded into the river. Once more, total HCHs had the lowest concentration of the OCs analysed with a mean value of 1.9 µg/g. In this case, all isomers were detected and the major contribution still was performed by the β-HCH with a 47% of presence.

Table 1. Concentrations of organochlorinated pollutants ($\mu\text{g/g}$ lipid weight) determined in sediments, biofilm, invertebrates, macrophytes, crustaceans, mollusks, fish and bird eggs from the Elix water reservoir. Range in brackets.

Sample	Sediments ^a	Biofilm	Invertebrates	Macrophytes	Crustacean	Mollusks	Fish	P-M	P-M	P-M	P-M-C	C-F	Bird eggs
Feeding Species	-	-	Phytoplankton	Zooplankton	<i>Ceratiophyllum demersum</i> <i>Lemna gibba</i> <i>Myriophyllum sp.</i>	<i>Crangon</i> <i>Procambarus clarkii</i>	<i>Zebra mussel</i> <i>(Dreissena polymorpha)</i>	<i>Mosquitofish</i> <i>(Gambusia holbrooki)</i>	<i>Roach</i> <i>(Rutilus rutilus)</i>	<i>Rudd</i> <i>(Scardinius erythrophthalmus)</i>	<i>Carp</i> <i>(Cyprinus carpio)</i>	<i>Wels</i> <i>(Silurus glanis)</i>	<i>Purple heron</i> <i>(Ardea purpurea)</i>
N	11	5	4	4	6	20	8	20	6	20	33	20	21
% Lipids	0.4	0.4	0.8	1.7	3.9	1.1	1.8	6.4	2.7	1.7	1.9	0.6	8.9
PCB	0.8 (5.10 ⁻² -2.8)	1.41 (0.1-29.0)	3.10 ² (nd-0.1) ^b	nd ^c	2.10 ¹ (2.10 ⁻⁴ -4.10 ²)	0.1 (nd-0.5)	0.1 (nd-0.3)	0.9 (3.10 ⁻² -1.9)	0.7 (0.1-1.9)	0.5 (3.10 ⁻² -1.2)	1.6 (2.6-6.3)	0.7 (nd-0.1)	8.10 ² (nd-0.1)
HCB	20.9 (1.0-84.5)	282.2 (1.3-1068.1)	0.1 (nd-0.1)	0.1 (nd-0.3)	2.10 ² (7.10 ⁻³ -0.1)	2.7 (0.3-12.9)	2.2 (1.10 ⁻² -8.2)	3.3 (0.4-8.1)	8.3 (1.2-18.1)	9.1 (0.2-28.5)	26.4 (0.3-122.0)	12.3 (nd-66.6)	0.3 (2.10 ⁻² -2.0)
α -HCH	1.10 ² (nd-1.10 ²)	0.2 (nd-0.7)	3.10 ² (nd-0.01) ^b	nd ^c	nd ^c	1.10 ³ (nd-2.10 ²) ^b	2.10 ² (nd-0.1)	nd ^c	nd ^c	1.10 ³ (nd-2.10 ²) ^b	0.1 (nd-0.6)	0.1 (nd-0.3)	2.10 ³ (nd-4.10 ²) ^b
β -HCH	5.10 ³ (nd-2.10 ²)	0.9 (nd-3.1)	3.10 ² (nd-0.1) ^b	nd ^c	7.10 ¹ (5.10 ⁻³ -3.10 ²)	8.10 ² (nd-0.6) ^b	0.1 (nd-0.7)	3.10 ² (nd-0.1)	2.10 ² (1.10 ⁻² -4.10 ²)	3.10 ² (nd-0.1)	0.1 (nd-0.7)	0.1 (nd-0.3)	4.10 ² (nd-0.2)
γ -HCH	nd ^b	0.4 (nd-0.6)	3.10 ² (nd-0.1)	nd ^c	1.10 ³ (nd-7.10 ³) ^b	0.2 (nd-1.1)	3.10 ² (1.10 ⁻² -0.1)	3.10 ³ (nd-2.10 ²) ^b	1.10 ³ (nd-2.10 ²) ^b	5.10 ³ (nd-3.10 ²) ^b	2.10 ² (nd-0.1)	0.1 (nd-0.2)	2.10 ³ (nd-4.10 ²) ^b
δ -HCH	1.10 ³ (nd-8.10 ³)	0.5 (nd-1.9)	5.10 ² (nd-0.2) ^b	nd ^c	5.10 ² (nd-4.10 ²) ^b	3.10 ³ (nd-4.10 ²) ^b	4.10 ² (nd-0.1)	8.10 ² (nd-0.1)	nd ^c	5.10 ² (nd-3.10 ²) ^b	2.10 ² (nd-0.2) ^b	2.10 ² (nd-1.3)	4.10 ² (nd-0.1) ^b
Total HCHs	7.10 ³ (nd-3.10 ²)	1.9 (0.5-6.3)	0.1 (nd-0.5)	nd ^c	1.10 ² (5.10 ⁻⁴ -5.10 ²)	0.3 (nd-1.7)	0.2 (2.10 ⁻² -0.8)	4.10 ² (nd-0.1)	4.10 ² (1.10 ⁻² -0.1)	4.10 ² (nd-0.2)	0.2 (nd-1.3)	0.6 (5.10 ⁻² -2.1)	0.6 (nd-0.2)
PCB 28	2.10 ² (3.10 ⁻³ -3.10 ²)	2.4 (nd-3.3)	nd ^c	nd ^c	5.10 ² (2.10 ⁻³ -0.2)	0.8 (nd-4.8)	0.5 (9.10 ⁻³ -1.7)	0.6 (0.2-1.2)	1.0 (0.1-3.8)	0.6 (0.1-2.1)	1.8 (0.1-9.0)	1.6 (nd-11.2)	0.2 (1.10 ⁻² -0.7)
PCB 52	1.10 ² (9.10 ⁻² -2.10 ²)	1.6 (nd-2.4)	2.10 ² (nd-0.1) ^b	2.10 ² (nd-0.1) ^b	3.10 ² (nd-0.2)	0.9 (nd-4.7)	0.4 (0.1-1.5)	0.4 (0.2-0.7)	0.5 (0.1-1.8)	0.4 (0.1-1.3)	1.0 (0.1-7.9)	1.1 (nd-4.4)	3.10 ² (nd-0.3)
PCB 101	2.10 ² (nd-3.10 ²)	1.9 (0.2-2.9)	2.10 ² (nd-0.1) ^b	nd ^c	2.10 ² (1.10 ⁻² -0.1)	0.6 (nd-3.2)	0.4 (0.1-1.0)	0.5 (0.2-1.4)	0.4 (0.1-1.4)	0.4 (0.1-0.9)	1.4 (3.10 ⁻² -9.7)	1.4 (nd-10.3)	0.1 (nd-0.3)
PCB 118	5.10 ³ (2.10 ² -1.10 ²)	0.8 (0.1-1.2)	2.10 ² (nd-0.1) ^b	nd ^c	6.10 ³ (nd-1.10 ²)	0.1 (nd-1.3) ^b	0.2 (3.10 ⁻² -0.4)	0.2 (0.1-0.9)	0.2 (2.10 ⁻² -0.6)	0.2 (4.10 ⁻² -1.6)	1.3 (0.1-18.3)	1.3 (0.1-19.6)	0.5 (0.5-13.7)
PCB 138	4.10 ² (1.10 ² -0.1)	2.9 (0.9-4.0)	2.10 ² (nd-0.1) ^b	nd ^c	4.10 ² (3.10 ⁻² -0.1)	0.6 (nd-4.1)	0.6 (0.1-2.1)	0.9 (0.4-6.7)	0.7 (0.1-1.9)	0.6 (0.2-3.2)	2.3 (0.1-18.3)	2.3 (0.1-19.6)	2.8 (0.5-13.7)
PCB 153	3.10 ² (7.10 ⁻³ -0.1)	3.0 (0.8-4.2)	2.10 ² (nd-0.1) ^b	1.10 ² (nd-4.10 ²) ^b	4.10 ² (nd-0.2)	0.6 (nd-4.1)	0.8 (0.1-2.1)	1.2 (0.4-6.7)	0.5 (0.1-1.9)	0.7 (0.2-3.2)	2.5 (0.1-18.3)	2.5 (0.1-19.6)	3.7 (0.9-14.5)
PCB 180	4.10 ² (2.10 ² -0.1)	3.0 (1.2-3.9)	nd ^c	nd ^c	2.10 ² (nd-0.1)	0.4 (nd-0.1)	0.4 (2.10 ⁻² -1.3)	0.6 (0.2-3.2)	0.4 (4.10 ⁻² -1.6)	0.6 (4.10 ⁻² -1.1)	0.6 (0.5-13.5)	0.5 (nd-17.9)	2.9 (0.5-13.5)
Total PCBs	0.2 (5.10 ⁻² -0.3)	15.7 (3.1-21.1)	0.1 (nd-0.3) ^b	3.10 ² (nd-0.1)	0.2 (6.10 ⁻² -0.8)	4.0 (0.1-23.8)	3.4 (0.3-9.6)	4.6 (1.8-18.6)	3.6 (0.5-13.9)	3.3 (0.5-9.0)	12.5 (0.4-86.9)	12.5 (0.4-74.8)	10.2 (2.1-44.6)
α P ² -DDE	9.10 ³ (nd-2.10 ²)	1.0 (nd-2.5)	nd ^c	nd ^c	7.10 ³ (nd-3.10 ²) ^b	2.10 ² (nd-0.2) ^b	0.1 (1.10 ⁻² -0.2)	4.10 ² (nd-0.1)	0.1 (4.10 ⁻² -0.1)	0.1 (4.10 ⁻² -0.4)	0.4 (2.10 ⁻² -1.8)	0.7 (nd-2.4)	1.10 ² (nd-0.2)
p,p' -DDE	5.5.10 ² (2.10 ² -0.1)	8.2 (0.4-1.4)	nd ^c	0.2 (0.2-0.2)	0.1 (4.10 ⁻² -0.5)	1.5 (4.10 ⁻² -10.0)	1.1 (0.1-2.5)	2.3 (0.7-4.0)	1.3 (0.3-3.0)	2.3 (0.2-10.3)	7.4 (0.4-33.9)	13.4 (0.2-66.2)	6.5 (0.9-28.6)
α P ² -DDD	0.1 (3.10 ⁻² -0.2)	16.3 (0.4-31.7)	1.10 ² (nd-0.1) ^b	0.1 (nd-0.1)	0.1 (5.10 ⁻² -0.7)	0.2 (nd-1.5)	2.1 (nd-5.6)	0.1 (0.2-2.3)	0.8 (0.1-1.9)	1.1 (0.1-5.9)	4.8 (0.1-19.9)	5.4 (2.10 ² -41.5)	4.10 ² (nd-0.2)
p,p' -DDD	0.2 (0.1-0.6)	26.4 (0.5-65.2)	nd ^c	0.1 (nd-0.1) ^b	0.2 (8.10 ⁻² -0.9)	1.6 (nd-16.5)	2.9 (1.10 ⁻² -8.4)	1.4 (0.3-3.2)	0.8 (0.1-1.8)	1.4 (0.1-5.6)	5.6 (0.1-23.2)	9.0 (2.10 ² -53.4)	5.10 ² (nd-0.4)
α P ² -DDT	0.2 (nd-1.1)	9.8 (0.1-28.6)	2.10 ² (nd-0.1) ^b	nd ^c	0.1 (nd-0.4)	0.1 (nd-1.5) ^b	1.3 (nd-4.3)	4.10 ² (nd-0.3)	0.5 (3.10 ⁻² -1.5)	0.3 (2.10 ⁻² -1.9)	1.0 (nd-7.0)	3.0 (nd-12.8)	2.10 ² (nd-0.2)
p,p' -DDT	1.5 (1.10 ² -8.1)	56.6 (1.4-90.7)	nd ^c	0.1 (nd-0.2) ^b	0.1 (nd-0.3)	1.7 (nd-10.3)	1.9 (1.10 ⁻² -7.4)	0.6 (0.1-1.7)	0.3 (5.10 ⁻² -0.6)	0.1 (2.10 ⁻² -0.4)	1.4 (nd-10.6)	5.6 (nd-20.5)	0.2 (nd-0.9)
Total DDTs	2.0 (0.1-10.0)	118.3 (2.8-233.0)	3.10 ² (nd-0.1) ^b	0.4 (0.2-0.6)	0.6 (2.10 ⁻² -2.8)	5.2 (0.1-30.2)	10.2 (0.3-30.6)	5.0 (1.4-11.1)	3.7 (0.7-8.9)	5.4 (0.5-24.6)	20.6 (0.7-73.8)	37.0 (0.2-195.1)	6.8 (1.5-28.9)

nd: not detected; ^a: Concentrations expressed as $\mu\text{g/g}$ dry weight; ^b: 50% of samples not detected or quantified; ^c: 100% of samples not detected or quantified. P, Plankton; M, Macrophytes; C, Crustacean; Mo, Mollusks; F, Fish.

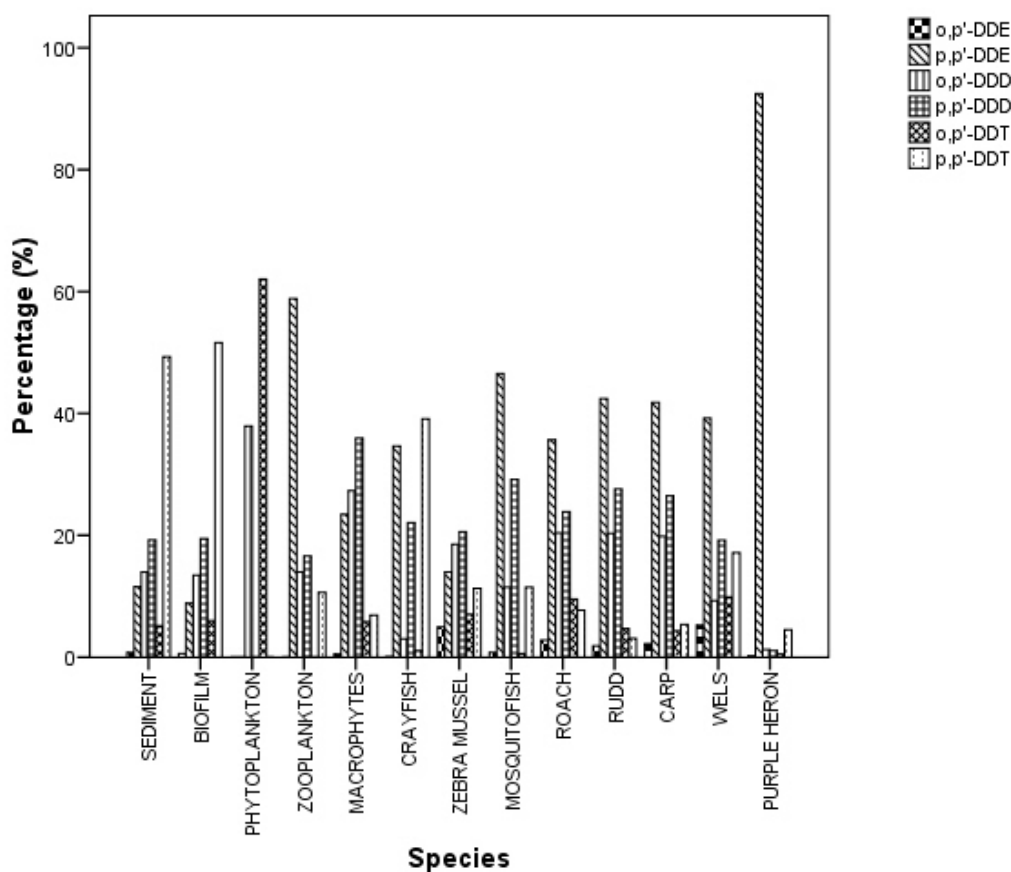


Figure 3. Relative distributions of metabolites of DDTs at each compartment from the Flix water reservoir.

First levels of primary producers inside the Flix water food web are phyto- and zooplankton and macrophytes. All them are dependants of the water column and are less influenced by pollutants concentrated at the sediments or biofilm. Phytoplankton had very low concentrations for all OCs with mean concentrations always below 0.1 $\mu\text{g/g}$. HCB, total PCBs and total HCHs were the highest pollutants found in those samples (Table 1). HCHs are the most water soluble compounds within the OCs analysed for this study with log Kow values between 3.7 and 4.1 depending on the isomer (Willet et al., 1998). Therefore, they are easily found at these first trophic levels. Concentrations of HCB at the zooplankton reported the same values but there was a shift in the presence of HCHs with all samples being under detection limits. On the other hand, zooplankton had higher concentrations of total DDTs, with a major contribution of the *p,p'*-DDE metabolite (49%).

Macrophytes were collected all around the reservoir, including samples from both shores to achieve a better mean concentrations profile of the entire reservoir. Concentrations of all OCs were at the same order of magnitude of those found at the plankton but the first remarkable

thing it is the disappearing of not detected samples in comparison with plankton samples, indicating a more consistent spread of OCs at this level of the trophic web. Mean concentrations of chlorobenzenes (PeCB and HCB) and total HCHs were really low (Table 1). On the other hand, concentrations of total PCBs and DDTs were higher than in plankton samples. Mean value for total PCBs was 0.2 µg/g and also the distribution of congeners varied in comparison with biofilm and sediments. The contribution of less chlorinated compounds (more soluble in water) was higher in macrophytes (sum of PCB-28, PCB-52 and PCB-101 reported 50% of the total PCBs). Total DDTs had a mean concentration of 0.6 µg/g with major contribution of DDD metabolites (25% of *o,p'*-DDD and 31% of *p,p'*-DDD). These can be the predominant metabolites when there is presence of DDTs in anoxic conditions (Metcalf 1973 and Goerke et al., 1979) like inside the sediments or submerged waters where mostly all this macrophytes live.

3.1.3 Zebra mussel and crayfish

Primary consumers at Flix water reservoir are the crustaceans and mollusks with a clear predominance of two invasive species along the entire site: crayfish and zebra mussel. Crayfish muscle concentrations were higher than in primary producers for all analysed OCs. PeCB mean concentration was 0.1 µg/g while levels of HCB were twenty times higher reaching a mean concentration of 2.7 µg/g. Eventhough, the highest mean concentrations were obtained for the total PCBs and DDTs (4.0 and 5.2 µg/g, respectively. This values are higher but not significantly than the ones found at the primary consumers. In crayfish, the PCB congener profile it is still dominated by more volatile compounds in relation with the heaviest chlorinated PCBs. Percentages of PCB-28, PCB-52 and PCB-101 were above 15% each (Fig 4). On the other hand, regarding the DDT metabolites, there is a shift between the predominancy of DDD metabolites in macrophytes to a higher presence of *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT (Fig 3). This is more coherent with the diet habits of this specie, feeding mainly on zooplankton and living in direct contact with the polluted sediments. Contributions of the different metabolites are equitatively distributed with 29% for the *p,p'*-DDE, 31% *p,p'*-DDD and 33% for the *p,p'*-DDT. Mean concentration of total HCHs was at the same order of magnitude of the values reported at phytoplankton and a bit lower than in biofilm, indicating low biomagnification potential.

Zebra mussel is a filtering feeding specie inhabiting sheltered locations inside the water reservoir. Mean concentrations of PeCB and HCB are similar to results found for crayfish (0.1 µg/g and 2.2 µg/g, respectively). The same pattern has been observed for total HCHs, with a mean concentration of 0.2 µg/g. Regarding total PCBs, mean concentration is slightly lower, 3.4 µg/g, but with a great shift on the congeners profile. In this specie there is a major input of more chlorinated PCBs with mean percentages of 18% and 24% for PCB-138 and PCB-153, while

the rest of analysed PCBs were below 15%. (Fig. 4). On the other hand, mean concentration of total DDTs (10.2 µg/g), was higher than in crayfish or lower trophic levels. This is clearly the major OCs input in this specie with the predominance of the original metabolites (*o,p'*- and *p,p'*-DDT) and the metabolites associated with an anoxic environment (*o,p'*- and *p,p'*-DDD). Their abundancy represents 14-20% for the DDTs and 23-31% for the DDDs, respectively.

3.1.4 Fish

Mosquitofish is the smallest fish inhabiting along the Flix water reservoir. Mean concentrations of PeCB and HCB were lower than those for total PCBs and total DDTs. PeCB mean concentration was 0.9 µg/g, almost one order of magnitude from the lower trophic levels. In the case of HCB, mean concentration was 3.3 µg/g, which is also higher than at lower positions within local food web. The highest concentrations were reported for total PCBs and total DDTs with mean concentrations of 4.6 and 5.0 µg/g, respectively. Those values are at the same order of magnitude than those found at crayfish or zebra mussel. The PCB profile was practically the same found for zebra mussel, with a high apportion of more chlorinated congeners in comparison with more volatile compounds. PCB-138 and PCB-153 represented 21% and 26% of the total PCB concentration. Regarding the contribution of DDT metabolites, there is a great shift in fish species in comparison with lower trophic levels. Mosquitofish has higher contribution of *p,p'*-DDE metabolite (47%) in comparison with *p,p'*-DDD (28%) or *p,p'*-DDT (12%). This tendency has been observed also in the rest of fish species inside the reservoir. On the other hand, total HCHs concentrations were really low in mosquitofish samples.

Roach and rudd are two similar species of fish inhabiting the Flix water reservoir. Both share the same kind of diet and can reach similar sizes. Concentrations of PeCB were at the same order of magnitude of those found at mosquitofish with mean values of 0.7 and 0.5 µg/g, respectively. On the other hand, the highest concentrations of OCs found in those species were HCB. Mean concentrations of this compound were higher in these species than in mosquitofish, reaching concentrations of 8.3 and 9.1 µg/g, respectively. The higher presence of this compound in the sediments of the reservoir can explain higher values in those fishes with more bottom feeding habits. Mean concentrations of total PCBs for both species were really similar (3.3 µg/g and 3.6 µg/g, respectively). These are the smallest mean concentrations among all fish species studied. The interesting point in those species is their PCB congeners profile that it is more influenced by less chlorinated compounds such as PCB-28 (28% and 19%, respectively) and PCB-52 (15% and 12%) in comparison with other fish species. In other studies similar results were observed (Gerstenberger et al., 1997; Svobodova et al., 2004). Regarding distribution of DDT metabolites, both species have the same trend, with highest abundance of *p,p'*-DDE

metabolite (34% and 43%, respectively) followed by *p,p'*-DDD (23% and 27%, respectively for each specie).

Carp are the most abundant fish specie inside the Flix water reservoir. Their omnivorous diet habits and good environmental conditions found at the reservoir make them larger than in other regions (Carol et al., 2009). Concentrations of PeCB and HCB were the highest of all species analysed with mean concentrations of 1.6 µg/g and 26.4 µg/g, respectively. The huge presence of HCB can be explained by their bottom feeding habits around the polluted sediments. Mean concentration of the total HCHs was low and at the same order of magnitude of the crustacean and mollusks (0.2 µg/g, Table 1). Total PCBs were found in really high concentrations, with a mean of 12.5 µg/g. This result was much higher than values found at other regions (Loganathan et al., 1995; Marsalek et al., 2004; Erdogru et al., 2005 or Sapozhnikova et al., 2005). This was the second highest mean concentration for total PCBs within Flix water reservoir food web. The congeners profile was dominated by more chlorinated compounds such PCB-138 (19%), PCB-153 (20%) or PCB-180 (16%) (Fig. 4). Total DDTs were also found in really high concentrations, with a mean value of 20.6 µg/g. It was also the second highest mean concentration behind wels. Distribution of DDT metabolites was dominated by *p,p'*-DDE (36%) but there is a strong presence of DDDs metabolites (23% and 27%) indicating bottom feeding habits around polluted sediments in anoxic conditions. These tendencies were also observed in other studies and are clearly related to specific diet habits of this specie (Covaci et al., 2006).

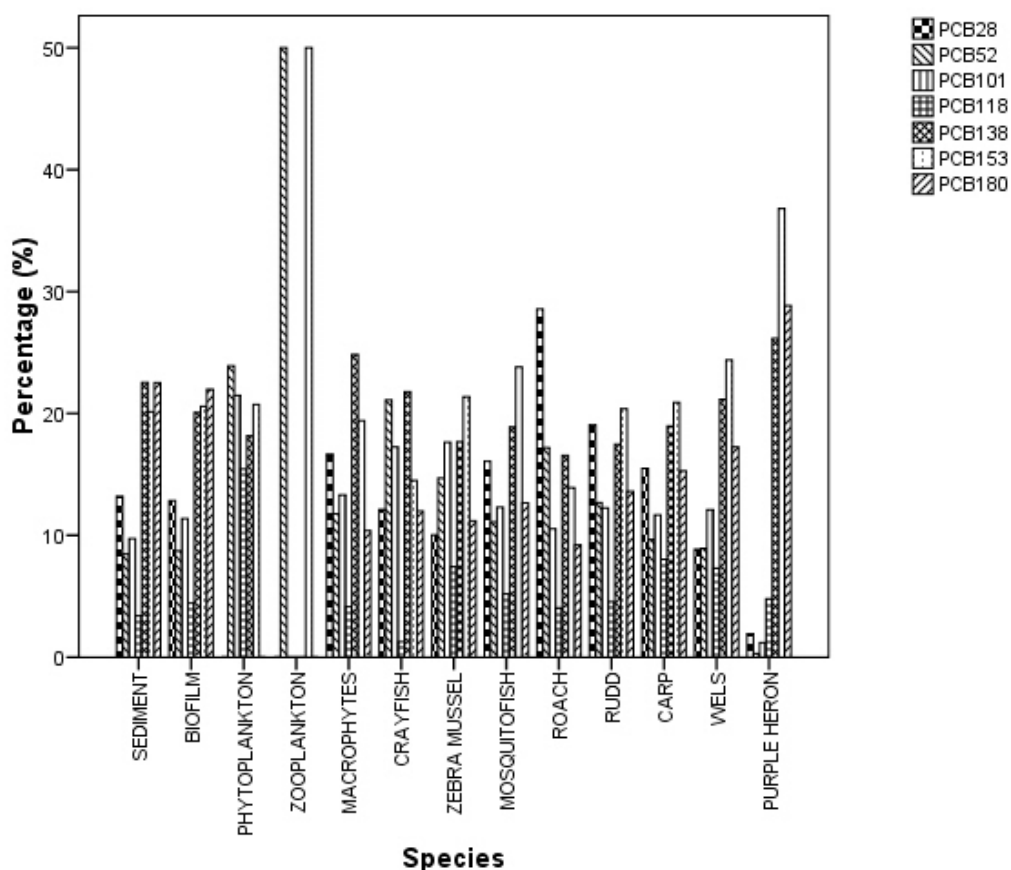


Figure 4. Relative distributions of congeners of PCBs at each compartment from the Flix water reservoir.

The largest fish species sampled at Flix was wels. This is one of the biggest fish predators of Europe and it is well established at this reservoir (Kottelat and Freyhof, 2007; Freyhof and Kottelat, 2008). Concentrations of OCs found in this species were really high, including the highest mean concentrations among the entire food web for total HCHs (0.6 $\mu\text{g/g}$), total PCBs (17.6 $\mu\text{g/g}$) and total DDTs (37.0 $\mu\text{g/g}$). PeCB and HCB mean concentrations were also high but slightly lower than those found for carps (0.7 $\mu\text{g/g}$ and 12.3 $\mu\text{g/g}$, respectively for wels). This high mean concentrations indicate a huge biomagnification process from the lower trophic levels inside the water reservoir to the top predator positions. Regarding the PCBs congener profile it was clearly dominated by less volatile compounds in the same way that carps. Percentages of PCB-138, PCB-153 and PCB-180 were really high (23%, 24% and 21%, respectively). The distribution of DDT metabolites was once more dominated by *p,p'*-DDE (36%) but with less presence of DDDs (24% of *p,p'*-DDD but only 14% of *o,p'*-DDD). On the other hand, in wels, there was detected an increase of *p,p'*-DDT (15%) in comparison with other fish species such as rudd, roach or carp.

There is a clear increase in concentrations of the main groups of OCs analysed from the first three species (not top predators) to bigger species such as carps and wels. Mean concentrations

of HCB increase from 3.3 $\mu\text{g/g}$ in mosquitofish to 26.4 $\mu\text{g/g}$ in carps (Table 1). A similar trend it is observed for the total PCBs, with the lowest mean concentration in rudd (3.3 $\mu\text{g/g}$) and higher values both in carps and wels (12.5 and 17.6 $\mu\text{g/g}$, respectively). In addition, for the total DDTs, the lowest mean concentration has been reported in roach with 3.7 $\mu\text{g/g}$ while carps and wels reach values of 20.6 and 37.0 $\mu\text{g/g}$. These results suggest a clear differentiation between trophic levels within the fish species inhabiting the Flix water reservoir. Those species with a more planctivorous and filtering diet have lower mean concentrations for all the OCs analysed while more omnivorous and larger fish species (carp and wels) reported the highest mean concentrations for all compounds including (HCB, total PCBs and total DDTs).

3.1.5 Bird eggs

One of the highest predators of the food web at Flix water reservoir is Purple heron. Eggs collected during the breeding season reported high values of some of the OCs. More volatile compounds such as chlorobenzenes and total HCHs had lower mean concentrations ranging from 0.04 to 0.3 $\mu\text{g/g}$. On the other hand, mean concentrations of total DDTs and PCBs were on the highest among all the trophic levels. Total DDTs mean concentration was 6.8 $\mu\text{g/g}$, only surpassed by zebra mussel and the two biggest fish species at the reservoir, carps and wels. The distribution, however, followed a completely different pattern from the previous ones. There is a strong predominance of *p,p'*-DDE, representing the 96% of DDT metabolites in this matrix. The other metabolites are in much lower concentrations. This is in accordance with other studies of bird eggs from different freshwater food webs (De Cruz et al., 1997; Fasola et al., 1998; Aurigi et al., 2000; Connell et al., 2003; Dong et al., 2004). Total PCBs had the highest concentration in this matrix. The mean concentration was 10.2 $\mu\text{g/g}$, at the same order of magnitude of those found for carps and wels. Following with the tendency of the top predators from the Flix water reservoir, the congeners profile was predominated by high chlorinated compounds such as PCB-138, PCB-153 and PCB-180. Contributions of these congeners were 27%, 26% and 29%, respectively (Fig 4). The more volatile congeners were scarcely found in those samples, following the same trend as chlorobenzenes and total HCHs.

3.2 Interaction between trophic levels and biomagnification factors (BMF)

Concerning overall mean concentrations of all OCs (PeCB, HCB, total DDTs and total PCBs), there is an increase of two orders of magnitude from plankton to top predators: 0.03 µg/g to 1.6 µg/g and 0.1 µg/g to 26.4 in carps for PeCB and HCB, respectively or from 0.03 µg/g to 37.0 µg/g and 0.03 µg/g to 17.6 µg/g in wels for total DDTs and total PCBs, respectively.

Dietary accumulation is often the dominant route of exposure for organic contaminants for aquatic organisms (Borga et al., 2004; Braune et al., 2005). The study of the biomagnification factors (BMF) has been developed based on the diet habits from organisms of different trophic levels. BMF were obtained dividing mean concentrations of each OCs found at each specie by the mean of the concentrations found in their preys. Biofilm has been the matrix with highest mean values for all OCs groups except for the total PCBs (wels had higher mean concentration). In the case of the Flix water reservoir, with a heavy polluted source of OCs, sediment and biofilm have been considered as the focal points of these compounds into the local food web. These two matrixes have not been used for the calculation of BMFs. Therefore, the first levels or primary producers of the freshwater food web at Flix would be plankton (phyto- and zooplankton) and macrophytes. Depending on their diet habits, primary consumers could be divided into two groups: the crustacean, with a more omnivorous feeding range including plankton and macrophytes; and the mollusks, clearly focused in a filtering feeding of plankton. Within fish, the three smallest species mosquitofish, roach and rudd also have been considered as primary consumers, feeding mainly on plankton and macrophytes although macroinvertebrates can be also in their diet (Kottelat and Freyhof, 2007). For the largest species or secondary consumers such as carps or wels different diet habits have been taken into consideration. Carps have an omnivorous diet that include a wide range of food including plankton, macrophytes and crayfish while wels, as a largest predator feed mainly on crayfish and smaller fish species such as mosquitofish, roach or rudd (Carol et al., 2009). On the top position of the food web, purple heron has the widest range of preys in their diet, including crayfish and zebra mussel in addition to their fish diet based on mosquitofish, roach and rudd.

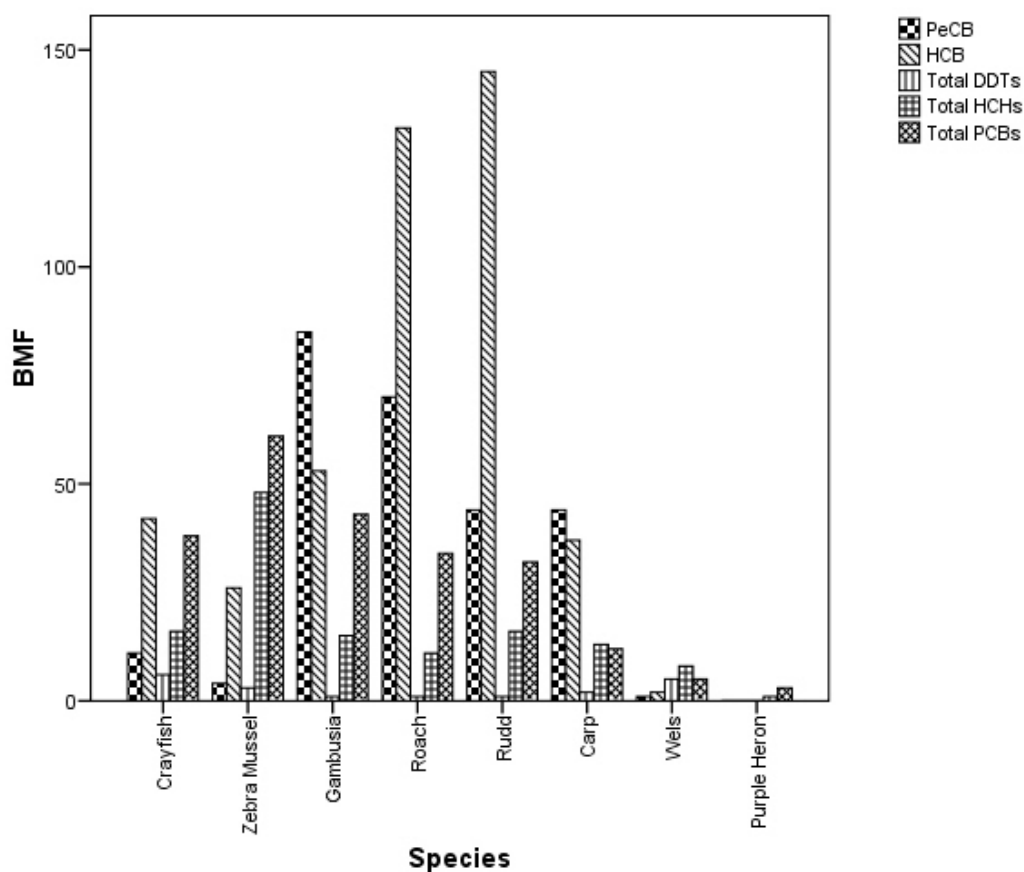


Figure 5. Biomagnification factors along the Flix water food web for PeCB, HCB, total DDTs, total HCHs and total PCBs.

Results based on BMF indicate a big increase in concentrations from the primary producers into primary consumers (including crustaceans, molluscs and smallest fish species) and then a decay in carps, wels and purple heron (Fig 5). For PeCB, highest BMFs were found at fish with values between 44 and 85 in mosquitofish, roach, rudd and carps. At higher positions on the trophic web such as wels and purple heron, these compounds were less bioaccumulated (BMF around 1). Trends in HCB were even more clear with huge BMFs at primary consumers in relation to top predators. BMFs found for HCB oscillated between 26 to 145 from zebra mussel to carps while in wels or purple heron, they scarcely reached a value of 2. For the total DDTs, the highest BMFs were found at zebra mussel and crayfish (48 and 16, respectively). They seem to be the species among the first consumers bioaccumulating more quantity of DDTs along the food web although all fish species reported BMFs between 8 and 16 for these compounds. Regarding total PCBs the trend is similar, with higher BMFs in primary consumers than in secondary ones. BMFs in crayfish, zebra mussel and primary consumers fish were between 32 and 61. On the other hand, in carps, wels and purple heron, these values were between 3 and 12, suggesting less biomagnification potential from their preys or a dilution factor due to their size in the case of wels (Copp et al., 2008). Although mean concentrations for almost all OCs were higher in top

predators in comparison with lower trophic levels (Table 1), tendencies found with the BMFs reflect an easier biomagnification process in primary consumers than in secondary consumers or predators because the last ones are ingesting heavy polluted preys without increasing their OCs concentrations accordingly.

4. Conclusions

The Flix water reservoir it is a unique site for the study of the distribution of OCs along a freshwater food web. The emissions and sediment loads from the chloro-alkali plant located nearby set a great platform for this kind of studies. Sediment and biofilm, as focal points of pollution for the local food web, indicated the presence of high concentrations for all the OCs inside the reservoir. Biofilm had statistically significant differences respect all other studied compartments for all OCs except total PCBs ($p=0.000$ for HCB and total DDTs and p values ranging from 0.000 to 0.001 for HCB; and from 0.000 to 0.003 for total HCHs). It has been found a clear trend in the increase of mean concentration from lower trophic levels (plankton and macrophytes) to top predators (carps and wels). Concentrations of OCs increased more than two orders of magnitude in those species reaching values up to 37 $\mu\text{g/g}$ for total DDTs in wels. HCB concentrations were also on the highest range of those reported anywhere with more than four fish species with mean concentrations above 8 $\mu\text{g/g}$. For total PCBs, specially the three top predators in the local food web were found with high concentrations between 10 and 18 $\mu\text{g/g}$ indicating strong biomagnification processes from the water column. The study of the BMFs suggested an easier increase in mean concentrations of all studied OCs in primary consumers in comparison with secondary ones or predators that are ingesting more polluted preys increasing slower their OCs concentrations.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Spanish Ministry of Environment and the Catalan Agency for Water Management (ACA). Assistance from the staff of the Natural Reserve of Sebes during sampling in Flix reservoir is thanked. All samples were collected under licence of the Departament de Medi Ambient (Catalan Government) and Parc Natural del Delta de l'Ebre. D.H. would like to thank the financial support received from the Spanish Ministry of Education (FPU, AP2007-01824).



References

- Amaral, O.C., Otero, R., Grimalt, J.O., Albaiges, J. 1996. Volatile and semi-volatile organochlorine compounds in tap and riverine waters in the area of influence of a chlorinated organic solvent factory. *Wat. Res.* 30, 1876-1884.
- Aurigi, S., Focardi, S. Hulea, D., Renzoni, A. 2000. Organochlorine contamination in bird's eggs from the Danube Delta. *Environ. Pollut.* 109, 61-67.
- Borga, K., Fisk, A.T., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G. 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2367–2385.
- Bosch, C., Olivares, A., Faria, M., Navas, J.M., del Olmo, I., Grimalt, J.O., Piña, B., Barata, C. 2009. Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry. *Aquatic Toxicol.* 94, 16-27.
- Braune, B.M., Outridge, P.M., Fisk, A.T., Muir, D.C.G., Helm, P.A., Hobbs, K., Hoekstra, P.F., Kuzyk, Z.A., Kwan, M., Letcher, R.J., Lockhart, W.L., Norstrom, R.J., Stern, G.A., Stirling, I. 2005. Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends. *Sci. Total Environ.* 351-352, 4-56.
- Brevik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C. 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners—a mass balance approach: 1. Global production and consumption. *Sci. Total Environ.* 90, 181–198.
- Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D., Ishaq, R. 2006. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Sci. Total Environ.* 366, 659-672.
- Carol, J., Benejam, L., Pou-Rovira, Q., Zamora, L. & García-Berthou, E. 2003. First record of white bream (*Abramis bjoerkna*) in Catalonia (Spain) and new introductions of exotic fish *Alburnus alburnus*, *Sander lucioperca* and *Silurus glanis* into Catalan river basins. *Bull. Inst. Cat. Hist. Nat.* 71, 135–136.
- Carol, J., Benejam, L., Benito, J., García-Berthou, E. 2009. Growth and diet of European catfish (*Silurus glanis*) in early and late invasion stages. *Fund. Appl. Limnol./Archiv für Hydrobiologie.* 174, 317-328.
- Catalan, J., Ventura, M., Vives, I., Grimalt, J.O. 2004. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4269-4275.
- Clark, K.E., Gobas, F.A., Mackay, D. 1990. Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1203–1213.

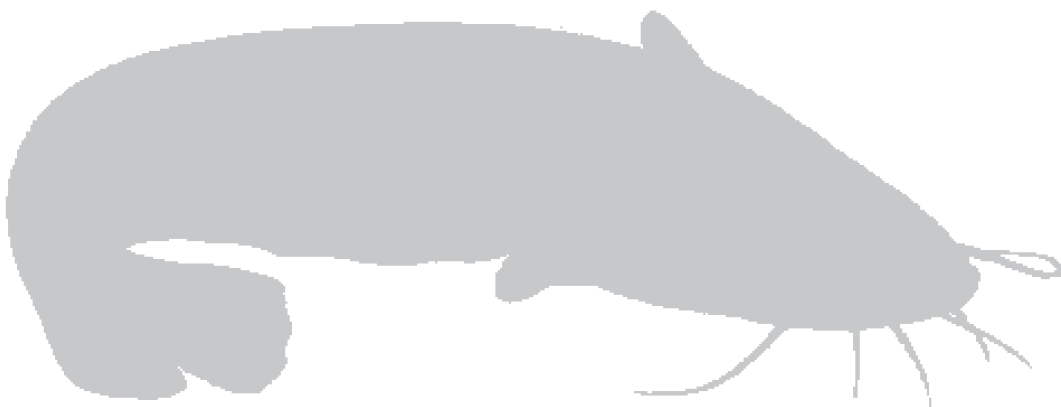
- Connell, D.W., Fung, C.N., Minh, T.B., Tanabe, S., Lam, P.K.S., Wong, B.S.F., Lam, M.H.W., Wong, L.C., Wu, R.S.S., Richardson, B.J. 2003. Risk to breeding success of fish-eating ardeids due to persistent organic contaminants in Hong Kong: evidence from organochlorine compounds in eggs. *Water Res.* 37, 459-467.
- Copp, G.H., Britton, J.R. Cucherousset, J., García-Berthou, E., Kirk, R., Peeler, E., Stakènas, S. 2008. Voracious invader or benign feline? A review of the environmental biology of European catfish (*Silurus glanis*) in its native and introduced ranges. *Fish and Fisheries.* 10, 1-31.
- Covaci, A., Gheorghe, A., Hulea, O., Schepens, P. 2006. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. *Environ. Pollut.* 140, 136-149.
- De Cruz, I., Mougin, C., Grolleau, G. 1997. Chlorinated hydrocarbons in eggs of Grey Heron (*Ardea cinerea*) in France (Lac de Grandlieu). *Chemosphere.* 5, 1003-1009.
- Dong, Y.H., Wang, H., An, Q., Ruiz, X., Fasola, M., Zhang, Y.M. 2004. Residues of organochlorinated pesticides in eggs of water birds from Tai Lake in China. *Environ. Geochem. Health.* 26, 259-268.
- Ebro's Hydrographic Confederation. Downloaded 2015. <www.chebro.es>. Basic Information. River Basin description.
- Erdogrul, O., Covaci, A., Schepens, P. 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaras, Turkey. *Environ Internacional.* 31, 703-711.
- Fasola, M., Movalli, P.A., Gandini, C. 1998. Heavy metal, organochlorine pesticide and PCB residues in eggs and feathers of herons breeding in Northern Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 87-93.
- Fernández, M.A., Alonso, C., González, M^a.J., Hernández, L.M. 1999. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere.* 38, 33-43.
- Fisk A.T., Hobson K.A., Norstrom R.J. 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environ. Sci. Technol.* 35, 732-738.
- Freyhof, J. & Kottelat, M. 2008. *Silurus glanis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 June 2015.
- Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W., Haffner, G.D. 1999. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environ. Sci. Technol.* 33, 133-141.
- Goerke, H., Eder, G., Weber, K., Ernst, W. 1979. Patterns of organochlorine residues in animals of different trophic levels from the Weser Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 10, 127-133.

- Garí, M., Bosch, C., Grimalt, J.O., Sunyer, J. 2014. Impacts of atmospheric chlor-alkali factory emissions in surrounding populations. *Environ Int.* 65, 1-8.
- Gerstenberger, S.L., Gallinat, M.P., Dellinger, J.A. 1997. Polychlorinated biphenyl congeners and selected organochlorines in Lake Superior fish, USA. *Environ. Contam. Toxicol.* 16, 2222-2228.
- Grimalt, J.O., Gómez-Belinchón, J.I., Llop, R., Albaigés, J. 1988. Water-phase distribution of hexachlorobenzene in a deltaic environment (Ebre Delta, Western Mediterranean). *Chemosphere.* 17, 1893-1903.
- Grimalt, J.O., Sánchez-Cabeza, J.A., Palanques, A., Catalan, J. 2003. Estudi de la dinàmica dels compostos organoclorats persistents i altres contaminants en els sistemes aquàtics continentals. Barcelona.
- Kottelat, M., Freyhof, J. 2007. Handbook of European Freshwater Fishes.
- Loganathan, B.G., Kannan, K., Watanabe, I., Kawano, M., Irvine, K., Kumar, S., Sikka, H.C. 1995. Isomer-specific determination and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls, polychlorinated/brominated dibenzodioxins and dibenzofurans, polybrominated biphenyl ethers, and extractable organic halogen in carp from the Buffalo River, New York. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1832-1838.
- Marsalek, P., Weiss, V., Kolečka, J. 2004. Chlorinated hydrocarbon residues in fish from Nové Mlýny reservoirs along Dyje River, Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno.* 73, 275-281.
- Metcalf, R.L. 1973. A century of DDT. *J. Agric. Food Chem.* 21, 511-519.
- Muñoz P. 1994. Alemanys a l'Ebre, La colònia química alemanya de Flix (1897-1994). El Mèdol. Tarragona. 171 p.
- Palanques, A., Grimalt, J.O., Belzunces, M., Estrada, F., Puig, P., Guillén, J. 2014. Massive accumulation of highly polluted sedimentary deposits by river damming. *Sci. Total Environ.* 497-498, 369-381.
- Salvadó J.A., Grimalt, J.O., López, J.F. 2012. Rapid and simplified method for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, lipid biomarkers and organochlorine compounds in marine settling particles. *Microchimica Acta.* 179, 131-139.
- Sapozhnikova, Y., Zubcov, N., Hungerford, S., Roy, L.A., Boicenco, N., Zubcov, E., Schlenk, D. 2005. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. *Chemosphere.* 60, 196-205.
- Svobodova, Z., Zlabek, V., Randak, T., Machova, Z., Kolarova, J., Hajslova, J., Suchan, P., Dusek, L., Jarkovsky, J. 2004. Profiles of PCBs in tissues of marketable Common Carp and bottom sediments from selected ponds in South and West Bohemia. *Acta Veterinaria Brno.* 73, 133-142.

- Wei, S., Wang, Y., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., So, M.K., Yueng, L.W.Y., Horii, Y., Chen, L.Q., Yu, H., Yamashita, N., Lam, P.K.S. 2008. Historical trends of organic pollutants in sediment cores from Hong Kong. *Mar. Poll. Bull.* 57, 758-766.
- Willet, K.L., Ulrich, E.M., Hites, R.A. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2197-2207.
- Winkels, H.J., Kroonenberg, S.B., Lychagin, M.Y., Marin, G., Rusakov, G.V., Kasimov, N.S. 1998. Geochronology of priority pollutants in sedimentation zones of the Volga and Danube delta in comparison with the Rhine delta. *Applied Geochemistry.* 13, 581-591.

Capítol 5

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS



En aquest capítol es fa una discussió conjunta dels resultats més rellevants de cada grup d'articles. En els articles que inclouen altres temàtiques i que s'ha participat en la part de l'estudi de compostos organoclorats es descriu exclusivament la discussió de resultats enfocada a aquesta part. La discussió d'aquest capítol també es complementa amb la inclusió d'altres resultats complementaris finalment no publicats per proporcionar una informació completa dels resultats obtinguts.

En el cas de l'embassament de Flix, el principal problema amb el que ens enfrontàvem a l'inici d'aquesta tesi doctoral era l'avaluació de l'abast de contaminació dins de l'ecosistema fluvial. Els compostos orgànics persistents es troben acumulats als fangs que s'han anat abocant i acumulant al marge dret del llit del riu Ebre al pas per aquesta localitat. Durant el darrer segle els abocaments s'han produït de forma més o menys continua i la bossa de sediments que s'ha generat té unes concentracions molt elevades d'alguns dels principals grups de COPs.

5.1 Determinació dels COPs als nivells inferiors de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix

Per saber com ha influït aquesta contaminació a la resta de la xarxa tròfica, s'ha començat avaluant quin efecte ha generat als organismes que ocupen els primers nivells tròfics dins de l'embassament de Flix (apartat 4.1.1). Ja se sabia que en els sediments hi havia concentracions de COPs molt altes. Per tant, era important estudiar què passava amb la resta de matrius que ocupen els nivells baixos de la cadena alimentària i veure quina influència podien tenir en el transport vertical fins als consumidors secundaris i depredadors superiors.

Per estudiar la contaminació local dins de l'embassament de Flix, l'ús del musclo zebra (*Dreissena polymorpha*) ha presentat varis avantatges. En primer lloc, en tractar-se d'una espècie invasora no hi ha el risc de reduir-ne la població i provocar afectacions a l'ecosistema aquàtic. A més, la seva presència a l'embassament és força elevada i es pot aconseguir força volum de mostra. D'altra banda, en ser una espècie sèssil, es poden usar els resultats obtinguts com a primer pas per comprovar si aquesta espècie pot servir com a biomonitor en aigües fluvials terrestres contaminades. Això ja es fa amb els seus parents marins a partir del programa "The Mussel Watch", que s'ha anat implantant a diferents regions del planeta (Goldberg et al., 1978; Risebrought et al., 1983; O'Connor et al., 1998; Tanabe et al., 2000; Boonyatumanond et al., 2002; Kim et al., 2002; Khaled et al., 2004; Pan et al., 2007; Pikkarainen et al., 2007). En aquest cas, els valors mitjans de tots els compostos analitzats segueixen el mateix patró, amb l'excepció dels HCHs. Les concentracions augmenten des del punt de recollida de mostres situat aigües amunt de l'embassament de Flix fins arribar al punt situat just al costat dels sediments

contaminats. Els increments més elevats, en proporció, es donen per als PeCB i HCB, i en canvi per a la suma de DDTs i PCBs els augments no són tan acusats (Taula 1, apartat 4.1.1).

A més, l'anàlisi de les mostres segons la mida mostra que entre els individus més grans (>20 mm) es compleix aquesta tendència de creixement de concentracions de COPs, des del punt aigües amunt fins al punt situat just passats els fangs contaminats. Això s'observa amb tots els grups de contaminants estudiats (PeCB, HCB, DDTs, HCHs i PCBs). Al grup d'individus mitjans (10-20 mm) es troben les mateixes tendències però amb l'excepció de la suma de HCHs, que és major al punt aigües amunt en comparació amb el punt intermedi. A més, amb l'estudi de les concentracions de COPs en musclos zebra de diferents mides s'ha constatat que independentment del punt de mostreig les concentracions de tots els COPs s'incrementen a mesura que disminueix la mida. Això és coherent amb els resultats trobats per mercuri en un estudi similar (Carrasco et al., 2008).

La distribució general dels COPs a les mostres de musclo zebra analitzades indica que l'efecte dels residus tòxics acumulats a l'embassament de Flix és més important a mesura que ens acostem a la planta clor-àlcali. Aquesta tendència és més important just aigües avall degut a l'arrossegament de partícules per la pròpia dinàmica del riu. Com que els musclos zebra de les mides més grans poden tenir una edat que oscil·la entre els 4 i 6 anys, els resultats mostren que potser s'ha anat produint un transport progressiu riu avall dels contaminants acumulats a l'embassament.

Finalment, els resultats trobats a les mostres de cranc de riu americà han demostrat que a la zona de Riba-roja les concentracions de tots els grups de COPs estudiats són molt baixes (< 1 ng/g). Això confirma aquesta localitat com un bon punt de mostreig per emprar com a blanc de camp. Només s'han pogut quantificar concentracions molt baixes per a la suma de DDTs i sempre properes als límits de detecció i quantificació.

A les mostres d'aquesta espècie recollides dins de l'embassament de Flix, en el marge de la reserva els principals grups de contaminants trobats han estat l'HCB, la suma de PCBs i la suma de DDTs, amb concentracions mitjanes de 14 ng/g, 12 ng/g i 9 ng/g, respectivament (Taula 1, apartat 4.1.1). Aquests valors són del mateix ordre de magnitud que els trobats en altres estudis d'aquesta espècie (0.1-67 ng/g a Holmqvist et al., 2007; i 10-20 ng/g a Schilderman et al., 1999). A nivell individual s'ha observat que hi ha algunes mostres d'aquesta zona que tenen concentracions més altes d'HCB i suma de PCBs principalment, tot arribant a concentracions màximes de 85 ng/g i 39 ng/g, respectivament. En canvi, en el marge de la fàbrica clor-àlcali, les concentracions més altes s'han trobat per a la suma de DDTs. Aquestes són encara més altes

que les concentracions de la suma de PCBs i l'HCB. Les concentracions mitjanes són significativament diferents en comparació amb les del marge de la reserva perquè totes elles superen els 40 ng/g. En general les concentracions són entre 3 i 8 vegades més altes, en mitjana, al marge de la fàbrica. En el cas de l'HCB les concentracions es multipliquen per 3, mentre que per a la suma de PCBs aquest valor arriba a ser 4 vegades més gran. De totes formes, els compostos que presenten majors diferències són els que conformen la suma de DDTs, que són fins a 8 vegades més grans a les mostres del marge de la fàbrica en comparació amb les mostres del marge de la reserva.

S'observen diferències clares en les concentracions de tots els grups de contaminants estudiats entre les mostres de l'embassament de Flix (independentment del marge) i les analitzades a Riba-Roja i Xerta. L'única excepció es troba pel total de HCHs a les mostres de cranc de riu.

Tot i que finalment no es van publicar a l'article, s'estudià l'abundància relativa dels DDTs, HCHs i PCBs. Els patrons de distribució dels diferents grups de contaminants estudiats indiquen que a les zones allunyades del focus de contaminació (Riba-Roja i Xerta) el metabòlit predominant de la suma de DDTs és el *p,p'*-DDE. Això suggereix que existeix una metabolització, per part dels crancs de rius, del contaminant original *p,p'*-DDT quan no hi ha aportacions recents d'aquest compost. A l'embassament de Flix, en canvi, la distribució dels compostos de DDT es diferent. Existeixen concentracions similars per als tres metabòlits principals (*p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE i *p,p'*-DDD), que suggereixen que aquests organismes estan tenint contacte recent amb material contaminat amb *p,p'*-DDT.

A totes les localitats es manté el mateix patró en relació a la distribució dels isòmers dels HCHs. Hi ha un clar predomini de l'isòmer γ -HCH (lindà) a totes les mostres, tot i que les concentracions són molt baixes (< 2 ng/g). Això és coherent amb el tipus d'alimentació omnívora i sobretot detritívora que segueix el cranc de riu americà, ja que el plàncton de la columna d'aigua conté major concentració d'aquest isòmer (més soluble en aigua), i per tant una distribució d'aquest estil vindrà marcada, probablement, pels seus hàbits alimentaris. En aquells individus amb els valors més alts de lindà s'ha pogut quantificar també un altre isòmer: el β -HCH, però amb concentracions menors.

Per últim, la distribució dels congèneres de PCBs mostra que hi ha un predomini d'aquells compostos més volàtils. Sobretot dins de l'embassament de Flix. Aquesta diferència també es pot justificar potser amb els hàbits alimentaris. Els compostos més lleugers probablement es poden bioacumular millor amb la seva dieta, perquè són compostos més solubles que els congèneres més pesats. Aquesta distribució no concorda amb altres estudis on la presència dels

PCBs hexaclorats era majoritària (Shilderman et al 1999). Donat que aquesta distribució es repeteix en totes les localitats analitzades, en una segona hipòtesis es pot plantejar que tinguin un mecanisme per detoxificar o evitar la bioacumulació els PCBs més pesats.

En general no s'han trobat grans diferències en els patrons de bioacumulació per a cada una de les dues espècies i per tant, ambdues poden patir efectes potencialment negatius semblants. L'estudi estadístic de les dades ha demostrat que existeix un increment de l'estrès tòxic des de les zones aigües amunt (Riba-Roja) en direcció a l'embassament contaminat de Flix i aigües avall (Meandre). A més, aquesta tendència també es pot observar entre les mostres capturades a la banda de la reserva dins de l'embassament en comparació amb aquelles mostres analitzades de la banda on se situen els fangs contaminats (on s'hi troba la fàbrica clor-àlcali).

5.2 Determinació de COPs en peixos del tram baix del riu Ebre (de Mequinensa al Delta)

Dins de l'embassament de Flix s'han estudiat 5 espècies de peixos amb hàbits alimentaris diferents i per tant situats a diferents nivells dins de la xarxa tròfica fluvial. D'aquesta forma els resultats obtinguts permeten estudiar la bioacumulació de COPs segons l'espècie (apartat 4.2.2).

Els silurs (*Silurus glanis*) estudiats de l'embassament de Flix s'han capturat en dues estacions diferents (hivern i estiu). Les concentracions dels individus de l'hivern són força heterogènies (Taula 2, apartat 4.2.2). S'han trobat resultats que oscil·len entre concentracions molt baixes (1.3; 0.1 i 1.1 ng/g en pes fresc per la suma de DDTs, HCHs i PCBs, respectivament) i concentracions molt altes (700; 9.5 i 461 ng/g en pes fresc per la suma de DDTs, HCHs i PCBs, respectivament). Els resultats totals dels DDTs superen àmpliament les concentracions mitjanes de DDTs trobades en altres estudis (54 ng/g a Erdogul et al. 2005) tot i que els marges (mínims i màxims) són similars en ambdós estudis. Els valors elevats concorden amb què és una espècie depredadora que bioacumula els COPs a través de la seva dieta dins de la xarxa tròfica del seu entorn, però el fet de trobar també concentracions tan baixes en alguns individus demostra que la variabilitat intra-específica pot ser molt important.

En relació al conjunt de PCBs també s'han trobat concentracions molt altes als silurs de l'embassament. En aquest cas, els valors són més alts que en altres estudis (rang de 0.39-42 ng/g a Erdogul et al., 2005), tot comparant entre grups de COPs, s'observa un predomini molt clar de la suma de DDTs sobre la suma dels PCBs i l'HCB. Les concentracions totals de HCHs i de PCEs són molt baixes. Els nivells d'HCB de les mostres més contaminades també són molt

elevats, en els silurs superen a quasi tots els congèneres dels PCBs individualment. Això s'explica per la concentració alta d'aquest compost en els residus emmagatzemats als fangs de l'embassament que arriba a ser, en mitjana, fins un 50% del total de compostos organoclorats estudiats als sediments contaminats.

Els metabòlits del DDT es distribueixen de forma diferent segons les mostres. En alguns casos hi ha valors predominants dels metabòlits *o,p'*-DDE i *p,p'*-DDE que conformen més del 75% de la suma dels DDTs, però a la majoria de mostres s'observa un predomini major dels metabòlits dels DDDs i DDTs, tot arribant aquests últims fins a valors de 25-30% en algunes mostres. Això indica una aportació relativament recent del compost parental (*p,p'*-DDT) tot i es trobi un major percentatge dels seus metabòlits (DDEs i DDDs). La distribució dels congèneres dels PCBs segueix el patró més comú, amb concentracions més elevades dels congèneres més pesats (PCB-153, PCB-138, PCB-180). Finalment, un 55% de les mostres tenen els quatre isòmers d'HCHs analitzats en aquest estudi. L'isòmer predominant és el δ -HCH, seguit del β -HCH, amb concentracions mitjanes de 2.9 i 0.9 ng/g, respectivament. De totes formes, tot considerant la concentració mitjana de totes les mostres, la suma total d'HCHs té un valor de 3.3 ng/g, i confirmen que no és un dels COPs més importants en els silurs. La distribució dels PCEs té un patró molt marcat amb un clar predomini de l'OCE per sobre del conjunt de HxCEs.

La comparació de les mostres de silur capturades a l'estiu en relació amb les d'hivern mostra que les primeres són més baixes per a tots els grups de contaminants analitzats en aquest treball. L'HCB és l'únic que manté concentracions del mateix ordre de magnitud amb uns valors d'entre 3 i 140 ng/g a l'estiu (nq-64 ng/g per les mostres d'hivern). Aquestes concentracions són molt més altes que les trobades en altres estudis on s'ha emprat aquesta espècie (Covaci et al., 2006; Erdogru et al., 2005; Galassi et al., 1994). En canvi, per la suma de DDTs i PCBs el marge de valors és molt menor (17-77 ng/g i 9-47 ng/g, respectivament). Aquestes concentracions són molt més baixes que les trobades en les mostres de l'hivern. Amb aquest resultat es demostra novament que existeix una gran variabilitat entre individus, independentment de l'època de presa de mostra. En el cas de les mostres de silur capturades a l'estiu, les concentracions de DDTs i PCBs són del mateix ordre de magnitud que les d'altres estudis (Erdogru et al., 2005). En promig hi ha una concentració major d'HCB (39 ng/g) per sobre de la suma de DDTs i PCBs (32 i 18 ng/g, respectivament). Això es podria explicar per una certa volatilització de l'HCB a temperatures més elevades i cabdal del riu menor. En el 78% dels individus s'ha trobat que els DDEs són majoritaris mentre que en el 22% restant hi ha més DDTs. Això concorda amb els anàlisis realitzats a les mostres de l'hivern. Pel que fa a la suma dels HCHs, les concentracions continuen sent molt baixes per tots els individus (al voltant d'1 ng/g). Només s'han pogut quantificar al 78% de les mostres i amb la presència d'un únic isòmer

(δ -HCH). D'aquesta forma no es troben concentracions que comporten toxicitat d'aquest grup de contaminants en cap de les mostres analitzades durant l'estiu. Les concentracions de PCEs són una mica més altes que les trobades a les mostres de l'hivern però representen menys del 15% del total de COPs estudiats. La distribució dels diferents congèneres segueix el mateix patró que el trobat a les mostres de l'hivern. Aquesta tendència és exactament igual pel conjunt de PCBs. Es continua observant una major concentració dels congèneres menys volàtils per sobre dels més lleugers.

L'anàlisi de COPs a les carpes (*Cyprinus carpio*) ha permès observar unes concentracions molt altes d'HCB a la majoria de mostres, amb valors superiors a la suma de DDTs i PCBs tant a les mostres capturades a la primavera com a les de l'estiu. Les concentracions mitjanes de les mostres capturades a la primavera han estat 326 ng/g, 290 ng/g i 148 ng/g, respectivament (Taula 2, apartat 4.2.2). Aquests valors són molt alts i superiors als trobats en altres estudis (14 ng/g i 1 ng/g per la suma de DDTs i PCBs, respectivament a Erdogru et al., 2005), tot i que són menors que en algunes localitats molt contaminades dels Estats Units d'Amèrica on s'han trobat concentracions superiors a 300 ng/g per la suma de DDTs i 2000 ng/g per la suma de PCBs (Buffalo River, NY; Loganathan et al., 1995). En el cas de l'HCB, les concentracions tan elevades que s'han trobat a totes les mostres es poden explicar per la seva dispersió important a través de la via atmosfèrica que facilita una transferència afegida de contaminants en aquesta zona del riu a part de la seva aportació directa a partir dels sediments contaminats. Bosch (2009) va posar de manifest que en una àrea de dos quilòmetres al voltant de la fàbrica clor-àlcali de l'embassament de Flix existeix una forta aportació d'aquest compost per via atmosfèrica.

A les mostres de primavera s'ha trobat un major percentatge de metabòlits dels DDDs en relació amb els DDEs i DDTs. Això es pot explicar per dos aspectes que es troben molt relacionats. En primer lloc perquè els sediments submergits durant llargs períodes de temps poden donar lloc a ambients anaeròbics importants que afavoreixen la transformació del DDT a DDD en lloc de DDE, com es donaria en condicions anaeròbiques (Metcalf, 1973). Per tant, en una espècie tan bentívora, la seva dieta consisteix majoritàriament en aliment situat directament sobre el sediment contaminat i per això poden bioacumular concentracions tan elevades dels metabòlits del DDD mitjançant la dieta (Covaci et al., 2006).

Les concentracions totals de HCHs i PCEs són molt baixes (com en el cas dels silurs) amb unes mitjanes de 4.1 i 55.4 ng/g, respectivament. Aquests valors són més alts que els trobat als silurs de l'embassament de Flix i a més, la gran diferència entre ambdues espècies es manifesta a la distribució d'isòmers d'HCHs, ja que a les carpes els isòmers predominants són el α -HCH i el β -HCH.

En relació a la distribució de congèneres de PCBs no s'ha trobat una diferència tan clara com en el cas del silur entre les concentracions dels congèneres més pesats per sobre dels més volàtils. De fet en un 21% de les mostres el congènere majoritari és el PCB-28 (força volàtil). Tot analitzant les concentracions mitjanes de cada congènere s'han trobat uns valors molt similars (24 ng/g, 27 ng/g, 29 ng/g i 23 ng/g per als PCB-28, PCB-138, PCB-153 i PCB-180, respectivament). En aquest cas tot indica que el tipus d'alimentació (ben diferent a la del silur) possiblement facilita l'acumulació d'aquells congèneres menys volàtils (a través de la dieta) d'igual forma que els més pesats acumulats al sediment.

Les 14 mostres analitzades durant la campanya d'estiu tenen concentracions mitjanes molt semblants a les de primavera. En general s'observen concentracions molt altes per a l'HCB i la suma de DDTs, amb mitjanes de 275 ng/g i 129 ng/g, respectivament. En aquest conjunt de mostres encara s'observa de forma més clara la presència majoritària de l'HCB, perquè en el 86% de les carpes s'ha trobat en concentracions més altes que la suma de DDTs o PCBs. La concentració màxima ha estat de 700 ng/g i fins i tot s'ha arribat a trobar una concentració mitjana de PeCB de 24 ng/g. Els grups següents més importants són els PCEs i PCBs amb unes concentracions totals mitjanes de 140 ng/g i 100 ng/g, respectivament. Aquests valors es troben un ordre de magnitud per sota que les concentracions trobades en zones molt contaminades (però a partir de l'estudi d'una altra espècie) (1450 ng/g pels PCBs totals en salmons del Llac Michigan, EEUU (Manchester-Neesvig et al, 2001)).

La distribució de metabòlits del DDT manté el predomini dels DDDs per sobre dels DDEs i DDTs, tot i que el metabòlit predominant a nivell individual a gairebé totes les mostres és el *p,p'*-DDE (Goerke et al., 1979). Les concentracions d'HCHs són lleugerament inferiors en comparació amb les concentracions trobades a les carpes de primavera però la distribució d'isòmers segueix amb el mateix patró. La distribució de PCEs també segueix la mateixa distribució que a les mostres anteriors (silurs i carpes de la primavera). Finalment, en el 21% de les carpes recollides a l'estiu el PCB-28 també és el congènere majoritari, per sobre d'altres compostos menys volàtils com els PCB-138, PCB-153 o PCB-180. De totes formes les concentracions mitjanes són similars entre congèneres, al voltant dels 20 ng/g. Hi ha estudis que indiquen que els compostos menys hidrofòbics tenen una major entrada als organismes a través de l'aigua (Moermond et al., 2004). Com que s'han trobat compostos menys pesats entre els acumulats en els organismes de la part baixa de la xarxa tròfica, la incorporació d'aquests compostos per la dieta podria explicar aquestes distribucions en el cas de les carpes.

Els resultats obtinguts en els rutils (*Rutilus rutilus*) continuen amb el mateix patró que a les carpes però amb concentracions més baixes pels principals grups de COPs estudiats (Taula 2, apartat 4.2.2). Les concentracions més altes s'han trobat per a l'HCB amb un marge ampli (25-614 ng/g). En segon lloc la suma de DDTs té valors d'entre 14 i 169 ng/g mentre que per la suma de PCBs, la concentració mitjana és menor i el rang de valors oscil·la entre 10 i 260 ng/g. L'HCB ha mostrat un cert predomini, essent el COP individual amb major concentració en el 67% de les mostres (especialment amb 2 mostres que tenen unes concentracions molt elevades d'aquest compost). Les concentracions mitjanes són de 260 ng/g, 95 ng/g i 82 ng/g, respectivament. En conjunt, el grup amb la concentració mitjana més alta ha estat el dels PCEs, amb una concentració mitjana de 350 ng/g.

El patró dels metabòlits dels DDTs continua mostrant que les concentracions dels DDDs són majors a la resta, tot i que individualment en un 66% de les mostres la concentració més alta és per al *p,p*-DDE. A més, cal destacar que s'ha trobat en totes les mostres el metabòlit *p,p'*-DDT, fet que suggereix una ingestió relativament recent d'aquest compost, ja sigui a través de la dieta de petits organismes o pel contacte directe amb els sediments acumulats a l'embassament. En aquesta espècie, només s'ha trobat un isòmer dels HCHs en el 100% de les mostres (β -HCH). També s'han trobat concentracions properes al límit de detecció per al lindà. La mitjana d'ambdós compostos, però només és de 0.7 ng/g, és a dir concentracions molt petites i efectes tòxics molt baixos pels organismes aquàtics. D'igual forma que a la resta d'espècies, la distribució dels PCEs continua dominada pel OCE i els HxCEs. Finalment el patró dels PCBs confirma la tendència a trobar concentracions més altes dels congèneres més volàtils davant els més pesats. Així en el 100% de les mostres, el congènere amb una major concentració és el PCB-28, amb una concentració mitjana de 23 ng/g. En sumar les concentracions mitjanes dels 3 congèneres més volàtils (PCB-28, PCB-52 i PCB-101) s'ha trobat un valor de 44 ng/g. Aquest és més alt que la suma de concentracions mitjanes dels 3 congèneres més pesats (PCB-138, PCB-153 i PCB-180), que és de 34 ng/g. Tot indica que aquesta espècie té facilitat per bioacumular compostos menys clorats de l'ambient ja que el seu aliment no presenta concentracions molt altes dels compostos més pesats.

Les mostres de gardí (*Scardinius erythrophthalmus*), espècie similar al rutil, han permès corroborar les tendències apuntades per aquella espècie. Les concentracions mitjanes més altes per un únic compost s'observen per a l'HCB (màxim de 486 ng/g) mentre que les concentracions màximes per a la suma de DDTs i PCBs són de 240 ng/g i 260 ng/g, respectivament (Taula 2, apartat 4.2.2). En el 65% de les mostres es troba més HCB que qualsevol altre COP, i en el 35% restant la suma de DDTs és la majoritària. De totes formes, la

concentració mitjana més alta torna a ser per als PCEs, d'igual forma que pel rutil, amb una mitjana de 410 ng/g.

La distribució dels metabòlits de DDT mostra que el 90% de les mostres tenen el *p,p'*-DDE com a metabòlit principal i el 60% tenen concentracions més altes dels metabòlits de DDDs en relació als DDEs. La concentració mitjana de la suma d'HCHs és inferior a la resta d'espècies (0.6 ng/g) i només s'ha trobat algun isòmer en el 70% de totes les mostres. D'aquestes, en el 95% s'ha trobat l'isòmer β -HCH, mentre que en el 5% restant només s'ha trobat lindà a concentracions inferiors. Un cop més, la distribució de PCEs continua amb la mateixa tendència, tot mostrant que el seu congènere més clorat es troba present en major mesura a totes les espècies. En relació als PCBs, en aquest cas però, només en el 40% de les mostres s'ha trobat el PCB-28 com a congènere majoritari. A la resta de mostres el congènere amb major concentració sempre és el PCB-153. De totes formes, les concentracions mitjanes dels compostos més volàtils (23 ng/g) són molt semblants a les trobades pels compostos més pesats (28 ng/g).

Per últim, dins de l'embassament de Flix també s'han capturat i analitzat 20 individus d'una espècie de peix molt més petita que les anteriors: la gambúsia (*Gambusia holbrooki*). En aquest cas, degut a la mida de l'espècie no s'han analitzat només els teixits musculars sinó l'individu complet i per això s'han obtingut valors més elevats del contingut de lípids i en alguns casos de les concentracions de COPs.

La concentració mitjana més alta, amb diferència, s'observa pels PCEs en aquesta espècie, amb una mitjana de 2400 ng/g (Taula 2, apartat 4.2.2). Això confirma la tendència en la presència d'aquests compostos en aquelles espècies més petites. De totes formes, en aquest cas s'ha estudiat el peix complet, donant lloc a diferències clares en el patró de distribució dels congènere d'aquest grup, amb més presència dels HxCEs en comparació al OCEs. L'anàlisi de les concentracions mitjanes dels tres grans grups de COPs, mostra que els valors més alts són per la suma de DDTs, seguits pels PCBs i en darrer lloc l'HCB. Les concentracions mitjanes han estat de 270 ng/g, 245 ng/g i 200 ng/g, respectivament. De totes formes, els valors màxims segueixen un ordre diferent amb la suma dels PCBs al capdavant (530 ng/g), l'HCB en segon lloc (510 ng/g) i la suma de DDTs al final (440 ng/g). Cal destacar que en aquesta espècie, la concentració mitjana de PeCB són les més altes de totes les espècies estudiades (55 ng/g). A més, en el 60% de les mostres el grup predominant és la suma de DDTs, en el 20% és la suma de PCBs i a l'altre 20% és l'HCB.

El metabòlit predominant en el 95% de les mostres és el *p,p'*-DDE. Només en una mostra s'observa una major concentració de *p,p'*-DDD. En aquest cas, el conjunt de DDDs només es troba en concentracions més altes que els DDEs en el 25% de les mostres. A la resta, les concentracions de DDEs són més grans. Això suggereix que aquesta espècie que és més pelàgica que les anteriors i amb una alimentació més enfocada als invertebrats petits i plantes de la superfície, no es veu tan afectada pels sediments de forma directa. La suma d'HCHs té una concentració mitjana del mateix ordre de magnitud que a la resta d'espècies analitzades dins de l'embassament, amb un valor de 2.5 ng/g. Els isòmers predominants són el β -HCH i el δ -HCH amb concentracions mitjanes de 2.2 ng/g i 1.3 ng/g, respectivament. El primer s'ha trobat en el 75% de les mostres mentre que el segon només s'ha trobat en el 50% d'elles. En relació als PCBs, només el 15% tenen com a congènere majoritari el PCB-28, per sobre dels més pesats. A la resta de mostres, el congènere majoritari és el PCB-153. Cal destacar que les concentracions totals dels PCBs són molt altes a totes les mostres superant sempre els 150 ng/g. Els congèneres més pesats tenen concentracions més altes (32 ng/g, 60 ng/g i 32 ng/g pels PCB-138, PCB-153 i PCB-180, respectivament) que els volàtils (37 ng/g, 26 ng/g i 29 ng/g pels PCB-28, PCB-52 i PCB-101, respectivament).

De les 5 espècies de peixos analitzades dins de l'embassament de Flix, s'han comparat les concentracions mitjanes dels sis grups principals de COPs. Per fer això s'han agrupat les mostres per espècie per realitzar la mitjana (sense considerar en quina època o estació van ser capturades). D'aquesta forma s'han pogut estudiar les concentracions en aquesta localitat contaminada amb els fangs de la planta clor-àlcali.

Per al PeCB, DDTs, PCBs i PCEs totals, les concentracions mitjanes més altes s'observen a les mostres de gambusia. En el cas d'aquesta espècie s'ha analitzat l'individu complet i per tant aquests valors més alts es poden explicar per aquest motiu, ja que en l'anàlisi s'han inclòs òrgans com el fetge (altament lipídic), que poden acumular grans quantitats de COPs. En relació a les altres 4 espècies de les que s'ha estudiat només els teixits musculars, la carpa és la que bioacumula concentracions més altes d'HCB, suma de DDTs i suma de PCBs, amb concentracions mitjanes superiors a 100 ng/g en tots els casos. Els rutils, en canvi, són els que tenen major concentració mitjana de PeCB amb un valor similar al trobat a les carpes. Això indica que la carpa sembla ser l'espècie que conté concentracions més altes dels grups de COPs principals.

En general, les dues espècies situades en posicions més altes de la xarxa tròfica (silur i carpa) són les que presenten concentracions més altes d'aquells grups de compostos que contenen alguns metabòlits o congèneres menys volàtils (suma de DDTs i suma de PCBs). Això és

coherent amb una biomagnificació mitjançant la dieta que permet acumular aquests compostos menys solubles en el medi ambient. En canvi el PeCB i l'HCB, molt més volàtils, es troben en concentracions més altes als rutils i gardins en comparació amb els silurs. Això es pot explicar perquè aquests compostos que són molt més solubles són més fàcils de bioacumular directament del medi (via aèria o aquàtica (Moermond et al., 2004)) per organismes situats a la part més baixa de la xarxa tròfica. Com que tant rutils com gardins s'alimenten d'aquests organismes, poden bioacumular en major mesura aquests compostos.

De totes formes, les concentracions mitjanes descrites per totes les espècies són molt altes per tots els grups de COPs principals estudiats, tot mostrant que existeix una gran influència dels sediments contaminats i acumulats a la llera del riu dins de l'embassament de Flix. La interacció diària d'aquests organismes amb els sediments i la fauna que hi habita provoca que s'acumulin concentracions més altes de COPs als teixits musculars dels organismes superiors.

En quant a la distribució de metabòlits del DDT es pot afirmar que és molt similar a les quatre primeres espècies (silur, carpa, rutil i gardí), perquè totes tenen concentracions mitjanes més altes pel conjunt de DDDs per sobre dels DDEs. En canvi, a les gambusies, són els DDEs els que tenen concentracions mitjanes superiors als DDDs. Això es pot explicar per dos motius: en primer lloc pel fet d'analitzar l'individu complet, ja que això permet extreure els compostos presents a tot l'organisme. D'aquesta forma, aquells òrgans on es produeix una major metabolització dels DDTs a DDEs també s'inclouen en l'anàlisi. En segon lloc hi ha l'efecte dels hàbits de l'espècie, ja que en ser molt més petita que les anteriors, acostuma a viure prop dels marges del riu i no s'acostuma a alimentar de la zona bentònica (i més anòxica). Per tant també és coherent amb una menor presència de DDDs.

La composició dels isòmers de l'HCH és diferent segons l'espècie estudiada. A les dues espècies més grans (silur i carpa) s'han trobat tots els isòmers. De totes formes, en el conjunt de totes les espècies només s'ha trobat de forma consistent l'isòmer β -HCH. Això és coherent amb altres estudis que han demostrat la seva major presència als organismes aquàtics ja que té un factor de bioconcentració més alt i és més persistent que la resta d'isòmers (Willet et al., 1998). D'altra banda, a les espècies més petites i d'alimentació menys bentònica també apareix (a part de l'isòmer beta) el lindà (γ -HCH), que és més soluble en aigua. De totes formes, en general, a totes les espècies les concentracions mitjanes són força baixes i mai superen els 3 ng/g pel total d'HCHs. Aquests resultats són comparables als descrits en altres localitats (Dodder et al., 2002).

En quant a la distribució dels PCEs, s'ha trobat una tendència molt clara i diferent entre les mostres de teixit muscular analitzades en comparació amb els individus sencers. Totes les

espècies excepte la gambusia tenen concentracions més altes d'OCEs que HxCEs, mentre que en aquesta espècie, hi ha un predomini clar d'aquest darrer grup, tot arribant a representar més del 95% del total de PCEs. En conjunt, l'estudi ha permès trobar que existeixen diferències entre espècies no només per la seva posició dins de la xarxa tròfica sinó també pels seus hàbits alimentaris. Finalment, la comparació de la distribució de congèneres de PCBs ha mostrat un patró general semblant a totes les espècies amb alguns detalls diferenciadors. Les concentracions dels compostos més volàtils (PCB-28, PCB-52 i PCB-101) solen ser més baixes que les dels més pesats (PCB-138, PCB-153 i PCB-180). L'excepció s'ha trobat amb el rutil, on el congènere amb major concentració és el PCB-28. A més, tant al rutil com al gardí, la concentració d'alguns congèneres més pesats es redueix. Això es pot explicar bàsicament pel tipus d'alimentació d'ambdues espècies, ja que a diferència de la carpa i el silur, s'alimenten de plantes aquàtiques i petits invertebrats. Cal destacar que la gambusia també presenta les concentracions més altes per aquest grup de compostos com a conseqüència d'haver-se analitzat el peix complet, tot i que el patró de distribució és igual que a les altres espècies.

L'efecte del transport de contaminants aigües avall s'ha avaluat bàsicament amb l'espècie depredadora més gran (silur), que en teoria havia de tenir concentracions més altes per la majoria de COPs (apartat 4.2.1). A part dels resultats descrits en els peixos de l'embassament de Flix, s'han analitzat mostres de teixit muscular de diversos individus capturats en diferents punts situats en el darrer tram del riu Ebre, des de l'embassament de Riba-Roja (situat aigües amunt de Flix) fins a la zona de Deltebre. Per complementar aquests resultats, s'han afegit les discussions complementaries que s'han extret de l'estudi d'unes altres dues espècies (carpa i rutil) en algunes de les localitats en que s'ha recollit mostra de silur (Taula 1, supplementary information, apartat 4.2.2).

L'anàlisi de l'efecte de la longitud o el pes en l'acumulació de compostos organoclorats ha demostrat que no existeix una correlació positiva entre aquestes variables i les concentracions de COPs. La dieta d'aquests grans depredadors no es basa exclusivament en grans peixos. La gran abundància de cranc de riu al tram baix del riu Ebre permet que aquesta sigui la presa predominant en bona part dels individus. El percentatge de lípids és significativament diferent entre les mostres del curs fluvial i les del canals, possiblement degut a l'activitat que tenen els diversos individus segons la zona on habiten, ja que els fluxos de corrents són diferents a la llera del riu que a les aigües dels canals. D'aquesta forma, a les localitats amb menys intensitat de corrent d'aigua els silurs tenen majors concentracions de lípids i poden acumular més COPs si tenen més lípids, indicant una estructura tròfica més propera a un estat d'equilibri. D'altra banda, els silurs que habiten zones amb més corrent, com la llera del riu, han de ser més actius i contenen menys quantitat de lípids. Això fa que l'acumulació de COPs no estigui tan lligada a la

xarxa tròfica sinó a una distribució marcada pel contingut de matèria orgànica que transporta aquests contaminants.

En primer lloc, les concentracions de COPs dels silurs de l'embassament de Riba-Roja són molt baixes (Taula 1, apartat 4.2.1) i del mateix ordre de magnitud que les trobades en altres estudis (7 ng/g i 2 ng/g pel total de DDTs i PCBs, respectivament; Covaci et al., 2006). Els compostos més abundants són els DDTs (59%), seguits dels PCBs (38%) i l'HCB (2%). La presència de metabòlits del DDT pot ser conseqüència de l'ús d'aquests compostos com a pesticides al passat dins de la conca el riu Ebre o a cert transport atmosfèric des de la planta clor-àlcali localitzada aigües avall.

La distribució percentual dels DDTs a Ribarroja mostra un domini clar dels metabòlits DDEs (>75%) davant dels DDDs (<25%). No s'han trobat concentracions significatives dels compostos DDTs possiblement perquè es trobi ja metabolitzat en forma de DDEs. Això confirmaria que no s'han produït aportacions recents de DDT. Aquest compost *p,p'*-DDT té una vida mitjana aproximada de 8 mesos a l'interior dels peixos, mentre que la resta de metabòlits poden restar-hi fins a 7 anys (Binelli i Provini, 2003). La concentració de la suma d'HCHs es troba molt propera als límits de detecció en totes les mostres estudiades (0.2 ng/g) i predomina l'isòmer lindà. Finalment, les concentracions de PCBs totals són baixes a totes les mostres. La mitjana és de 6 ng/g i el patró de distribució de congèneres segueix un esquema amb major concentració dels més pesats (PCB-138, PCB-153 i PCB-180). Amb aquests resultats sembla clar que no hi ha una gran influència de la planta clor-àlcali situada a l'embassament de Flix.

A les localitats situades aigües avall de l'embassament de Flix, això canvia (Taula 1, apartat 4.2.1). El primer punt de presa de mostra és el meandre. Les concentracions d'HCB són molt baixes en comparació amb les del total de DDTs i PCBs (5 ng/g, 17 ng/g i 37 ng/g, respectivament). Dins d'aquests grups, els valors màxims són sempre menors que els trobats en mostres de silur de l'embassament de Flix. En aquest punt els PCBs estan en concentracions més altes que els DDTs i l'HCB. A més, a totes les mostres, les concentracions de PCBs són entre un 30 i un 70% més altes que les de DDTs, tot suggerint que hi ha una major acumulació d'aquests compostos en aquesta zona d'aigües tranquil·les.

Entre els DDTs predomina el *p,p'*-DDE a totes les mostres analitzades i els DDDs es troben en concentracions baixes. Això contrasta amb la composició de les mostres de l'embassament de Flix on el DDD era important. De totes formes, al meandre també s'han trobat algunes mostres puntuals amb valors elevats de *p,p'*-DDT, tot indicant que hi ha hagut alguna aportació recent d'aquest compost. En relació a la suma de HCHs, només aquells individus amb concentracions

més altes de la resta de COPs presenten nivells quantificables d'isòmers diferents. El majoritari continua sent el β -HCH, seguit del γ -HCH, tot i que les concentracions d'ambdós són molt baixes (la mitjana es situa per sota dels 0.3 ng/g). Als silurs del meandre la distribució de congèneres de PCBs mostra una major abundància dels congèneres més pesats (PCB-138, PCB-153 i PCB-180). La concentració mitjana per cada un d'ells és de 10 ng/g, 10 ng/g i 7 ng/g, respectivament.

Tot i que no s'han inclòs en els articles publicats en aquest apartat, també s'han analitzat 12 carpes recollides en aquest punt (Taula 1, supplementary information, apartat 4.2.2). Les concentracions trobades són més altes que en els silurs i a més hi ha algunes diferències en quant a la composició dels COPs. En el 75% de les mostres, el grup predominant de contaminants continua sent la suma de PCBs, però per l'altre 25% és la suma de DDTs. Les concentracions de la suma de PCBs oscil·la entre 10 i 626 ng/g, variant molt segons l'individu. En el cas dels DDTs les diferències entre individus encara són més fortes amb concentracions entre 8 i 1440 ng/g. Les concentracions d'HCB són més baixes en comparació amb les mostres de Flix i també en comparació amb la suma de PCBs i DDTs. La concentració mitjana és 30 ng/g i això suposa un ordre de magnitud inferior que la mitjana trobada a les carpes de l'embassament de Flix.

Dins del grup dels DDTs, el metabòlit predominant és el *p,p'*-DDE amb una concentració mitjana molt alta (149 ng/g). Com en el cas dels silurs, hi ha menys individus on amb concentracions de DDDs per sobre dels DDEs (8%). D'aquesta forma es confirma que al meandre, els processos de reducció del DDT a DDD no es produeixen o es produeixen poc i per tant no hi ha gaire ingesta d'aquests metabòlits i els peixos transformen el *p,p'*-DDT en *p,p'*-DDE. Els isòmers dels HCHs no segueixen un mateix patró a totes les mostres. Predominen el γ -HCH i α -HCH. Les concentracions mitjanes són iguals que en el cas dels als silurs (0.3 ng/g). Finalment, el patró de distribució dels PCBs varia lleugerament en relació amb les mostres de carpa de l'embassament. Les mostres del meandre tenen un clar predomini dels congèneres més pesats a totes les mostres. Això indica que a les localitats allunyades del gran focus de contaminació, arriben fonamentalment els compostos més clorats, i, per tant, més afins a les partícules.

Aigües avall de l'embassament de Flix, s'han estudiat 5 silurs capturats just abans de l'assut de Xerta. En aquestes mostres les concentracions de DDTs i PCBs totals són molt similars, 6-37 ng/g i 6-34 ng/g, respectivament (Taula 1, apartat 4.2.1). D'altra banda, disminueix moltíssim la concentració dels compostos volàtils com l'HCB en comparació a les localitats anteriors. Als silurs de Xerta no s'han detectat isòmers de la suma d'HCHs i pràcticament tampoc hi ha PeCB.

Les concentracions de PCBs són menors que en el meandre, però les de DDTs totals són semblants. Això es podria explicar perquè aigües avall, els individus també contenen als seus teixits musculars el metabòlit principal *p,p'*-DDE, que costa més d'excretar i pot romandre més temps dins dels organismes (Catalan et al., 2004).

Entre aquests el *p,p'*-DDE és el que es troba en concentració més alta (amb diferència) en relació als altres metabòlits. A la distribució de congèneres de PCBs la suma de concentracions mitjanes dels tres congèneres més volàtils (PCB-28, PCB-52 i PCB-101) és de 3 ng/g mentre que la dels tres més pesats (PCB-138, PCB-153, PCB-180) arriba a 15 ng/g.

En aquesta mateixa localitat també s'han analitzat 10 carpes, els resultats de les quals no s'inclogueren als articles. En aquests peixos els COPs predominants continuen sent els DDTs i PCBs, amb valors mitjans força elevats en ambdós casos, 105 ng/g i 95 ng/g, respectivament (Taula 1, supplementary information, apartat 4.2.2). L'HCB s'ha trobat en totes les mostres però en concentracions més baixes que a les mostres properes a l'embassament de Flix, 7 ng/g. Els HCHs només es troben per sobre del límit de detecció en 2 mostres.

En aquestes mostres, el metabòlit predominant del grup de DDTs és clarament el *p,p'*-DDE, amb gran diferència. Aquesta és una característica de totes les mostres dels organismes estudiats lluny del focus contaminant. La distribució de congèneres de PCBs és igual a la dels silurs. El congènere més abundant és el PCB-153 a totes les mostres i amb una concentració mitjana més alta que en els silurs (32 ng/g).

A Xerta també s'estudiaren 5 espècimens de rutil. Les concentracions d'HCB en aquesta espècie són molt baixes, oscil·lant entre 1 i 14 ng/g mentre que els DDTs i PCBs totals són de 29-63 ng/g i 32-52 ng/g, respectivament (Taula 1, supplementary information, apartat 4.2.2). En el 80% de les mostres predominen els DDTs totals entre els COPs. El metabòlit predominant dels DDTs en aquesta espècie continua sent el *p,p'*-DDE i en cap cas els DDTs superen les concentracions dels DDEs. És, per tant, el mateix patró que el trobat en aquesta localitat per silurs i carpes. Entre els HCHs predomina el β -HCH a totes les mostres. A més en un 40% de les mostres també s'ha trobat l'isòmer γ -HCH. Les concentracions mitjanes d'ambdós són de 0.4 ng/g. La distribució dels congèneres de PCBs segueix el mateix patró que a les altres dues espècies amb el PCB-153 com a congènere més abundant a totes les mostres (concentració mitjana de 10 ng/g). A més, la concentració mitjana per la suma de PCBs és major que la trobada en silurs, probablement els hàbits alimentaris i d'hàbitat condicionen una major bioacumulació per part d'aquesta espècie en relació als depredadors.

L'estudi del transport de contaminació aigües avall emprant el silur també ha inclòs mostres dels canals del tram baix del riu Ebre. En aquestes localitats s'ha prioritzat l'elecció de mostres segons la longitud, estudiant dues mostres de mida gran i dues de petites quan ha estat possible. S'han analitzat quatre localitats dins dels canals (Tivenys, Sifó de Jesús, Tortosa i Deltebre).

A Tivenys, els resultats obtinguts indiquen que les concentracions màximes, tot i ser menors que a l'embassament de Flix, continuen sent altes. Els valors mitjans de DDTs i PCBs totals són de l'ordre magnitud que a Flix i sempre es troben per sobre dels trobats en altres estudis emprant aquesta mateixa espècie de peix (Covaci et al., 2006; Erdogrul et al., 2005). Predominen els DDTs a totes les mostres seguits de la suma de PCBs, 72 i 50 ng/g, respectivament (Taula 1, apartat 4.2.1). A totes les mostres predomina el *p,p'*-DDE entre els DDTs. No obstant, les concentracions de *o,p'*-DDT i *p,p'*-DDT són importants i arriben a representar entre el 10 i el 25% dels DDTs totals. Als silurs capturats en aquesta localitat, l'isòmer predominant és el δ -HCH i només una sola mostra té concentracions quantificables de tots els isòmers. La concentració mitjana per la suma d'HCHs continua sent molt baixa i sempre per sota d'1 ng/g. En relació als congèneres de PCBs, el patró de distribució és exactament igual que a les altres localitats d'estudi amb majors concentracions dels compostos més pesats. La concentració mitjana del PCB-153 és de 13 ng/g i és el majoritari a totes les mostres.

Uns quilòmetres més avall, a la zona del Sifó del Jesús les concentracions de COPs a totes les mostres són molt altes i del mateix ordre de magnitud que les trobades a l'embassament de Flix. La suma de DDTs oscil·la entre 120 i 310 ng/g mentre que els PCBs varien entre els 66 i 150 ng/g. En aquestes mostres també hi ha una gran concentració d'HCB arribant a significar entre un 3% i un 16% dels COPs totals (Taula 1, apartat 4.2.1).

Predominen els DDEs (39-64%) respecte els DDDs (22-34%) i els DDTs (11-28%). A tots els casos, però, s'observen concentracions apreciables de *o,p'*-DDT i *p,p'*-DDT. En aquesta localitat, les concentracions de la suma de HCHs també són del mateix ordre de magnitud que a l'embassament de Flix amb una concentració mitjana de quasi 1 ng/g. De totes formes, la distribució d'isòmers uniforme. A nivell de PCBs, en tres de les quatre mostres s'observa una distribució de congèneres igual que a les de les localitats anteriors però en una de les mostres s'han trobat unes concentracions de PCB-101 i PCB-118 inusualment altes.

En el tram més inferior del riu Ebre, només s'han pogut analitzar dues mostres al canal de Tortosa. Aquí les concentracions de COPs són menors a les trobades a Sifó de Jesús, però continuen mantenint-se en l'ordre de magnitud que la resta de mostres analitzades aigües avall de l'embassament de Flix. També predominen el conjunt de DDTs per sobre dels PCBs i és

important destacar novament la presència de concentracions importants d'HCB que arriben al 5-8% del total de COPs. Les concentracions mitjanes són 70, 33 i 7 ng/g, respectivament (Taula 1, apartat 4.2.1). Entre els DDTs, continua predominant el *p,p'*-DDE per sobre del 60% del total. D'altra banda, el *p,p'*-DDT no supera mai valors superiors al 16% tot i que es troba present en ambdues mostres. Les concentracions de HCHs també són molt baixes amb valors mitjans inferiors a 1 ng/g i sense un patró clar de distribució d'isòmers. Finalment, el patró de distribució de PCBs es manté igual a les altres localitats, amb un predomini dels congèneres més pesats, amb una concentració més alta pel congènere PCB-153.

L'últim lloc de presa de mostra dins dels canals s'ha realitzat a l'alçada de Deltebre. Les concentracions a les mostres de silur han estat altes, obtenint unes concentracions de DDTs i PCBs semblants a les trobades en algunes mostres de Flix, 190-320 ng/g i 15-97 ng/g, respectivament (Taula 1, apartat 4.2.1). L'HCB ha superat el 10% del total de COPs en un 75% de les mostres. La distribució de DDTs es manté igual que a la resta de localitats però amb més predomini dels DDEs (51-82%) respecte els DDDs (16-38%) i els DDTs (2-12%). Les concentracions totals dels HCHs, 2 ng/g, tot i ser menors que les dels altres grups de COPs, són més grans que a la resta de mostres de silur capturades aigües avall de l'embassament de Flix i del mateix ordre de magnitud que les trobades al propi embassament. Es troben els 4 isòmers estudiats en el 75% de les mostres. L'isòmer predominant a totes les mostres és el γ -HCH per davant del β -HCH. Finalment, la distribució de congèneres de PCBs segueix el mateix patró que el trobat fins ara.

També s'han recollit mostres a la part central del riu a la localitat de Deltebre. En el cas dels silurs, s'han pogut capturar i analitzar dues mostres trobant-se concentracions per sobre dels límits de quantificació per l'HCB, la suma de DDTs (20 ng/g) i la suma de PCBs (4-11 ng/g). Totes les concentracions són baixes en comparació amb les altres localitats (Taula 1, apartat 4.2.1). Predominen els DDEs entre els DDTs. Les concentracions dels HCHs es troben totes per sota els límits de detecció. Entre els PCBs predominen els compostos més pesats.

En aquesta zona també s'han analitzat 10 carpes que mostren el mateix patró en relació a l'abundància dels principals grups de COPs. Les concentracions de DDTs es troben entre 32 i 115 ng/g, mentre que les de PCBs oscil·la entre 26 i 90 ng/g (Taula 1, supplementary information, apartat 4.2.2). També s'observen concentracions entre 2 i 12 ng/g d'HCB tot i que sempre representen menys del 10% de tots els COPs estudiats. Totes aquestes concentracions són molt més altes que les trobades als silurs de Deltebre mostrant-se un patró de bioacumulació diferent segons l'espècie. En el 100% de les mostres el metabòlit predominant és el *p,p'*-DDE i a tots els individus les concentracions del conjunt de DDEs són superiors a les dels DDDs.

Aquesta distribució continua sent la usual en mostres allunyades dels focus de contaminació per DDT. La suma d'HCHs no té concentracions altes. S'ha trobat un isòmer en tan sols 4 mostres, i el γ -HCH és el que apareix en més mostres amb una concentració mitjana de 0.4 ng/g. En relació als congèneres de PCBs, s'han trobat concentracions altes pels congèneres més pesats i més baixes pels més volàtils.

En aquesta localitat també s'ha estudiat el rutil. Els DDTs tenen concentracions entre 16 i 89 ng/g i els PCBs entre 11 i 59 ng/g (Taula 1, supplementary information, apartat 4.2.2). Aquests valors són molt alts i s'expliquen per un transport d'aquests compostos mitjançant la fase particulada. L'HCB també té unes concentracions semblants a les trobades per la carpa en aquesta localitat (4-11 ng/g). Novament, entre els DDTs predominant el *p,p'*-DDE seguit del *p,p'*-DDD a totes les mostres. Només s'ha trobat un isòmer dels HCHs a totes les mostres, el β -HCH, i és diferent al trobat a les carpes. La concentració d'aquest compost és inferior a 1 ng/g i per això, en conjunt, la concentració mitjana per la suma d'HCHs és molt baixa (0.4 ng/g). Els dos congèneres de PCBs amb major concentració són el PCB-153 i el PCB-138 a totes les mostres. Aquest predomini coincideix amb la tendència a majors concentracions dels compostos menys volàtils en relació als més lleugers. La mitjana global per la suma de PCBs a totes les mostres és de 28 ng/g. Aquest valor és més alt que el trobat pels silurs i en canvi menor que en el cas de les carpes. Això pot explicar-se per les diferències d'hàbit i de dieta que tenen les tres espècies.

5.3 Determinació de COPs en ous d'ocell al tram baix del riu Ebre

L'estudi en detall de les concentracions de COPs a l'agró roig al llarg del tram baix del riu Ebre (apartat 4.3.1) ha permès determinar que les tres localitats de presa de mostra tenen concentracions molt diferenciades entre elles per a tots els COPs estudiats (PeCB, HCB, suma de DDTs, suma d'HCHs, suma de PCBs i suma de PCEs). A l'Aiguabarreig (aigües amunt de l'embassament de Flix) les concentracions mitjanes són menors que a Flix en tots els compostos estudiats, amb l'excepció de la suma d'HCHs. El PeCB té valors molt baixos amb unes mitjanes properes als límits de quantificació i detecció. En el martinet blanc (*Egretta garzetta*) la concentració mitjana és de 0.3 ng/g (dada no present als articles) i l'agró roig (*Ardea purpurea*) 0.5 ng/g. En el cas de l'HCB, les concentracions són més altes, amb valors mitjans entre 1.5 i 4.3 ng/g, respectivament. En altres estudis s'han trobat concentracions de 1.6 ng/g (Aurigi et al., 2000), 5 ng/g (Custer et al., 2002) i 140 ng/g (Cruz et al., 1997). A l'agró roig s'ha trobat que les concentracions mitjanes de DDTs són inferiors a les de PCBs. En canvi, pel martinet blanc aquesta tendència s'inverteix (Taula 1, apartat 4.3.2). Les concentracions mitjanes per la suma

de DDTs han estat al voltant dels 220 ng/g a l'agró roig, mentre que al martinet blanc s'ha trobat un valor mitjà de 557 ng/g. Les concentracions de la suma d'HCHs són molt baixes en l'espècie analitzada al 2006 (martinet blanc) amb valors propers a 1 ng/g. D'altra banda, les mostres d'agró roig del 2007 tenen concentracions més elevades amb una mitjana propera als 8 ng/g (en altres estudis 92 ng/g; Cruz et al., 1997). Finalment, per a la suma de PCBs les concentracions són altes per la majoria de mostres. Les mitjanes oscil·len entre 86 ng/g i 486 ng/g i són valors intermedis en comparació amb altres estudis, 100 ng/g (Aurigi et al., 2000), 920 ng/g (Custer et al., 2002), i 1280 ng/g (Cruz et al., 1997).

Les distribucions dels metabòlits dels DDTs són semblants en les dues espècies. Existeix un predomini molt clar del *p,p'*-DDE, entre el 86 i el 99% dels DDTs a cada mostra. L'isòmer predominant entre els HCHs és el β -HCH, que s'ha trobat en totes les mostres. La resta d'isòmers no s'han detectat a totes les mostres i no segueixen un patró constant de distribució. Entre els PCEs, el congènere més abundant a totes les mostres ha estat l'OCE. A més, per a totes les mostres el patró de congèneres de PCBs és el mateix i predominen els menys volàtils (PCB-138, PCB-153 i PCB-180). Entre aquests tres, el PCB-153 és el de concentracions més altes amb valors màxims que arriben als 285 ng/g (Taula 1, apartat 4.3.2).

Dins de l'embassament de Flix les concentracions de COPs trobades els ous d'agró roig varien entre anys (Taula 1, apartat 4.3.1). El 2006 les concentracions mitjanes de DDTs i PCBs són més altes que a les mostres del 2007. Els valors són 680 ng/g i 880 ng/g pel primer any i 250 ng/g i 520 ng/g al segon any, respectivament. Aquests resultats són comparables als trobats en altres estudis, 923 ng/g (Aurigi et al., 2000), 250 ng/g (Custer et al., 2002), 470 ng/g (Cruz et al., 1997). Contràriament a la tendència a la disminució, entre els compostos més volàtils PeCB, HCB i HCHs s'observen concentracions més altes l'any 2007 (1.2 ng/g, 35 ng/g i 6.8 ng/g, respectivament) que el 2006 (0.4 ng/g, 18 ng/g i 1.1 ng/g, respectivament). En aquest cas s'han trobat diferències dins del grup dels clorobenzens, amb concentracions molt més elevades d'HCB a totes les mostres indistintament de l'any en què es recolliren. Això és coherent amb la resta de resultats trobats en aquesta tesi, on s'observa una gran influència de les emissions de la planta clor-àlcali en la biota local. Les concentracions màximes trobades el 2006 i 2007 són 62 ng/g i 180 ng/g, respectivament. Les concentracions mitjanes de PCBs són superiors a les de DDTs en ambdós anys. Així, i tot, les concentracions màximes d'ambdós grups de contaminants són 1400 ng/g i 1800 ng/g, respectivament. En el cas dels PCEs, les concentracions més altes s'han trobat en els ous d'agró roig de l'embassament de Flix (2006 i 2007), amb valors mitjans fins a 4 vegades més alts que a les altres localitats, aquests resultats mostren que la influència de la planta clor-àlcali a l'entorn també inclou aquests compostos.

En relació als DDTs, en aquesta localitat també predomina el *p,p'*-DDE, amb concentracions màximes de 1600 ng/g el 2006 i 340 ng/g el 2007. Aquest compost es troba en percentatges del 61-99% i 74-97% del total de DDTs en les mostres del 2006 i 2007, respectivament. Cal destacar que en una mostra de l'any 2007 es troba una concentració important de *p,p'*-DDT (81 ng/g) encara que per sota de la resta de metabòlits. A les mostres de l'embassament de Flix la suma d'HCHs no mostra concentracions més altes que a l'Aiguabarreig. Varies mostres es troben per sobre dels 2 ng/g i la concentració màxima és de 21 ng/g en una mostra del 2007. L'isòmer predominant continua sent el β -HCH, present en un 55% de les mostres del 2006 i al 100% de les mostres del 2007. La distribució de PCEs a l'embassament també es caracteritza pel predomini de l'OCE, tot i que s'ha trobat un increment d'altres congèneres, principalment els HxCes. Finalment el patró de distribució dels congèneres de PCBs és igual a totes les mostres i segueix amb el perfil trobat per les mostres de l'Aiguabarreig. Predominen els tres congèneres més pesats i entre tots ells, el PCB-153 és el que té les concentracions més altes a totes les mostres (concentració màxima 490 ng/g).

Al Delta de l'Ebre, al tram final del riu s'han estudiat mostres d'ou de dues espècies: el martinet blanc i l'agró roig (en dos anys diferents). A les mostres de martinet blanc s'observen concentracions similars de DDTs i PCBs amb valors mitjans de 550 ng/g i 532 ng/g, respectivament (Taula 1, apartat 4.3.2). Cal destacar que la concentració d'HCB en aquesta espècie és lleugerament superior a la trobada a les mostres d'agró roig, amb un valor mitjà de 12 ng/g. En canvi, en les mostres d'agró roig, predominen els DDTs per sobre dels PCBs a gairebé totes les mostres independentment de l'any de recollida. Les concentracions són més altes en les mostres del 2006 però no s'observa una diferència tan gran com la trobada a l'embassament de Flix.

En aquesta localitat, tant a les mostres del 2006 com a les del 2007, també predomina el *p,p'*-DDE entre els DDTs (86-99%) amb concentracions màximes properes als 1300 ng/g i fins a 1700 ng/g, respectivament. Novament, s'han obtingut concentracions força altes del metabòlit parental *p,p'*-DDT en una mostra del 2006 (100 ng/g), tot i que sempre en una proporció inferior a la del metabòlit més abundant (*p,p'*-DDE). És en aquesta localitat on les concentracions de la suma d'HCHs són més altes. La mitjana a les mostres de martinet blanc és de 6 ng/g mentre que a l'agró roig oscil·len entre 3 i 9 ng/g. La distribució d'isòmers, però, continua mostrant un predomini de l'isòmer β -HCH i amb poca presència de la resta. En aquest cas s'ha trobat aquest isòmer en el 100% de les mostres. Cal remarcar que a dues mostres d'ou d'agró roig de l'any 2007 s'ha trobat γ -HCH. La major concentració global del total d'HCHs i la presència d'aquest darrer isòmer pot suggerir un ús de lindà en alguna zona dels cultius de la zona del Delta de l'Ebre. El percentatge de congèneres de PCEs continua dominat per l'OCS tot

i que a les mostres del Delta de l'any 2006 s'hi ha trobat una concentració similar dels congèneres d'HxCes. El patró dels congèneres de PCBs no varia tot i que les concentracions en aquesta localitat siguin inferiors a les de l'embassament de Flix. Els tres congèneres més pesats tenen concentracions més altes i el PCB-153 és el més abundant (màxim de 440 ng/g en una mostra de martinet blanc).

D'altra banda, l'anàlisi canònic discriminant ha mostrat que només amb la suma de PCBs i DDTs (que ja expliquen més del 90% de la variància entre localitats), és possible agrupar les mostres i classificar-les segons la zona de mostreig. La influència de la planta clor-àlcali a l'embassament de Flix és clara perquè a les mostres d'aquesta localitat (totes d'agró roig) s'han trobat les majors concentracions mitjanes d'HCB, PCEs i PCBs, tots ells productes derivats de la producció que s'hi ha dut a terme. En canvi, pel que fa al contingut total de DDTs no s'observen diferències importants entre les mostres de Flix i les d'altres localitats. L'homogeneïtat observada ve reforçada pel predomini de *p,p'*-DDE a totes les mostres en concentracions altes. Finalment, els HCHs es troben en concentracions més altes en les espècies que habiten en el Delta. Això suggereix una aplicació més intensa d'aquests productes en el passat en aquesta regió més agrícola.

La comparació entre localitats allunyades de Flix on s'han pogut recollir mostres de les mateixes espècies ha permès comprovar que existeixen diferències significatives en les concentracions de COPs entre els martinets blancs de l'Aiguabarreig i els del Delta. Amb l'excepció dels DDTs, les concentracions mitjanes són més altes al Delta. Això mostra, probablement, una influència dels contaminants emmagatzemats a l'embassament de Flix que són arrossegats fins al Delta, mentre que l'Aiguabarreig, situat aigües amunt, no rep aportacions d'aquesta factoria. En el cas de l'agró roig del 2006, també s'han observat diferències significatives entre les mostres de Flix i les del Delta. Per a tots els COPs, amb l'excepció de la suma d'HCHs, les concentracions mitjanes són més altes a l'embassament de Flix. Aquests resultats són coherents amb els de les mostres recollides el 2007. S'han observat unes concentracions mitjanes molt altes pel PeCB, HCB, PCEs i PCBs a les mostres d'ous de l'embassament de Flix en relació a les de l'Aiguabarreig i el Delta. En el cas de la suma de DDTs i HCHs, les concentracions mitjanes més altes s'han trobat al Delta tot i que sense grans diferències amb les altres dues localitats.

Finalment, amb la comparació de mostres d'una mateixa espècie recollides en anys consecutius reflecteix que també existeixen diferències. Els resultats indiquen que per als compostos més volàtils (PeCB, HCB i HCHs) les concentracions són més altes a les mostres de l'any 2007, mentre que els grups de compostos més pesats (suma de PCEs, DDTs i PCBs) tenen

concentracions més altes en les mostres del 2006. Aquesta tendència també es troba en les mostres del Delta on s'observen els mateixos canvis però amb unes diferències inter-anuals inferiors.

Si es consideren els efectes tòxics potencials que poden provocar els COPs en les diferents espècies d'aus estudiades, les concentracions mitjanes es troben per sota dels límits establerts com a possible afectació de la reproducció d'aquestes aus. De totes formes, en algunes mostres individuals de l'embassament de Flix, les concentracions de *p,p'*-DDE superen els límits establerts per produir efectes negatius en la supervivència dels pollets nous. En estudis anteriors (Quirós et al., 2008) es van trobar un major nombre de micronuclis en mostres de Flix en comparació a les de l'Aiguabarreig, tot indicant que els agrons que nien a l'embassament estan experimentant efectes genotòxics.

5.4 Determinació de la biomagnificació de COPs a l'embassament de Flix

L'estudi dels COPs dins de la xarxa tròfica a l'embassament de Flix (apartat 4.4.1) ha indicat que als sediments recollits a la zona central de l'embassament, les concentracions de PeCB, HCB i DDTs són extremadament altes. En relació a la composició dels metabòlits d'aquest darrer grup, hi ha un predomini dels isòmers *o,p'*-DDT i *p,p'*-DDT per sobre dels seus productes de descomposició (*o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD i *p,p'*-DDD). Això en suggereix una introducció probable més o menys recent a l'embassament. D'altra banda, en aquest cas, s'han trobat valors més alts dels DDDs en relació als DDEs, ja que les condicions anòxiques en les que es troben els sediments submergits faciliten el procés de metabolització del producte originari, DDT, en DDD. Pel que fa als PCBs les concentracions no són tan elevades, si bé presenten valors mitjans inclosos en el rang de concentracions trobades per a zones industrials i urbanes. La tendència general en el patró de distribució de congèneres és a tenir concentracions majors dels PCBs amb major pes molecular (PCB-138, PCB-153 i PCB-180) en relació als més volàtils (PCB-28, PCB-52 i PCB-101). Finalment, en el cas dels HCHs les concentracions són molt baixes en els sediments, segurament degut a la seva facilitat de dissolució en comparació amb la resta de COPs analitzats. L'isòmer predominant que s'ha pogut identificar en el 55% de les mostres ha estat el β -HCH.

El primer nivell tròfic que es troba en contacte directe amb els sediments és el biofilm. Les anàlisis de biofilm mostren dues situacions molt diferenciades en relació als contaminants de l'embassament i el seu impacte sobre l'ecosistema del riu. Les zones mostrejades lluny de la

influència dels fangs, però dins de l'embassament de Flix, tenen concentracions baixes de tots els compostos. En canvi, el biofilm *flotant* recollit al mig del riu i, sobretot, el biofilm recollit al marge de la fàbrica cloro-àlcali mostra unes concentracions molt altes de tots els COPs. Les concentracions altes en aquest biofilm *flotant* constitueixen una troballa molt important perquè mostren un mecanisme eficient de transport de la contaminació a les zones situades aigües avall de l'embassament. L'alliberament de restes d'aquests organismes adherits al sediment i el transport seguint el corrent natural del riu fins que es dipositen en aigües més tranquil·les és un mecanisme no descrit fins ara. La composició dels metabòlits dels DDTs en aquests biofilms segueix el mateix patró que a les mostres de sediments. S'observa una concentració més alta de DDTs en relació als DDDs i DDEs. Els altres grups de contaminants (HCHs i PCBs) mostren les mateixes distribucions que en el cas dels sediments. Això indica una forta correspondència en la composició de COPs entre aquestes dues matrius ambientals.

Les concentracions de tots els COPs analitzades en el fitoplancton han estat molt baixes, quasi sempre per sota dels límits de detecció i quantificació. A més, els únics compostos que s'han pogut trobar de forma regular corresponen amb aquells més solubles en aigua o que es troben amb major presència dins de l'embassament de Flix (HCHs i HCB, respectivament). Pràcticament no s'ha pogut trobar DDTs en cap mostra i entre els diferents isòmers d'HCHs estudiats, el γ -HCH s'ha detectat i quantificat en un 75% de les mostres.

Les concentracions són més altes entre el zooplàncton, el primer consumidor de la xarxa tròfica local. Les concentracions no han estat mai superiors a 0.6 $\mu\text{g/g}$ (corregit pels lípids), però sí es troben per sobre dels límits de detecció i quantificació. En aquest cas s'ha observat un predomini de HCB, DDTs i PCBs. Els resultats concorden amb la major presència d'aquests contaminants en els sediments. En aquest cas, el *p,p'*-DDE i *o,p'*-DDE es troben en concentracions més altes que els DDTs o DDDs. Els patrons de distribució dels PCBs han mostrat una divergència en relació amb els valors trobats a les mostres de sediments i biofilms. En aquest cas, les majors concentracions d'alguns congèneres poc pesats en relació amb aquells menys volàtils, indiquen que aquests primers nivells tròfics relacionats amb la columna d'aigua, tenen una major facilitat per acumular aquells compostos més solubles i volàtils en detriment dels més pesats i persistents. Aquest perfil es correspon amb el trobat en altres sistemes aquàtics europeus com el Danubi, on hi havia una presència dominant dels congèneres tri-, tetra- i penta-clorats (Covaci et al., 2006).

L'altre gran grup de productors primaris, les plantes aquàtiques o macròfits, han permès un estudi més complet de la distribució dels COPs en dos aspectes. Si bé a l'article s'ha parlat de les seves concentracions mitjanes tot emprant les tres espècies conjuntament, també s'han

comparat les concentracions dels principals grups de COPs segons l'espècie analitzada per comparar-les amb les d'altres regions del planeta. Les concentracions mitjanes trobades en macròfits han mostrat, en general, un gran contrast entre les de les espècies recollides a l'embassament de Flix (amb diferències clares entre marges), i les de la resta del món (taula 5.1). En termes quantitativs existeixen diferències en el grau de bioacumulació de COPs segons l'espècie analitzada. Cal destacar, però, que *Lemna gibba* té les concentracions més altes d'HCB a les mostres recollides al marge de la fàbrica clor-àlcali de Flix. Això es podria explicar per la seva fisonomia, ja que es tracta d'una planta de fulles flotants que té contacte directe tant amb la fase aquosa del riu com amb la fase aèria. Com a conseqüència de les propietats fisicoquímiques de l'HCB, és molt possible que la interacció atmosfèrica sigui més important que la aquàtica en aquest entorn. Bona part de l'abocament d'HCB de la planta clor-àlcali correspon a emissions a l'atmosfera.

Taula 5.1. Comparació de les concentracions de compostos organoclorats trobats en macròfits d'aquest estudi en relació a altres localitats del món.

Espècie	Localització i ambient	Compostos	Concentració ng/g ww	Concentració ng/g dw	Estudi
<i>Hydrilla verticillata</i>	Aiguamolls Riu Potomac (USA)	Suma PCBs		24.1	Hopple, J. et al. 1996
<i>Schoenoplectus californicus</i>	Llac Los Padres (Argentina)	Suma PCBs	2.0		González Sagrario, M.A. et al. 2002
<i>Ludwigia sp.</i>	Llac Los Padres (Argentina)	Suma PCBs	12.5		González Sagrario, M.A. et al. 2002
<i>Dictyota acutiloba</i>	Midway Atoll (Oceà Pacífic Nord)	Suma PCBs		28.0	Hope, B. et al. 1997
<i>Giffordia breviarticulata</i>	Midway Atoll (Oceà Pacífic Nord)	Suma PCBs		17.4	Hope, B. et al. 1997
<i>Halophila ovalis</i>	Midway Atoll (Oceà Pacífic Nord)	Suma PCBs		7.5	Hope, B. et al. 1997
Varies espècies	Costa Est (Sicília)	Suma PCBs	2.7-39.4	35.9-590.9	Amico, V. et al. 1979
<i>Desmarestia sp.</i>	Admiralty Bay (Península Antàrtica)	Suma PCBs		1.5	Montone, R.C. et al. 2000
Varies espècies		Suma PCBs	4.1	33.4	Present estudi
<i>Schoenoplectus californicus</i>	Llac Los Padres (Argentina)	Suma HCHs	0.7	3.0	Miglioranza, K. et al. 2004
Varies espècies		Suma HCHs	0.5	3.7	Present estudi
<i>Schoenoplectus californicus</i>	Llac Los Padres (Argentina)	Suma DDTs	0.8	3.2	Miglioranza, K. et al. 2004
Varies espècies	Costa Est (Sicília)	Suma DDTs	0.1-3.9	0.9-23.3	Amico, V. et al. 1979
Varies espècies		Suma DDTs	4.5	30.3	Present estudi

En general, la composició relativa dels PCBs en tot el conjunt de mostres de macròfits, indica un predomini dels congèneres més pesats, sobretot PCB-153 i PCB-138. A més, la proporció de la suma d'aquests compostos augmenta quan la concentració absoluta de PCBs és més gran.

D'altra banda, la distribució de DDTs es caracteritza pel predomini del *p,p'*-DDD per sobre del *p,p'*-DDE. És possible que el predomini d'aquest compost es degui als processos de reducció dels productes originaris (DDTs) en els sediments anòxics sobre els que viuen la majoria dels macròfits.

Les concentracions trobades a l'embassament de Flix, en el seu marge dret, són superiors en més d'un ordre de magnitud a tota la resta de mostres. Això és indicatiu de la gran influència que té la bossa de fangs emmagatzemada a la llera del riu dins de l'embassament. De totes formes, les concentracions relativament baixes dels COPs analitzats aigües avall (mostres no incloses a l'article), suggereixen que hi ha una menor taxa de bioacumulació d'aquests contaminants als vegetals en relació a d'altres organismes. En el cas d'un estudi anterior sobre els sediments del tram final del riu Ebre (Grimalt et al., 2003), s'observava una gradació molt forta al comparar les concentracions trobades riu avall des de l'embassament de Flix. Aquesta gradació mostrava una caiguda exponencial dels valors entre Flix i la desembocadura, amb un cert increment a la zona del Delta. Ara, amb les mostres de macròfits estudiades, s'observen grans diferències entre les localitats situades aigües avall i l'embassament de Flix. A Deltebre només es troben alguns increments de concentració per a certs contaminants i en determinades espècies que ja presenten valors més alts a les localitats intermèdies mostrejades (Meandre o Xerta). Això és coherent amb una transferència de contaminants associats a la fase particulada, que després facilita una entrada dels COPs dins la xarxa tròfica a cada zona del riu. A més, prop de la desembocadura del riu també es troben els nivells de HCHs totals més elevats del conjunt total de macròfits analitzats (tot i que sempre parlem de concentracions baixes). Això és coherent amb un ús com a plaguicides en aquesta regió agrícola. De totes formes, els resultats observats no semblen indicar que els macròfits constitueixin un vector molt important en relació amb el transport i biomagnificació dels COPs a les xarxes tròfiques aigües avall de l'embassament de Flix.

Per avaluar els processos de biomagnificació dels COPs al llarg de la xarxa tròfica local s'ha agrupat la matriu originària de la contaminació (sediments) amb l'organisme més pròxim (biofilm), que fins i tot creix en contacte directe amb els llots acumulats a la llera del riu. D'altra banda, s'ha fet un bloc complet amb la resta d'organismes que va des dels nivells tròfics inferiors (plàncton i macròfits) fins als principals depredadors (algunes espècies de peixos i les aus) (Figura 5, apartat 4.4.1).

Les concentracions més altes per a la majoria de COPs es troben en els sediments i biofilm (Taula 1, apartat 4.4.1). Els compostos predominants en els sediments són el PeCB, HCB i DDTs amb concentracions mitjanes de 0.8 µg/g, 21 µg/g i 2.0 µg/g, respectivament. En canvi a

les mostres de biofilm, les concentracions mitjanes més altes són, per ordre, les de l'HCB (280 µg/g), DDTs (120 µg/g) i PCBs (16 µg/g). El PeCB (14 µg/g) té una concentració mitjana semblant a la suma de PCBs. Aquestes concentracions estan corregides pel contingut de lípids. La distribució de DDTs mostra un predomini de *p,p'*-DDT tant al sediment com al biofilm, en ambdós casos amb concentracions que dupliquen les del metabòlit següent (*p,p'*-DDD). L'ordre de concentracions dels metabòlits dels DDTs l'encapçala aquest compost per davant dels DDDs (formats en ambient anòxic) i finalment els DDEs. Això suggereix una aportació recent de DDT a la llera del riu, perquè la concentració del metabòlit parental supera la concentració mitjana d'1 ppm. Tant al sediment com al biofilm, la distribució d'isòmers d'HCHs és semblant amb predomini del β-HCH. Tampoc s'observen variacions molt importants entre els congèneres de PCBs. La concentració total mitjana és més alta en el biofilm que en els sediments però el patró de distribució és pràcticament igual en les dues matrius. A les dues matrius els tres congèneres menys volàtils PCB-138, PCB-153 i PCB-180 són els majoritaris.

S'ha considerat que la resta d'organismes de la xarxa tròfica de l'embassament es trobaven en les mateixes condicions davant la gran quantitat de COPs dels fangs. A la part baixa de la cadena alimentària hi ha molts compostos que es troben per sota dels límits de detecció i quantificació. A més, les concentracions mitjanes de tots els compostos són molt baixes, sobretot al fitoplàncton, zooplàncton i a les plantes macròfitas. En tots aquests casos les concentracions d'HCB oscil·len entre 0.02 i 0.1 µg/g, la suma d'HCHs entre 0.01 i 0.1 µg/g, la suma de DDTs entre 0.03 i 0.6 µg/g i la suma de PCBs entre 0.03 i 0.2 µg/g.

Els organismes filtradors o consumidors primaris, com el musclo zebra (*Dreissena polymorpha*) i el cranc de riu americà (*Procambarus clarkii*) tenen concentracions més grans per tots els grups de COPs estudiats. En tots els casos menys els DDTs, les concentracions mitjanes són lleugerament més altes en el cranc de riu que en el musclo zebra però sense grans diferències. Les concentracions d'HCB són de 2.7 i 2.2 µg/g, respectivament. Els HCHs tenen valors de 0.3 i 0.2 µg/g, respectivament. Els DDTs són més alts al musclo zebra que al cranc de riu, amb mitjanes de 5.2 i 10.2 µg/g, respectivament. Per altra banda, els PCBs es troben en concentracions de 4.0 i 3.4 µg/g, respectivament. Aquests últims valors estan en consonància amb altres estudis (Goerke et al., 1979).

Les espècies de peix capturades a l'embassament de Flix mostren concentracions molt diferents. Les espècies situades més amunt de la xarxa tròfica, silur (*Silurus glanis*) i carpa (*Cyprinus carpio*), tenen les concentracions més altes per a tots els COPs. De fet, a les carpes es troben les concentracions més altes de clorobenzens (PeCB i HCB) amb concentracions mitjanes de 1.6 µg/g i 26.4 µg/g, respectivament. Els silurs, en canvi, tenen concentracions més altes de DDTs,

HCHs i PCBs que les trobades als peixos més planctívors. D'altra banda les concentracions dels clorobenzens (PeCB i HCB) són més baixes. D'aquesta forma, la gambusia (*Gambusia holbrooki*), el rutil (*Rutilus rutilus*) i el gardí (*Scardinius erythrophthalmus*) tenen concentracions de PeCB i HCB del mateix ordre de magnitud que els silurs. Contràriament, en el cas dels COPs de major per molecular les concentracions són menors que als silurs i les carpes, fet que és coherent amb una biomagnificació dins de la xarxa tròfica. En relació a la distribució dels metabòlits de DDT no s'han trobat grans diferències entre espècies, amb un predomini clar del *p,p'*-DDE, seguit del *p,p'*-DDD. Malgrat això, la suma de DDDs ha superat la de DDEs en aquelles espècies més bentívores (rutil, gardí i carpa). Cal destacar també la presència de certa quantitat de *p,p'*-DDT a les mostres de silurs en comparació amb la resta d'espècies. Per altra banda, els PCBs mostren diferències entre les espècies més petites i la resta. A les primeres hi ha un predomini de congèneres més volàtils (sobretot PCB-28 i PCB-52), mentre que a les carpes i els silurs predominen els tres congèneres més pesants (PCB-138, PCB-153 i PCB-180). Aquests resultats s'associen a un tipus de dieta diferent segons cada una de les espècies.

Pel que fa referència al nivell tròfic superior de l'embassament, els ocells, s'han analitzat els ous de les aus que s'hi reproduïxen i s'alimenten principalment de peixos i crancs de riu durant aquest període. Les concentracions més altes s'han trobat pels DDTs i PCBs, 6.8 i 10 µg/g, de concentracions mitjanes, respectivament. Aquestes concentracions dupliquen les trobades als peixos planctívors però són del mateix ordre o inferiors a les de les carpes i silurs. Pel que fa a l'HCB i HCHs, els valors són molt baixos. En aquest cas però, la distribució dels metabòlits de DDT és clarament diferent a la resta d'espècies, amb un predomini clar del *p,p'*-DDE que representa més del 95% del total. En canvi, la distribució dels congèneres de PCBs segueix el mateix patró que les carpes o silurs, amb una presència major dels congèneres més pesats, PCB-138, PCB-153 i PCB-180.

Els factors de biomagnificació (FBM) s'han calculat tenint en compte les concentracions trobades a cada organisme en relació amb la seva dieta. En aquest estudi, tots els FBM trobats són majors que 1 (amb l'excepció d'algun compost a les mostres d'ou de l'agró roig) i per tant, es demostra que hi ha un increment important de les concentracions de COPs al llarg de la xarxa tròfica. Els FBM positius oscil·len entre 1 i 145 tot considerant tots els grups de COPs analitzats. S'han trobat valors molt alts pels consumidors primaris en comparació amb els depredadors situats més amunt de la xarxa tròfica. Cal destacar que els FBM són més baixos (entre 0 i 10) per tots compostos en els dos principals depredadors del nostre estudi: el silur i l'agró roig. Els valors són menors per aquells compostos més volàtils (PeCB, HCB i suma d'HCHs). En canvi per aquells grups de compostos amb diversos isòmers, metabòlits o congèneres, els FBM són baixos però més uniformes entre espècies. Aquests resultats indiquen

que tot i que els depredadors tenen les concentracions mitjanes més altes per a quasi tots els COPs estudiats, els factors de biomagnificació són més grans als consumidors primaris, i per tant es produeix un increment menor a les posicions tròfiques superiors.

El balanç global dels resultats indica que els DDTs són el grup principal de contaminants en el 62% dels organismes. L'HCB el que ocupa aquesta posició en el 21% de les mostres (sobretot a 3 espècies de peix), finalment la suma d'HCHs representa les concentracions més altes en un 7% (fitoplàncton) i la suma de PCBs en un altre 7% (a les aus). Aquests resultats són coherents amb la distribució d'aquests grups de contaminants en el medi. Els DDTs es troben a l'embassament de Flix i sobretot abunden les seves formes metabolitzades (DDD i DDEs). Són contaminants amb un temps de residència molt alt i per això és normal trobar-los en abundància a la majoria de mostres. En relació a l'HCB, s'ha trobat una concentració molt alta d'aquests compostos als sediments de la llera del riu, i per tant les espècies piscícoles més bentòniques són les que presenten concentracions més altes. En el cas del fitoplàncton, els HCHs, que són els contaminants més solubles en aigua, i per tant més biodisponibles per aquests organismes. Finalment, tot i que moltes mostres d'ous d'ocell tinguin els PCBs com el contaminant major, la diferència amb els DDTs no és molt gran i aquests són els dos grans grups que es poden anar bioaccumulant i per tant biomagnificant amb gran facilitat dins de la xarxa tròfica.

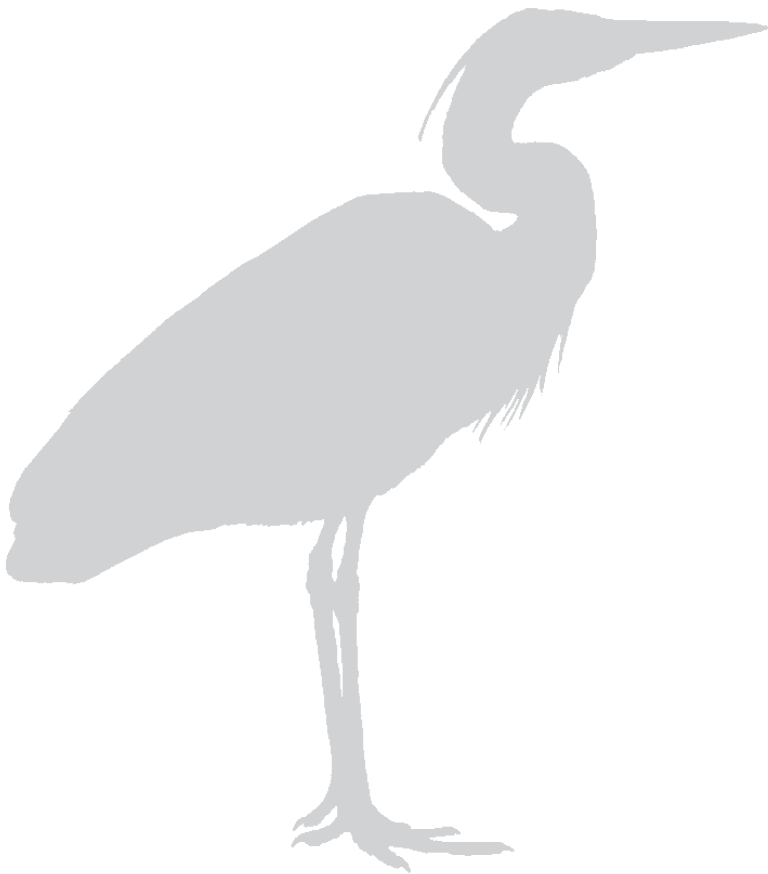
En relació als patrons de distribució dels isòmers, metabòlits i congèneres, els resultats indiquen que les distribucions dels DDTs també varien entre els diferents nivells tròfics. A la part baixa de la xarxa tròfica, els metabòlits més importants són els DDDs (tres espècies de macròfits i el musclo zebra). En el cranc de riu americà els DDTs són els metabòlits majoritaris, per davant dels DDDs i DDEs. Entre els peixos el grup majoritari és el dels DDDs a totes les espècies menys la gambusia i el silur, però a nivell individual el compost amb major concentració mitjana sempre és el *p,p'*-DDE. Finalment, entre les aus, el grup de metabòlits predominant és el format pels DDEs, per sobre dels DDTs i DDDs, respectivament. En aquest cas també predomina la presència del *p,p'*-DDE com a metabòlit principal. En el cas del patró dels HCHs, la diversitat de resultats és molt més gran ja que no es troben tots els isòmers a totes les mostres. En les mostres de la part baixa de la xarxa tròfica (zooplàncton i macròfits) només s'han observat alguns isòmers i amb concentracions molt baixes (inferiors a 0.01 µg/g). A partir dels consumidors primaris les concentracions creixen i s'observa una major presència dels isòmers β-HCH i γ-HCH. De totes formes, com a conseqüència de la poca presència d'aquests contaminants, no s'han calculat les diferències entre les distribucions d'isòmers al llarg de la xarxa tròfica.

En el cas dels PCBs sí que s'ha pogut observar que en general, la distribució de congèneres segueix el mateix patró a totes les mostres. Hi ha un predomini de compostos menys volàtils (PCB-138, PCB-153 i PCB-180) per sobre dels més volàtils (PCB-28, PCB-52 i PCB-101). De totes formes, aquests últims es troben en majors proporcions en algunes mostres de la part baixa de la xarxa tròfica (zooplàncton, principalment), segurament degut a la seva major solubilitat i facilitat d'absorció per part d'aquets organismes (Covaci et al., 2006). Aquest fenomen també s'observa en algunes mostres del cranc de riu americà i dels rutils. En aquests casos sembla que l'explicació més plausible és l'efecte del tipus de dieta que tenen aquests organismes.

Fent balanç de totes les mostres estudiades, en el 64% d'elles s'hi ha trobat el PCB-153 com a principal congènere. A la figura 4 de l'apartat 4.4.1, s'observa com aquesta tendència és molt més clara al musclo zebra, a la gambusia, a la carpa, al silur i sobretot a l'agró roig. Els PCBs totals tenen una tendència clara a incrementar la concentració a mesura que es puja dins de la xarxa tròfica, tot passant de concentracions pròximes a 0.1 µg/g en fitoplàncton, zooplàncton i macròfits, fins a mitjanes d'entre 3-18 µg/g trobades en peixos i aus. Això suposa increments entre 10 i 100 vegades a les concentracions des dels nivells tròfics inferiors cap als depredadors dins de l'embassament de Flix.

Capítol 6

CONCLUSIONS



El treball realitzat en aquesta tesi s'ha plantejat de cara a conèixer les concentracions de COPs que es troben en els diferents nivells tròfics de les xarxes fluvials del darrer tram del riu Ebre com a conseqüència de les activitats realitzades en el passat de la planta clor-àlcali de l'embassament de Flix. Les conclusions principals s'han descrit en els diversos articles que comporta la tesi. A continuació es resumeixen les conclusions més importants de cada apartat.

a) Concentracions de COPs als primers nivells tròfics de l'embassament de Flix

En general s'han observat unes concentracions molt altes d'alguns COPs en els primers nivells tròfics de l'embassament de Flix, especialment d'HCB, DDTs i PCBs a totes les mostres de sediment i biofilm analitzades. Això posa de manifest una influència clara dels sediments emmagatzemats a l'embassament de Flix sobre les espècies que hi habiten. El sediment i els biofilms flotants de la zona central del riu mostren les concentracions més altes de tots els COPs estudiats.

Els sediments constitueixen el focus de contaminació, i els biofilms s'hi troben adherits. S'observa que entre els nivells inferior de la cadena tròfica les concentracions de COPs augmenten a mesura que es consideren els diferents nivells tròfics (des del fitoplàncton fins al cranc de riu americà o el musclo zebra). Això és coherent amb les característiques fisico-químiques d'aquests compostos i planteja la necessitat d'estudiar en detall els nivells tròfics superiors per observar quines tendències segueixen les concentracions d'aquests contaminants als organismes de l'embassament de Flix (conclusions obtingudes pels objectius b, c i d).

El biofilm és la matriu biològica que pot tenir més rellevància en el transport de contaminació aigües avall de l'embassament de Flix, juntament amb el transport de partícules per arrossegament del propi riu. S'ha pogut observar que aquesta mobilització afecta als espècimens estudiats de rutils, carpes i silurs, en les que s'han trobat concentracions d'igual ordre de magnitud o fins i tot superiors a més de 100 quilòmetres aigües avall de l'embassament de Flix.

La comparació de resultats entre marges dins de l'embassament de Flix mostra que existeixen diferències significatives en aquelles espècies menys mòbils o sèssils. En tots els casos les concentracions de PeCB, HCB, DDTs i PCBs són majors com més aprop s'agafen les mostres dels sediments contaminats (tant en musclo zebra com al cranc de riu americà).



b) Concentracions de COPs en peixos de l'embassament de Flix i transport aigües avall del riu Ebre

Les concentracions de COPs trobades als peixos de l'embassament de Flix són molt altes per la influència dels sediments contaminats que es troben a la llera del riu. Entre els grups de COPs estudiats, en tres de les cinc espècies (rutil, gardí i gambusia) el total de PCEs és el més abundant, mentre que a les carpes predomina l'HCB. En canvi, a l'espècie més gran (silur) predominen els DDTs. De totes formes, tots aquests grups de contaminants juntament amb els PCBs es troben a totes les espècies.

En algunes de les mostres de silur i en una gran part de les carpes, rutils i gardins de l'embassament predominen els DDDs (*o,p'*-DDD i *p,p'*-DDD) amb concentracions superiors al conjunt dels DDEs (*o,p'*-DDE i *p,p'*-DDE), i DDTs (*o,p'*-DDT i *p,p'*-DDT). Aquesta distribució de metabòlits de DDT no s'observa a la resta de mostres recollides al llarg del tram baix del riu Ebre. A les zones on es troben sediments anaeròbics, com els embassaments, la reducció del DDT afavoreix la producció de DDD i aquest pot acabar acumulat als peixos. Les carpes, rutils i gardins, s'alimenten d'organismes que habiten en els sediments i tenen una major capacitat de bioacumulació d'aquests compostos. En canvi, en el cas dels silurs, la seva dieta i característiques físiques (longitud i pes) limita la bioacumulació d'aquests compostos.

Una altra característica d'aquestes espècies de carpa, rutil i gardí de l'embassament de Flix és el predomini dels congèneres més volàtils (PCB-28, PCB-52 i PCB-101) en relació als congèneres més pesats. Això no succeeix a les mostres recollides a la resta de localitats, on els congèneres menys volàtils (PCB-138, PCB-153 i PCB-180) són els que tenen concentracions més altes. Això suggereix que en zones molt contaminades (embassament de Flix), els compostos més volàtils es bioacumulen més fàcilment pel contacte directe entre organismes i focus de COPs mitjançant la fase dissolta de l'aigua, mentre que a les zones més allunyades del focus de contaminació, hi arriben fonamentalment els compostos més pesats associats a partícules i aquests són els que es concentren.

En el cas dels PCEs, s'ha observat una presència molt abundant del congènere OCE que predomina per sobre dels HxCEs a totes les espècies menys a la gambusia, on s'inverteix la tendència. La presència abundant d'aquests compostos a totes les mostres representa un element més que posa de manifest la influència de la planta cloro-àlcali sobre els peixos de l'embassament.

La comparació de les concentracions de COPs entre espècies (d'aquelles entre les que només s'ha estudiat el teixit muscular) ha permès establir que les carpes i els rutils tendeixen a acumular concentracions més altes d'aquests compostos que els gardins i silurs, respectivament.

Les concentracions d'HCB, PCBs i DDTs als silurs recollits al llarg dels darrers 100 quilòmetres del riu Ebre, aigües avall de l'Embassament de Flix, indiquen una influència de les descàrregues dutes a terme per la planta clor-àlcali. En el règim hidràulic d'aquesta darrera part del riu, sense afluents de gran cabdal, els compostos abocats aigües amunt (HCB, PCBs i DDTs) encara es troben en concentracions més altes que els silurs dels llocs de referència. Així, les concentracions dels individus capturats als canals, 1.2-27 ng/g ww per l'HCB, 6.3-100 ng/g ww pel total de PCBs i 1-270 ng/g ww pel total de DDTs, són molt més altes que en les mostres analitzades aigües amunt de la planta clor-àlcali, 0.2 ng/g ww per l'HCB, 5.6 ng/g ww pels PCBs i 7.5 ng/g ww pels DDTs a Ribaroja.

Les concentracions de COPs en els individus dels canals han mostrat valors més alts en comparació amb les mostres de la llera del riu. Malgrat això, els silurs capturats en zones amb corrents d'aigua baixos, com per exemple l'embassament de Ribaroja o els canals, tenen majors continguts lipídics (1.09-7.20%) que aquells que habiten àrees amb majors corrents d'aigua (0.27-0.67%). El silurs que viuen sota intensitats altes de corrents necessiten ser més actius que aquells que viuen en zones calmades i això es tradueix en una menor acumulació de lípids als teixits.

Aquestes diferències suggereixen que cal realitzar una normalització pel contingut lipídic al comparar les concentracions de COPs entre individus de sistemes fluvials amb diferents intensitats de corrent. Als silurs de les zones amb menor corrent, les concentracions de la majoria de COPs correlacionaven amb el contingut de lípids als múscles. D'aquesta forma, la normalització de les concentracions de COPs amb el contingut lipídic permet una distribució més uniforme de tots els valors mesurats al llarg del riu i la influència de les descàrregues de l'embassament de Flix. En aquest aspecte, les distribucions més uniformes del total de PCBs aigües avall són consistents amb un focus emissor puntual d'aquests compostos per als individus de silurs analitzats.

Les distribucions dels metabòlits del DDT es troben predominades pel *p,p'*-DDE, tal i com s'observa en la majoria de peixos de diversos ambients aquàtics. De totes formes, en aquests peixos hi ha una proporció relativament alta de *p,p'*-DDD and *o,p'*-DDD. Aquesta característica es troba generalment en barreges de DDT d'ambients anòxics i és consistent amb una contribució alta d'alimentació d'organismes bentònics.



A les carpes les concentracions de tots els COPs estudiats són molt més altes que als silurs. Els hàbits alimentaris d'aquesta espècie poden explicar aquest fenomen perquè es tracta d'una espècie molt bentívora. Les concentracions mitjanes d'HCB, DDTs i PCBs han estat 305, 222 i 129 ng/g, respectivament. En el cas dels clorobenzens (PeCB i HCB) s'ha observat una reducció clara de concentració des de l'embassament de Flix fins a Deltebre. Per aquests contaminants més volàtils sí que existeix un fenomen de disminució de concentracions a mesura que ens allunyem del focus contaminant. D'altra banda pels DDTs i PCBs s'observen concentracions mitjanes semblants entre l'embassament de Flix i el Meandre, tot arribant fins i tot a ser superiors en aquesta darrera localitat. Això es pot explicar per la proximitat de les dues zones de presa de mostra i sobretot per la baixa circulació d'aigua que hi ha a la zona del meandre, que permet l'acumulació de contaminants que provenen de l'embassament de Flix. Les concentracions trobades a Xerta i Deltebre encara són força elevades, per sobre de 50 ng/g. Això demostra que per aquelles espècies que s'alimenten o habiten prop dels sediments existeix una major exposició a l'acumulació dels COPs més persistents, que són els que es poden desplaçar distàncies més grans a través de les partícules arrossegades per la corrent del riu Ebre.

Tot això s'ha confirmat amb l'estudi de la darrera espècie, el rutil, amb una alimentació més planctívora i que també habita al bentos. Les concentracions d'HCB, suma de DDTs i PCBs són molt elevades a l'embassament de Flix amb mitjanes de 258, 95 i 82 ng/g. D'igual forma que per les carpes, en el cas de l'HCB existeix una gran reducció de concentracions entre les mostres de l'embassament i les de Xerta i Deltebre, però per la suma de DDTs i PCBs aquesta disminució és pràcticament nul·la. Les concentracions de DDTs a Xerta i Deltebre són iguals (45 ng/g), mentre que la concentració total de PCBs encara es manté en 25 ng/g a Deltebre. Això confirma que l'embassament de Flix té una influència important en les concentracions de COPs trobades en els organismes superiors (peixos) del tram inferior del riu Ebre.

c) Concentracions de COPs en ous d'ocells del riu Ebre

Les concentracions de compostos organoclorats trobats en els ous de l'agró roig analitzat a diferents punts de mostreig del tram final del riu Ebre ha mostrat una clara influència de les emissions de la planta clor-àlcali a tota l'àrea del voltant. Aquesta influència s'ha observat en forma d'altres concentracions de PCBs, *p,p'*-DDT, HCB, PeCB i PCEs en comparació amb el punt de referència, Aiguabarreig, situat aigües amunt. Els ous recollits al Delta de l'Ebre, tenien concentracions més altes del total de DDTs, principalment en forma de *p,p'*-DDE, que els de la zona de referència. Això podria indicar aplicacions d'aquest insecticida en el passat en aquesta àrea més agrícola.

En relació a la suma d'HCHs, les concentracions més elevades s'han trobat a les mostres d'ous del Delta i de l'Aiguabarreig en comparació amb les mostres de l'embassament de Flix, però les diferències no han estat estadísticament significatives. Aquests compostos van ser emprats com insecticides a l'agricultura però no van ser produïts a la planta clor-àlcali.

L'estudi dels ous d'agró roig que es reproduïxen a l'embassament de Flix demostra que tot i que siguin ocells migradors, la ingesta de COPs durant aquest període és suficient per bioacumular aquests compostos als ous de forma significativament diferent entre localitats influenciades o no per la fàbrica. A més, les concentracions de *p,p'*-DDE trobades en algunes mostres de Flix es troben per sobre dels límits establerts com a potencialment perillosos per a la reproducció en aquest tipus d'espècies i indiquen efectes genotòxics sobre els individus que habiten a l'embassament.

d) Concentracions i biomagnificació dels COPs dins de la xarxa tròfica de l'embassament de Flix

Les concentracions trobades als sediments i el biofilm de l'embassament de Flix són molt altes per a tots els COPs estudiats. Els valors mitjans són els més alts en aquest nivell tròfic per a tots els grups excepte en el cas dels PCBs, pels que s'han trobat concentracions més altes en altres nivells tròfics. En les mostres de sediment i biofilm el metabòlit principal del conjunt de DDTs és el *p,p'*-DDT. Això suggereix que hi ha una aportació recent d'aquest compost o que no existeix un procés de degradació eficient als sediments acumulats a la llera del riu, sigui per les condicions anòxiques dels sediments o per les grans concentracions d'aquest compost que s'hi ha dipositat.

L'estudi dels diferents nivells tròfics de l'embassament ha mostrat que existeix una tendència clara a la biomagnificació de tots els grups principals de COPs estudiats. Les concentracions s'incrementen des del fitoplàncton fins els nivells tròfics superiors (peixos i aus). Aquest increment de les concentracions és més clar pels DDTs i PCBs. En general, els productors primaris tenen concentracions molt baixes de tots els COPs. De fet, en aquest nivell, predomina el conjunt de DDTs tot i que, entre aquests, es troba una gran presència dels DDDs. Això s'explica per les condicions anòxiques dels llots acumulats a la llera de l'embassament de Flix, que no permeten una degradació aeròbica dels DDTs a DDEs. A més, aquests metabòlits tenen temps de residència més llargs en organismes i per això és més factible trobar-los als organismes vius (Goerke et al., 1979).



A un nivell superior, els consumidors primaris com el musclo zebra, el cranc de riu i algunes espècies de peix (gambusia, rutil i gardí) tenen concentracions molt més altes. Sobretot d'HCB, de DDTs i PCBs. La distribució dels metabòlits d'aquests compostos continua amb la tendència del nivell tròfic anterior.

A la part més alta de la xarxa tròfica, els consumidors secundaris (peixos depredadors i aus) tenen concentracions molt més altes d'HCB, DDTs i PCBs. Els compostos poc solubles i poc volàtils es transporten riu avall associats a les partícules i, per tant, es bioacumulen a tots els peixos que hi ha al llarg dels 100 km de riu aigües avall de l'embassament. Per aquests COPs, per exemple DDTs o PCBs pesants, no s'observen disminucions importants de concentracions en allunyar-se dels residus acumulats a l'embassament. En canvi, els compostos més volàtils i solubles en aigua com el PeCB i HCB només es troben en concentracions altes en les zones properes a l'embassament de Flix, les seves concentracions disminueixen aigües avall.

En el cas de l'embassament de Flix hem pogut constatar com els peixos omnívors més grans (carpes i silurs) tenen concentracions més altes que la resta de peixos, com a conseqüència dels seus hàbits alimentaris i la biomagnificació. Les concentracions més altes dels compostos més volàtils (PeCB i HCB) s'han trobat a les carpes mentre que als silurs és on hi ha més presència de DDTs i PCBs.

Els ous de les aus (que s'alimenten de crancs i peixos) s'observen unes concentracions de PCBs del mateix ordre de magnitud que en els peixos depredadors però aquestes són lleugerament inferiors per als DDTs. Ara bé, els compostos més volàtils com HCB no s'acumulen tant en aquestes matrius. Això es pot explicar per la major solubilitat en aigua i volatilitat d'aquest darrer compost i un procés de metabolització diferent.

A totes les espècies de peix de l'embassament de Flix s'han observat majors concentracions més altes dels DDDs per sobre dels DDTs i DDEs. Això no s'observa en les aus, on el metabòlit *p,p'*-DDE es troba en unes concentracions molt més grans que la resta. En l'ambient anòxic en què es troben els sediments acumulats sota l'aigua de l'embassament hi ha una reducció de DDT a DDD i els peixos ingereixen aquest metabòlit sigui per consum d'organismes i residus bentívors o d'altres peixos que ho han fet abans. D'altra banda, les aus, tot i que també tenen alimentació piscícola, bioacumulen i metabolitzen tot el DDT majoritàriament en forma de *p,p'*-DDE.

En general s'observa un clar efecte dels contaminants acumulats a l'embassament de Flix al llarg de tota la xarxa tròfica local. A partir d'uniques concentracions molt altes acumulades als

sediments i el biofilm associat, tots els organismes bioacumulen COPs. A mesura que es puja en els nivells tròfics, les concentracions de tots aquests compostos augmenten considerablement. D'aquesta forma, els peixos i les aus són els animals amb les concentracions mitjanes més altes d'HCB, DDTs i PCBs principalment.

Els FBM són molt alts pels compostos més volàtils (PeCB i HCB) amb un màxim de 145. D'altra banda, per als HCHs, DDTs i PCBs, els valors oscil·len entre 0.3 i 48. A l'embassament de Flix s'ha trobat que hi ha uns FBM més alts pels consumidors primaris en relació als grans depredadors, tot i que aquests últims són els que tenen les concentracions més altes de tots els COPs estudiats.

The work developed in this thesis has been focused on the assessment of the concentrations of organochlorine compounds that can be found at different levels of the food web in the last stretch of the Ebro River as consequence of the activities of the chlor-akali plant located at the Flix water reservoir. The conclusions have been reported within the papers published on occasion of this PhD work. Here there is a summary of the most relevant conclusions.

a) Concentrations of organochlorine compounds at the first food web levels in the Flix water reservoir

High concentrations of some organochlorine compounds have been found at the first food web levels of the Flix water reservoir, particularly HCB, DDTs and PCBs in all the sediment and biofilm samples analysed. These concentrations show a clear influence from the polluted sediments stored at the water reservoir in the species living there. Sediment and biofilm floating at the central part of the river had the highest concentrations of all organochlorine compounds.

Sediments are the known main pollution source and biofilms were directly adhered to them. In the sites in which different species were found, it has been observed that the concentrations of organochlorine compounds increased from phytoplankton to crayfish or zebra mussels. These differences are consistent with the physical-chemical properties of these compounds and indicates a need for the detailed study of higher trophic levels to analyse which differences and trends do POPs concentrations follow in the organisms of the Flix water reservoir (conclusions obtained for the objectives b, c and d).

Biofilm was the most relevant biological matrix for the downstream pollution transport. The other efficient transport mechanism was achieved by absorption to water suspended particles generated by river processes. These mechanisms have influenced some of the studied species such as roach, carp or European catfish. In these species concentrations of organochlorine compounds at 100 kilometres downstream from the Flix reservoir were observed to be of the same level or even higher than those found at the water reservoir.

Significant differences in concentrations of PeCB, HCB, DDTs and PCBs have been found in the low mobile or sessile species, e.g. crayfish and zebra mussel, located at the two sides of the water reservoir. The concentrations at the shore of the factory are higher being highest as closer are the organisms from the polluted sediments.

b) Concentrations of organochlorine compounds in fish from the Flix water reservoir and transport downstream the Ebro River

The concentrations of organochlorine compounds in the fish from the Flix water reservoir were high by comparison to studies in fish from other river systems. Predominance of different groups of compounds was observed between different species. In roach, rudd and mosquitofish, total PCSs were the most abundant while in carps HCB were predominant. In the European catfish DDTs were the most abundant compounds. However, all these compound groups and PCBs were found in all species.

In some European catfish specimens and in most carps, roaches and rudds from the Flix water reservoir a predominance of DDDs (*o,p'*-DDD and *p,p'*-DDD) over DDEs (*o,p'*-DDE and *p,p'*-DDE) and DDTs (*o,p'*-DDT and *p,p'*-DDT) was observed. This distribution of DDT metabolites was not observed in the other samples from the last stretch of the Ebro River and can be explained by the dominance of DDDs in sediments of anaerobic environments such as in some water reservoirs. The reduction of DDT leads to the formation of DDD. Carps, roaches and rudds mainly feed on benthic organisms which bioaccumulate these compounds. On the other hand, the diet and physical characteristics of European catfish limit the bioaccumulation of these compounds.

Another characteristic of carp, roach and rudd in the Flix water reservoir was the predominance of the most volatile PCBs congeners, PCB-28, PCB-52 and PCB-101, in comparison with the most chlorinated congeners. This trend was not found in the specimens downriver in whom the less volatile PCBs congeners, PCB-138, PCB-153, PCB-180, predominated in the distributions of these compounds. This difference suggests that in heavy polluted sites such as the Flix water reservoir, the more volatile compounds are easily bioaccumulated by direct contact between fish and the pollution source through the dissolved phase, while in the sites located far from the pollution source only less volatile compounds associated to particles are found and can be bioconcentrated by fish.

Within the distributions of PCSs, it was observed a predominance of OCS over HxCSs in all species except in mosquitofish, in which the trend was the opposite. The presence of these compounds in all samples was again consistent with the influence of the chlor-alkali plant in fish inhabiting the Flix water reservoir.

Cross-comparison of the concentrations of organochlorine compounds in muscle from these fish species showed that carps and roaches accumulated higher concentrations of PeCB, HCB, DDTs and PCBs than rudds and European catfish, respectively.

The concentrations of HCB, PCBs and DDT compounds in the European catfish collected downstream along a river stretch encompassing the last 100 km of the Ebro River reflected the past discharges of these compounds from this factory. In the hydraulic regime of this last stretch, without tributaries of significant flow, the compounds released 100 km upstream, e.g. HCB, PCBs and DDTs, were still found at concentrations above those of the catfish from the reference sites. Thus, the concentrations in the specimens from the irrigation channels, 1.2-27 ng/g ww of HCB, 6.3-100 ng/g ww of total PCBs and 1-270 ng/g ww of total DDT compounds, are much higher than in those collected upstream the chlor-alkali discharge site, 0.2 ng/g ww for HCB, 5.6 ng/g ww for PCBs and 7.5 ng/g ww for DDTs in the Ribarroja reservoir.

The concentrations of organochlorine compounds in the specimens collected in the channels showed higher concentrations than those found in the specimens from the river bed sites. However, European catfish collected in sites under lower water flow, e.g. Ribarroja reservoir and the irrigation channels after the weir of Xerta, showed higher muscle lipid content, 1.09-7.20%, than those from higher current intensity sites such as those in the river bed, 0.27%-0.67%. Catfish living under high current intensities need to be more active than those in calm waters to stay in their habitats and this is likely reflected in lower lipid accumulation.

These differences suggest that normalization to lipid content is necessary for comparison of the OC accumulation in specimens from riverine systems living under different flow intensities. In the European catfish from the areas under lower water flow, the wet weight concentrations of most OCs were correlated to muscle lipid content. Accordingly, normalization of the OC concentrations to lipid content provides a more uniform distribution of all OC values measured along the river and the influence of the discharges in the Flix reservoir downriver. In this respect, the uniform distributions of PCB congeners downriver are consistent with a single main source of these compounds for the studied European catfish specimens.

The distributions of DDT compounds are predominated by *p,p'*-DDE, as commonly observed in many fish distributions from aquatic environments. However, in these fish there is a high relative proportion of *p,p'*-DDD and *o,p'*-DDD. This feature is generally found in DDT mixtures from anoxic environments and is consistent with a high dietary contribution of benthic organisms.

The concentrations of all organochlorine compounds in carps were higher than in European catfish. Diet habits of this species can explain these differences because they are benthic. The mean concentrations of HCB, DDTs and PCBs were 305, 222 and 129 ng/g, respectively. The chlorobenzenes, PeCB and HCB, in this species showed a decrease in concentrations from the Flix water reservoir to Deltebre. In contrast, the concentrations of total DDTs and PCBs were similar at the Flix water reservoir and the Meander, with some samples reaching higher concentrations in this last site. This can be explained by the short distance between the sampled sites and particularly the low water circulation in the Meander that allow the accumulation of pollutants from the Flix water reservoir. The concentrations found at Xerta and Deltebre are still high, with values above 50 ng/g, which is consistent with the accumulation of the less volatile and water soluble organochlorine compounds in the sediments where this fish species feed.

The results observed in roach paralleled those found in carps. The concentrations of HCB, total DDTs and PCBs were high at Flix water reservoir samples with mean values of 258, 95 and 82 ng/g, respectively. A high decrease in concentrations from Flix samples to Xerta and Deltebre was found for HCB, but those for the total DDTs were still high (45 ng/g) and total PCBs and in Deltebre were 25 ng/g. These concentrations confirmed that the pollutants dumped in the Flix water reservoir influenced significantly on the concentrations of organochlorine compounds in fish from the last stretch of the Ebro River.

c) Concentrations of POPs in bird eggs from the Ebro River

The concentrations of organochlorine compounds found in purple heron eggs in selected locations of the last stretch of the Ebro River showed a clear influence of the emissions of the chlor-alkali plant in the area located nearby this installation. This influence was reflected in higher concentrations of PCBs, *p,p'*-DDT, HCB, PeCB and PCSs than in a reference site, Aiguabarreig, situated upstream of this pollution source. The heron eggs collected in the Ebro Delta showed higher concentrations of total DDTs, mainly *p,p'*-DDE, than in the reference site which could reflect past applications of this insecticide in the area for agriculture.

In contrast, HCHs were found in higher concentrations in the Delta and the reference site than in the Flix Reservoir but the differences were not statistically significant. These compounds were used as insecticides in agriculture and were not manufactured in the chlor-alkali plant.

The results showed that despite purple herons are migratory birds, the food web transfer of organochlorine compounds during the breeding season was sufficient for the accumulation of these compounds in the eggs leading to statistically significant concentration differences

between sites. These differences were consistent with the emissions of these pollutants from industrial or agricultural sources to the aquatic environments. Some of the *p,p'*-DDE concentrations observed in the area nearby the chlor-alkali plant were above the threshold effects for reproductive impairment.

d) Concentrations and biomagnification of POPs inside the food web from the Flix water reservoir

As mentioned above, the concentrations of most studied organochlorine compounds in the sediments and biofilm from the Flix water reservoir were high. The mean values were the highest in this trophic level for all groups except the PCBs, for which higher concentrations have been found in other trophic levels. At both sediment and biofilm samples the main DDT metabolite was the *p,p'*-DDT. The predominance of this compound suggests possible recent inputs or a lack of efficient degradation processes in the sediments accumulated in the riverbed, either as consequence of anoxic conditions or by the high amounts of this metabolite dumped at this site.

The study of the different trophic levels inside the Flix water reservoir showed a trend towards biomagnification of all analysed organochlorine compounds. The concentrations were observed to increase from phytoplankton up to the highest trophic levels, fish and birds. This increment of concentrations was even better defined for DDTs and PCBs. Overall, primary producers had lower concentrations of all compounds. In these organisms, DDTs were predominant and these distributions were characterized by high relative concentrations of DDDs. The presence of these compounds can be explained by the anoxic conditions of the sediments accumulated in the river bed inside the Flix water reservoir that did not allow the aerobic degradation of DDTs into DDEs. In addition, these metabolites have longer residence times in organisms and they are easier to be found in living organisms (Goerke et al., 1979).

In a higher trophic level, primary consumers such as zebra mussel, crayfish and some fish species (mosquitofish, roach and rudd) had much higher concentrations. Particularly, in the case of HCB, DDTs and PCBs. The distribution of metabolites and congeners of these compounds followed the same trend as in the previous trophic level.

At higher levels within the food web, the secondary consumers (predator fish and birds) had higher concentrations of HCB, DDTs and PCBs. The less volatile and soluble compounds were transported downstream in association to the particulate matter and then were bioaccumulated in fish along the last 100 km of the Ebro River. Compounds such as DDTs or the less volatile

PCBs did not show concentration decreases in samples far away from the polluted water reservoir. On the other hand, the more volatile and soluble compounds such as PeCB and HCB only showed high concentrations in the specimens collected close to the Flix water reservoir and the polluted sediments. Their concentrations decreased considerably downstream.

At the Flix water reservoir, the largest omnivorous fish such as carps and European catfish had higher concentrations than the other fish as consequence of their diet habits and biomagnification processes. Higher concentrations of more volatile compounds (PeCB and HCB) had been found in carps while in European catfish the dominant compounds were DDTs and PCBs.

Bird eggs from species feeding crayfish and fish had total PCBs concentrations of the same order of magnitude than the fish predators but the concentrations were lower for the total DDTs. On the other hand, the more volatile compounds such as HCB were not bioaccumulated in bird eggs. This can be explained for their high solubility in water and volatility and different metabolization processes.

Higher concentrations of DDDs than DDTs and DDEs were found in all fish species from the Flix water reservoir. In contrast, in bird eggs, the main metabolite was *p,p'*-DDE in much higher concentrations than the other metabolites. Inside the anoxic environment where the sediments lay at the riverbed at the Flix water reservoir there is a reduction of DDT to DDD and fish ingest this metabolite from organisms, benthic residues or from other fish included in their diet. Conversely, birds feeding on fish bioaccumulated and metabolized all DDT mainly into *p,p'*-DDE.

In general, increases of the pollutants deposited inside the Flix water reservoir can be observed along the local food webs as consequence of the bioaccumulation of these compounds in the organisms of the different trophic levels. In this way, fish and bird eggs exhibit the highest mean concentrations of HCB, DDTs and PCBs.

The biomagnification factors (BMFs) are very high for the most volatile compounds (PeCB and HCB) with a maximum value of 145. On the other hand, total HCHs, DDTs and PCBs have values that range between 0.3 and 48. At the Flix water reservoir the BMFs are higher for the primary consumers in relation with the factors of the highest predators. However these last organisms are those with highest concentrations of all organochlorine compounds studied.



Capítol 7

BIBLIOGRAFIA



A

- Aloísio Torres, M., Pires Testa, C., Gáspari, C., Beatriz Masutti, M., Maria Neves Panitz, C., Curi-Pedrosa, R., Alves De Almeida, E., Di Mascio, P., Wilhelm Filho, D. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 44, 923–932.
- Amaral, O.C., Otero, R., Grimalt, J.O., Albaigés, J. 1996. Volatile and semi-volatile organochlorine compounds in tap and riverine waters in the area of influence of a chlorinated organic solvent factory. *Water Research*. 30, 1876-1884.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 76, 160–202.
- Amico, V., Oriente, G., Piatelli, M., Tringali, C. 1979. Concentrations of PCBs, BHCs and DDTs residues in seaweeds of the East Coast of Sicily. *Marine Pollution Bulletin*. 10, 177-179.
- Antoniadou, V., Konstantinou, I.K., Goutner, V., Sakellarides, T.M., Albanis, T.A., Bintoudi, E. 2007. PCB levels and accumulation patterns in waterbird eggs and in their prey at lake Kerkini, a North-Eastern Mediterranean wetland of international importance. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53, 249-260.
- Aurigi, S., Focardi, S. Hulea, D., Renzoni, A. 2000. Organochlorine contamination in bird's eggs from the Danube Delta. *Environmental Pollution*. 109, 61-67.

B

- Bachour, G., Failing, K., Georgii, S., Elmadfa, I., Brunn, H. 1998. Species and organ dependence of PCB contamination in fish, foxes, roe deer and humans. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35, 666-673.
- Bailey, R.E. 2001. Global hexachlorobenzene emissions. *Chemosphere*. 43, 167 –182.
- Baker, S.D., Sepúlveda, M.S. 2009. An evaluation of the effects of persistent environmental contaminants on the reproductive success of Great Blue Herons (*Ardea herodias*) in Indiana. *Ecotoxicology*. 18, 271-280.
- Ballschmiter, K. i Zell, M. 1980. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography - Composition of technical aroclor- and Clophen-PCB mixtures. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*. 302, 20-31.



- Barata, C., Solayan, A., Porte, C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorous (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*. 66, 125–139.
- Barata, C., Lekumberri, I., Vila-Escalé, M., Prat, N., Porte, C. 2005. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquatic Toxicology*. 74, 3–19.
- Barber, J.L., Sweetman, A.J., van Wijk, D., Jones, K.C. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment*. 349, 1-44.
- Barron, M.C. 1990. Bioconcentration. *Environmental Science and Technology*. 24, 1612-1618.
- Bazzanti, M., Chiavarini, S., Cremisini, C., Soldati, P. 1997. Distribution of PCB congeners in aquatic ecosystems: a case study. *Environmental International*. 23, 799-813.
- Bebiano, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Meldoni, A. 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiulus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquatic Toxicology*. 75, 354–373.
- Belpaire, C., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K. 2008. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science*. 65, 1483-1491.
- Benejam, L., Benito, J., Ordóñez, J., Armengol, J., García-Berthou, E. 2008. Short-term effects of a partial drawdown on fish condition in a eutrophic reservoir. *Water, Air and Soil Pollution*. 190, 3–11.
- Berdie, L., Grimalt, J.O. 1998. Assessment of the sample handling procedures in a laborsaving method for the analysis of organochlorine compounds in a large number of fish samples. *Journal of Chromatography*. 823, 373–380.
- Bernes, C. 1998. Persistent Organic Pollutants. *Swedish Environmental Protection Agency*.
- Bester, K., Biselli, S., Ellerichmann, T., Hühnerfuss, H., Möller, K., Rimkus, G., Wolf, M. 1998. Chlorostyrenes in fish and sediment samples from the River Elbe. *Chemosphere*. 37, 2459-2471.
- Biernacki, M., Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L., 1995b. Sediment effects on the uptake of trichloroethylene by roots and leaves in *Vallisneria americana*. In: Lake Huron Ecosystem: Ecology Fisheries and Management. *Ecovision World Monograph Series*. SPB Academic Publishing, The Netherlands.

- Binelli, A., Provini, A. 2003. DDT is still a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. *Chemosphere*. 52, 717–723.
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A. 2006. New evidences for old biomarkers: effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*. 62, 510–519.
- Binelli, A., Galassi, S., Mariani, M. 1996. Uso di un mollusco bivalve (*Dreissena polymorpha*) per il biomonitoraggio di composti organoclorurati nella parte terminale del fiume Po. *Acqua Aria*. 7-8, 689-696.
- Blanchard, M., Teil, M.J., Carru, A.M., Chesterikoff, A., Chevreuil, M. 1997. Organochlorine distribution and mono-ortho substituted PCB pattern in the roach (*Rutilus rutilus*) from the river Seine. *Water Research*. 6, 1455-1461.
- Blus, L.J., DDT, DDD and DDE in birds. In: Beyer, N.W., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W. 1996. Environmental contaminants in Wildlife-Interpreting tissue concentrations. *Lewis Publishers*, Boca Raton, pp.49-71.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D., Regoli, F. 2008. Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*. 89, 257–266.
- Boon, J.P., Lewis, W.E., Tjoen-A-Choy, M.R., Allchin, C.R., Law, R.J., de Boer, J., Ten-Hallers Tjabbes, C.C., Zegers, B.N. 2002. Levels of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in animals representing different trophic levels of the North Sea food web. *Environmental Science and Technology*. 36, 4025– 4032.
- Boonyatumanond, R., Jaksakul, A., Pancharoen, P., Tabucanon, M.S. 2002. Monitoring of organochlorine pesticides residues in green mussels (*Perna viridis*) from the coastal area of Thailand. *Environmental Pollution*. 119, 245-252.
- Borga, K., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U. 2001. Biomagnification of organochlorines along a Barents sea food chain. *Environmental Pollution*. 113, 187-198.
- Borga, K., Fisk, A.T., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G. 2004. Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23, 2367–2385.
- Bosch, C., Olivares, A., Faria, M., Navas, J.M., del Olmo, I., Grimalt, J.O., Piña, B., Barata, C., 2009. Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal

toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry. *Aquatic Toxicology*. 94, 16–27.

Bouwman, H., Polder, A., Venter, B., Skaare, J.U. 2008. Organochlorine contaminants in cormorant, darter, egret and ibis eggs from South Africa. *Chemosphere*. 71, 227-241.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248–254.

Braune, B.M., Outridge, P.M., Fisk, A.T., Muir, D.C.G., Helm, P.A., Hobbs, K., Hoekstra, P.F., Kuzyk, Z.A., Kwan, M., Letcher, R.J., Lockhart, W.L., Norstrom, R.J., Stern, G.A., Stirling, I. 2005. Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: An overview of spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*. 351-352, 4-56.

Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J.M., Jones, K.C. 2002. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners—a mass balance approach: 1. Global production and consumption. *Science of the Total Environment*. 290, 181–198.

Brieger, G., Hunter, R.D., 1993. Uptake and depuration of PCB 77, PCB 169 and hexachlorobenzene by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 26, 153–165.

Bruner, K.A., Fisher, S.W., Landrum, P.F., 1994. The role of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in contaminant cycling. *Journal of Great Lakes Research*. 20, 735–750.

Burreau, S., Zebühr, Y., Broman, D., Ishaq, R. 2006. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Science of the Total Environment*. 366, 659-672.

C

Cabistañ, J., 2003. Iniciación a la pesca del siluro. Ed. Tikal.

Camusso, M., Balestrini, R., Binelli, A., 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere*. 44, 263–270.

Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquatic Toxicology*. 46, 67–76.

Carol, J., Benejam, L., Pou-Rovira, Q., Zamora, L., García-Berthou, E., 2003. First record of white bream (*Abramis bjoerkna*) in Catalonia (Spain) and new introductions of exotic fish

- Alburnus alburnus*, *Sander lucioperca* and *Silurus glanis* into Catalan river basins. *Institució Catalana.d'Història Natural*. 71, 135–136.
- Carol, J., Benejam, L., Alcaraz, C., Vila-Gispert, A., Zamora, L., Navarro, E., Armengol, J., García-Berthou, E. 2006. The effects of limnological features on fish assemblages of 14 spanish reservoirs. *Ecology of Freshwater Fish*. 15, 66-77.
- Carol, J., Zamora, L., García-Berthou, E. 2007. Preliminary telemetry data on the movement patterns and habitat use of European catfish (*Silurus glanis*) in a reservoir of the River Ebro, Spain. *Ecology of Freshwater Fish*. 16, 450–456.
- Carol, J., Benejam, L., Benito, J., García-Berthou, E. 2009. Growth and diet of European catfish (*Silurus glanis*) in early and late invasion stages. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*. 174, 317-328.
- Carrasco, L., D.ez, S., Soto, D.X., Catalan, J., Bayona, J.M., 2008. Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. *Science of the total environment*. 407, 178–184.
- Carrizo, D., Grimalt, J.O. 2009. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of polychlorostyrene congener mixtures in sediments, human sera and cord sera. *Journal of Chromatography*. 1216, 5723-5729.
- Carson, R. 1962. Silent spring. *Houghton-Mifflin*, New York.
- Carvalho, F. 1995. ²¹⁰Pb and ¹⁰Po in sediments and suspended matter in the Tagus estuary, Portugal. Local enhancement of natural levels by wastes from phosphate ore processing industry. *The Science of the Total Environment*. 159, 201-214.
- Catalan, J., Ventura, M., Vives, I., Grimalt, J.O., 2004. The roles of food and water in the bioaccumulation of organochlorine compounds in high mountain lake fish. *Environmental Science and Technology*. 38, 4269–4275.
- Chambers, J.E., Ma, T., Scott Boone, J., Chambers, H.W., 1994. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sciences*. 54, 1357–1364.
- Champoux, L., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Trudeau, S., Hontela, A., Boily, M., Spear, P., 2002. Assessment of contamination and biomarker responses in two species of Herons on the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment*. 79, 193–215.
- Champoux, L., Rodrigue, J., Trudeau, S., Boily, M.H., Spear, P.A., Hontela, A., 2006. Contamination and biomarkers in the great blue heron, an indicator of the state of the St. Lawrence River. *Ecotoxicology*. 15, 83–96.



- Cheng, D.X., Yang, Z.Z., Wang, X.T., Sun, Y.Z., Xu, X.B., 2006. Organochlorine pesticides in tissues of Catfish (*Silurus asotus*) from Guanting reservoir, People's Republic of China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 76, 766–773.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J., 2002. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*. 45, 181–191.
- Chevreuil, M., Carru, A.M., Chesterikoff, A., Boët, P., Tales, E., Allardi, J. 1995a. Contamination of fish from different areas of the river Seine (France) by organic (PCB and pesticides) and metallic (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn) micropollutants. *Science of the Total Environment*. 162, 31-42.
- Chevreuil, M., Granier, L., Carru, A.M. 1995. Relationship between biological parameters and bioaccumulation of some organochlorines (pesticides, PCB) by fishes in the river Seine (France). *Water, Air, & Soil Pollution*. 81, 107-120.
- Chu, I., Secours, V.E., Villeneuve, D.C., Valli, V.E. 1982. Acute and subacute toxicity of octachlorostyrene in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 10, 285-296.
- Chu, S., Covaci, A., Voorspoels, S., Schepens, P. 2003. The distribution of octachlorostyrene (OCS) in environmental samples from Europe. *Journal of Environmental Monitoring*. 5, 619-625.
- Claisse, D., 1989. Chemical contamination of French coasts: the results of 10 years mussel watch. *Marine Pollution Bulletin*. 20, 523–528.
- Clark, K.E., Gobas, F.A., Mackay, D., 1990. Model of organic chemical uptake and clearance by fish from food and water. *Environmental Science and Technology*. 24, 1203–1213.
- Coelhan, M., Reil, I., Rimkus, G., Parlar, H. 2000. Peak patterns of chlorostyrenes in fish and fish oils from the North Atlantic. *Environmental Science and Technology*. 34, 4695-4700.
- Connell, D.W., Fung, C.N., Minh, T.B., Tanabe, S., Lam, P.K.S., Wong, B.S.F., Lam, M.H.W., Wong, L.C., Wu, R.S.S., Richardson, B.J. 2003. Risk to breeding success of fish-eating ardeids due to persistent organic contaminants in Hong Kong: evidence from organochlorine compounds in eggs. *Water Research*. 37, 459-467.
- Company, R., Serafim, A., Cosson, R.P., Fiala-Médioni, A., Camus, L., Colaço, A., Serrao-Santos, R., Bebianno, M.J., 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *Science of the Total Environment*. 389, 407–417.

- Connell, D.W., Fung, C.N., Minh, T.B., Tanabe, S., Lam, P.K.S., Wong, B.S.F., Lam, M.H.W., Wong, L.C., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., 2003. Risk to breeding success of fish-eating Ardeids due to persistent organic contaminants in Hong Kong: evidence from organochlorine compounds in eggs. *Water Research*. 37, 459–467.
- Cooke, A.S., Bell, A.A., Prestt, I. 1976. Egg shell characteristics and incidence of shell breakage for grey herons *Ardea cinerea* exposed to environmental pollutants. *Environmental Pollution*. 11, 59-84.
- Copp, G.H., Britton, J.R. Cucherousset, J., García-Berthou, E., Kirk, R., Peeler, E., Stakènas, S. 2008. Voracious invader or benign feline? A review of the environmental biology of European catfish (*Silurus glanis*) in its native and introduced ranges. *Fish and Fisheries*. 10, 1-31.
- Cordi, B., Fossi, C., Depledge, M., 1997. Temporal biomarker responses in wild passerine birds exposed to pesticide spray drift. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16, 2118–2124.
- Corsolini, S., Nigro, M., Olmastroni, S., Focardi, S., Regoli, F., 2001. Susceptibility to oxidative stress in Adelie and emperor penguin. *Polar Biology*. 24, 365–368.
- Courtney, K.D. 1979. Hexachlorobenzene (HCB): A review. *Environmental Research*. 2, 225-266.
- Covaci, A., Gheorghe, A., Hulea, O., Schepens, P., 2006. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. *Environmental Pollution*. 140, 136-149.
- Custer, T.W., Hines, R.K., Melancon, M.J., Hoffman, D.J., Wickliffe, J.K., Bickham, J.W., Martin, J.W., Henshel, D.S. 1997. Contaminant concentrations and biomarker response in great blue heron eggs from 10 colonies on the upper Mississippi River, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16, 260-271.
- Custer, T.W., Pendleton, G., Ohlendorf, H. 1990. Within-clutch and among-clutch variation of organochlorine residues in eggs of black-crowned night-herons. *Environmental Monitoring and Assessment*. 15, 83-90.
- Custer, T.W., Custer, C.M., Eichhorst, B.A., Warburton, D., 2007. Selenium and metal concentrations in waterbird eggs and chicks at Agassiz National Wildlife Refuge, Minnesota. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 53, 103–109.
- Custer, T.W., Golden, N.H., Rattner, B.A., 2008. Element patterns in feathers of nestling black-crowned night-herons, *Nycticorax nycticorax* L., from four colonies in Delaware,



Maryland, and Minnesota. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 81, 147–151.

Custer, T.W., Custer, C.M., Hines, R.K. 2002. Dioxins and congener-specific polychlorinated biphenyls in three avian species from the Wisconsin River, Wisconsin. *Environmental Pollution*. 119, 323-332.

D

De Cruz, I., Mougín, C., Grolleau, G. 1997. Chlorinated hydrocarbons in eggs of Grey Heron (*Ardea cinerea*) in France (Lac de Grandlieu). *Chemosphere*. 5, 1003-1009.

De la Cal, A., Eljarrat, E., Raldúa, D., Durán, C., Barceló, D. 2008. Spatial variation of DDT and its metabolites in fish and sediment from Cinca River, a tributary of Ebro River (Spain). *Chemosphere*. 70, 1182-1189.

De Lafontaine, Y., Gagne, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the StLawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*. 50, 51–71.

De Luca-Abbott, S.B., Wong, B.S.F., Peakall, D.B., Lam, P.K.S., Young, L., Lam, M.H.W., Richardson, B.J. 2001. Review of effects of water pollution on the breeding success of waterbirds with particular reference to Ardeids in Hong Kong. *Ecotoxicology*. 10, 327-349.

Devaux, A., Monod, G. 1987. PCB and p,p'-DDE in Lake Geneva brown trout (*Salmo trutta L.*), and their use as bioenergetic indicators. *Environmental Monitoring and Assessment*. 9, 105-114.

Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2001. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere*. 45, 553–560.

Dieter, M.P., 1974. Plasma enzyme activities in Coturnix quail fed graded doses of DDE, polychlorinated biphenyl, malathion and mercuric chloride. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 27, 86–98.

Dodder, N.G., Strandberg, B., Hites, R.A. 2002. Concentrations and spatial variations of polybrominated diphenyl ethers and several organochlorine compounds in fishes from the Northeastern United States. *Environmental Science and Technology*. 36, 146-151.

- Doherty, F. G., Evans, D. W., and Neuhauser, E. F. 1993. An assessment of total and leachable contaminants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from lake Erie. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 25, 328-340.
- Dong, Y.H., Wang, H., An, Q., Ruiz, X., Fasola, M., Zhang, Y.M. 2004. Residues of organochlorinated pesticides in eggs of water birds from Tai Lake in China. *Environmental Geochemistry and Health*. 26, 259-268.
- Duursma, E.K., Nieuwenhuize, J., van Liere, J.M., 1984. Organochlorine contamination of the Dutch delta region as 'watched' by mussels. *Water Science and Technology*. 16, 619-622.

E

- Edwards, P.R., Hrycak, E.G., Bandiera, S.M., 2007. Differential inhibition of hepatic microsomal alkoxyresorufin O-dealkylation activities by tetrachlorobiphenyls. *Chemico-Biological Interactions*. 169, 42-52.
- Elliott, J.E., Butler, R.W., Norstrom, R.J., Whitehead, P.E. 1989. Environmental contaminants and reproductive success of great blue herons (*Ardea herodias*) in British Columbia, 1986-87. *Environmental Pollution*. 59, 91-114.
- Elvira, B., Almodovar, A., 2001. Freshwater fish introductions in Spain: facts and figures at the beginning of 21st century. *Journal of Fish Biology*. 59 (Suplement A), 323-331.
- Engelken, J., Hildebrandt, A., 1999. cDNA cloning and cadmium-induced expression of metallothionein mRNA in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Biochemistry and Cell Biology*. 77, 237-241.
- ERCROS. 2008. Centenari de "La Fàbrica". Societat Electro-Química de Flix a Erkimia, 1897-1997.
- Erdogrul, O., Covaci, A., Schepens, P. 2005. Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaras, Turkey. *Environment Internacional*. 31, 703-711.
- Erickson, M.D. 1992. Analytical Chemistry of PCBs. Second Edition. *Lewis Publishers*.
- Ernst, W., Weigelt, V., Weber, K. 1984. Octachlorostyrene – A permanent micropollutant in the North Sea. *Chemosphere*. 13, 161.168.
- Escartin, E., Porte, C., 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 34, 160-164.



Escartin, E., Porte, C., 1997. The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16, 2090–2095.

European Commission. Institute for Prospective Technological Studies, 2008. Integrated pollution prevention and control (IPCC). Reference document on best available techniques in the chlor-alkali manufacturing industry (178 pp.).

F

Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C., 2009. Multibiomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149C, 281–288.

Faria, M., Huertas, D., Soto, D.X., Grimalt, J.O., Catalan, J., Riva, M.C., Barata, C. 2010. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain). *Chemosphere*. 78, 232-240.

Farrington, J.W., Goldberg, E.D., Risebrough, R.W., Martin, J.H., Bowen, V.T. 1983. U.S. “Mussel Watch” 1976-1978: An overview of the trace-metal, DDE, PCB, Hydrocarbon, and artificial radionuclide data. *Environmental Science and Technology*. 17, 490-496.

Fasola, M., Movalli, P.A., Gandini, C. 1998. Heavy metal, organochlorine pesticide and PCB residues in eggs and feathers of herons breeding in Northern Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34, 87-93.

Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., Porte, C., 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environmental Research*. 90, 169–178.

Fernández, M.A., Alonso, C., González, M.J., Hernández, L.M., 1999. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere*. 38, 33–43.

Fernández, P., Grimalt, J.O., Vilanova, R.M. 2002. Atmospheric gas-particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in high mountain regions of Europe. *Environmental Science and Technology*. 36, 1162-1168.

- Fernández, P., Grimalt, J.O. 2003. On the global distribution of Persistent Organic Pollutants. *Chimia*. 57, 514-521.
- Fisher, S.W., Gossiaux, D.C., Bruner, K.A., Landrum, P.F. 1993. Investigations of the toxicokinetics of hydrophobic contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In: Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), *Zebra Mussels: Biology, Impacts and Control*. Lewis Publishers, Boca Raton. 465–490.
- Fisk, A.T., Norstrom, R.J., Cymbalisty, C.D., Muir, D.C.G. 1998. Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17, 951-961.
- Fisk, A.T., Hobson, K.A., Norstrom, R.J. 2001. Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the Northwater Polynya marine food web. *Environmental Science and Technology*. 35, 732–738.
- Focardi, S., Leonzio, C., Fossi, C. 1988. Variations of polychlorinated biphenyl congener composition in eggs of Mediterranean water birds in relation to their position in the food chain. *Environmental Pollution*. 52, 243-255.
- Fossi, M.C., Massi, A., Leonzio, C., 1994. Blood esterase inhibition in birds as an index of organophosphorus contamination: field and laboratory studies. *Ecotoxicology*. 3, 11–20.
- Fossi, M.C., Lari, L., Casini, S., 1996. Interspecies variation of “B” esterases in birds: the influence of size and feeding habits. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 31, 525–532.
- France, R. 1996. Ontogenetic shift in crayfish $\delta^{13}\text{C}$ as a measure of land-water ecotonal coupling. *Oecologia*. 107, 239-242.
- Franson, J.C., Hoffman, D.J., Schmutz, J.A., 2002. Blood selenium concentrations and enzyme activities related to glutathione metabolism in wild emperor geese. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21, 2179–2184.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*. 10, 360–375.
- Furness, R.W., Camphuysen, K., 1997. Seabirds as monitors of the marine environment. *ICES Journal of Marine Science*. 54, 726–737.

G

- Galassi, S., Binelli, A., Provini, A., 1997. Dreissena polymorpha come bioindicatore della contaminazione da PCB nelle acque lacustri. *Acqua Aria*. 2-97, 61-65.
- Galassi, S., Guzzella, L., Battezzore, M., Carrieri, A., 1994. Biomagnification of PCBs, p, p'-DDE and HCB in the River Po ecosystem (Northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 29, 174-186.
- Gari, M., Bosch, C., Grimalt, J.O., Sunyer, J., 2014. Impacts of atmospheric chlor-alkali factory emissions in surrounding populations. *Environment International*. 65, 1-8.
- Gerstenberger, S.L., Gallinat, M.P., Dellinger, J.A. 1997. Polychlorinated biphenyl congeners and selected organochlorines in Lake Superior fish, USA. *Environmental Contamination and Toxicology*. 16, 2222-2228.
- Giese, F., Krüger, A. 1992. Biomonitoring of organochlorines in surface waters of Berlin and the Lake Stechlin. In: Neumann, D., Jenner, H.A. (Eds.), *The Zebra Mussel, Dreissena polymorpha*. Gustav Fischer Verlag Publishers, New York. 245-254.
- Gitahi, S.M., Harper, D.M., Muchiri, S.M., Tole, M.P., Nganga, R.N., 2002. Organochlorine and organophosphorus pesticide concentrations in water, sediment, and selected organisms in Lake Naivasha (Kenya). *Hydrobiologia*. 488, 123-128.
- Gobas, F.A.P.C., Wilcockson, J.B., Russel, R.W., Haffner, G.D., 1999. Mechanism of biomagnification in fish under laboratory and field conditions. *Environmental Science and Technology* 33, 133-141.
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The mussel watch. *Environmental Conservation*. 5, 101-125.
- Goerke, H., Eder, G., Weber, K., Ernst, W., 1979. Patterns of organochlorine residues in animals of different trophic levels from the Weser Estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 10, 127-133.
- Gonzalez-Martin, M., Ruiz, X., Llorente, G.A., 1992. Breeding parameters, feeding habits and nestling growth in a recovering population of purple herons from the Ebro Delta, Spain. *Miscel.lania Zoologica*. 16, 147-160.
- González-Sagrario, M.A., Miglioranza, K.S.B., Aizpún de Moreno, J.E., Moreno, V.J., Escalante, A.H. 2002. Polychlorinated biphenyls in different trophic levels from a shallow lake in Argentina. *Chemosphere*. 48, 113-1122.

- Gramatica, P., Consolaro, F., Pozzi, S. 2001. QSAR approach to POPs screening for atmospheric persistence. *Chemosphere*. 43, 655-664.
- Grimalt, J.O., Gómez-Belinchón, J.I., Llop, R., Albaigés, J. 1988. Water-phase distribution of hexachlorobenzene in a deltaic environment (Ebro Delta, Western Mediterranean). *Chemosphere*. 17, 1893-1903.
- Grimalt, J.O., Fernandez, P., Berdié, L., Vilanova, R.M., Catalan, J., Psenner, R., Hofer, R., Appleby, P.G., Rosseland, B.O., Lien, L., Massabuau, J.C., Battarbee, R.W., 2001. Selective trapping of organochlorine compounds in mountain lakes of temperate areas. *Environmental Science and Technology*. 35, 2690–2697.
- Grimalt, J.O., Sánchez-Cabeza, J.A., Palanques, A., Catalan, J. 2003. Estudi de la dinàmica dels compostos organoclorats persistents i altres contaminants en els sistemes aquàtics continentals. Barcelona.
- Grimalt, J.O., Sunyer, J., Moreno, V., Amaral, O.C., Sala, M., Rosell, A., Antó, J.M., Albaigés, J. 1994. Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content. *International Journal of Cancer*. 56, 200-203.
- Grimalt, J.O., van Drooge, B.L., 2006. Polychlorinated biphenyls in mountain pine (*Pinus uncinata*) needles from Central Pyrenean high mountains (Catalonia, Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 63, 61–67.
- Guillén, J. i A. Palanques. 1992. Sediment dynamics and hydrodynamics in the lower course of a river highly regulated by dams: the Ebro River. *Sedimentology*. 39 (4), 567-579.
- Guitart, R., Puig, P., Gómez-Catalán, J. 1993. Requirement for a standardized nomenclature criterium for PCBs: computer-assisted assignment of correct congener denomination and numbering. *Chemosphere*. 27, 1451-1459.

H

- Hanari, N., Kannan, K., Horii, Y., Taniyasu, S., Yamashita, N., Jude, D.J., Berg, M.B., 2004. Polychlorinated naphthalenes and polychlorinated biphenyls in benthic organisms of a Great Lakes food chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 47, 84–93.
- Hattula, M.L., Janatuinen, J., Särkkä, J., Paasivirta, J. 1978. A five-year monitoring study of the chlorinated hydrocarbons in the fish of a Finnish lake ecosystem. *Environmental Pollution*. 15, 121-139.

- Heberer, T., Dünnbier, U. 1999. DDT metabolite bis(Chlorophenyl)acetic acid: the neglected environmental contaminant. *Environmental Science and Technology*. 33, 2346-2351.
- Henny, C.J., Hill, E.F., Hoffman, D.J., Spalding, M.G., Grove, R.A., 2002. Nineteenth century mercury: hazard to wading birds and cormorants of the Carson River, Nevada. *Ecotoxicology*. 11, 213–231.
- Henny, C.J., Anderson, T.W., Crayon, J.J., 2008. Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, metals, and trace elements in waterbird eggs, Salton Sea, California, 2004. *Hydrobiologia*. 604, 137–149.
- Herzke, D., Kallenborn, T., Nygard, R. 2002. Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: congener-, isomer- and enantiomer specific considerations. *Science of the Total Environment*. 291, 59-71.
- Hickey, J.J., Anderson, D.W. 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds. *Science*. 162, 271-273.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J.C., Molina, J.A., Esbr., J.M., Lorenzo, S., 2006. The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Science of the Total Environment*. 356, 112–124.
- Hinck, J.E., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Echols, K.R., Gale, R.W., Wieser, C., May, T.W., Ellersieck, M., Coyle, J.J., Tillitt, D.E. 2008. Chemical contaminants, health indicators and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. *Science of the total environment*. 390, 538-557.
- Hinck, J.E., Norstrom, R.J., Orazio, C.E., Schmitt, C.J., Tillit, D.E., 2009. Persistence of organochlorine chemical residues in fish from the Tombigbee River (Alabama, USA): continuing risk to wildlife from a former DDT manufacturing facility. *Environmental Pollution*. 157 (2), 582–591.
- Hoffman, D.J., Spalding, M.G., Frederick, P.C., 2005. Subchronic effects of methylmercury on plasma and organ biochemistries in great egret nestlings. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24, 3078–3084.
- Holmqvist, N., Stenroth, P., Berglund, O., Nyström, P., Graneli, W., Larsson, P. 2007. Persistent organic pollutants (POP) in a benthic omnivore – A comparison between lake and stream crayfish populations. *Chemosphere*. 66, 1070-1078.
- Hope, B., Scatolini, S., Titus, E., Cotter, J. 1997. Distribution patterns of polychlorinated biphenyl congeners in water, sediment and biota from Midway Atoll (North Pacific Ocean). *Marine Pollution Bulletin*. 34, 548-563.

Hopple, J.A. i Foster, G.D. 1996. Hydrophobic organochlorine compounds sequestered in submersed aquatic macrophytes (*Hydrilla verticillata* (L.F.) royle) from the tidal potomac river (USA). *Environmental pollution*. 94, 39-46.

J

Jacoff, F.S., Scarberry, R., Rosa, D. 1986. Source assessment of hexachlorobenzene from the organic chemical manufacturing industry. In: Morris C.R., Cabral, J.R.P. Hexachlorobenzene: proceedings of an international symposium. 77. *IARC Sci. Publ.* p. 31-37. Lyon.

Jaspers, V.L.B., Covaci, A., Voorspoels, S., Dauwe, T., Eens, M., Schepens, P. 2006. Brominated flame retardants and organochlorine pollutants in aquatic and terrestrial predatory birds of Belgium: levels, patterns, tissue distribution and condition factors. *Environmental Pollution*. 139, 340-352.

Jensen, S., Johnels, A.G., Olsson, M., Otterlind, G. 1969. DDT and PCB in marine animals from Swedish waters. *Nature*. 224, 247-250.

K

Karr, J.R., 1999. Defining and measuring river health. *Freshwater Biology*. 41, 221–234.

Kaminsky, R. i Hites, A. 1984. Octachlorostyrene in Lake Ontario: sources and fates. *Environmental Science and Technology*. 18, 275-274.

Khaled, A., El Nemr, A., Said, T.O., El-Sikaily, A., Abd-Alla, A.M.A. 2004. Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in mussels from the Egyptian Red Sea coast. *Chemosphere*. 54, 1407-1412.

Kuehl, D.W. 1981. Unusual polyhalogenated chemical residues identified in fish tissue from the environment. *Chemosphere*. 10, 231-242.

Kim, J., Koo, T.-H., 2008. Heavy metal distribution in chicks of two heron species from Korea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 54, 740–747.

Kim, S.K., Oh, J.R., Shim, W.J., Lee, D.H., Yim, U.H., Hong, S.H., Shin, Y.B., Lee, D.S. 2002. Geographical distribution and accumulation features of organochlorine residues in bivalves from coastal areas of South Korea. *Marine Pollution Bulletin*. 45, 268-279.

- Kim, S.R., Kim, T.H., Ryu, S.Y., Lee, H.J., Oh, H., Jo, S.K., Oh, K.S., Park, I.C., Kim, J.C., Kang, C.M., Kim, S.H., 2003. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. *In Vivo*. 17, 433–438.
- Klyszejko, B., Ciereszko, W. 1999. Absorption of polychlorinated biphenyls (PCBs) through gills and skin of common carp (*Cyprinus carpio L.*). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*. 29, 99-108.
- Koeman, J. H., ten Noever de Brauw, M. C., and de Vos, R. H. *Nature (London)*. 221, 1126.
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. Handbook of European freshwater fishes. *Publications Kottelat, Cornol and Freyhof*, Berlin.
- Kraak, M.H.S., Scholten, M.C.T., Peeters, W.H.M., de Kock, W.C., 1991. Biomonitoring of heavy metals in the western European Rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution*. 74, 101–114.
- Kuehl, D.W. Kopperman, H.L., Veith, G.D., Glass, G.E. 1976. Isolation and identification of polychlorinated styrenes in Great Lakes fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 16, 127-132.

L

- Lacorte, S., Raldúa, D., Martinez, E., Navarro, A., Diez, S., Bayona, J.M., Barceló, D. 2006. Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). *Environmental Pollution*. 140, 471-482.
- Lavado, R., Ure.a, R., Martin-Skilton, R., Torreblanca, A., del Ramo, J., Rald.a, D., Porte, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environmental Pollution*. 139, 330–339.
- Lecoeur, S., Videmann, B., Berny, P., 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research*. 94, 184–191.
- Lehmann, D.W., Levine, J.F., Law, J.M., 2007. Polychlorinated biphenyl exposure causes gonadal atrophy and oxidative stress in *Corbicula fluminea* clams. *Toxicologic Pathology*. 35, 356–365.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminated-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 656–666.

- Loganathan, B.G., Kannan, K., Watanabe, I., Kawano, M., Irvine, K., Kumar, S., Sikka, H.C. 1995. Isomer-specific determination and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls, polychlorinated/brominated dibenzodioxins and dibenzofurans, polybrominated biphenyl ethers, and extractable organic halogen in carp from the Buffalo River, New York. *Environmental Science and Technology*. 29, 1832-1838.
- Lohmann, R., Breivick, K., Dachs, J., Muir, D. 2007. Global fate of POPs: current and future research directions. *Environmental pollution*. 150, 150-165.
- Lohse, J. 1988. Ocean incineration of toxic wastes: a footprint in North Sea sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 19, 366-371.
- Lommel, A., Kruse, H., Müller, E., Wassermann, O. 1992. Organochlorine pesticides, octachlorostyrene, and mercury in the blood of Elb River residents, Germany. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 22, 14-20.
- Lovett-Doust L., Lovett-Doust, J., Biernacki, M. 1994. American wildcelery, *Vallisneria americana*, as a biomonitor of organic contaminants in aquatic ecosystems. *Journal of Great Lakes Research*. 20, 333-54.
- Lunde, G. i Bjorseth, A. 1977. Human blood samples as indicators of occupational exposure to persistent chlorinated hydrocarbons. *The Science of the Total Environment*. 8, 241-246.
- Lunde, G. i Ofstad, E.B. 1976. Determination of fat-soluble chlorinated compounds in fish. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*. 282, 395-399.

M

- MacFarlane, G.R., Schreider, M., McLennan, B., 2006. Biomarkers of heavy metal contamination in the red fingered marsh crab, *Parasesarma erythodactyla*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 51, 584-593.
- Mackay, D. Correlation of bioconcentration factors. 1982. *Environmental Science and Technology*. 16, 274-278.
- Malik, R.N., Rauf, S., Mohammad, A., Akber Shah Eqani, S.A.M., Ahad, K. 2011. Organochlorine residual concentrations in cattle egret from the Punjab Province, Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment*. 173, 325-341.
- Manchester-Neesvig, J.B., Valters, K., Sonzogni, W.C. 2001. Comparison of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in lake Michigan salmonids. *Environmental Science and Technology*. 35, 1072-1077.



- Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment*. 71, 187–205.
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.P., Boudou, A., 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *Biometals*. 19, 399–407.
- Marsalek, P., Weiss, V., Kolečka, J. 2004. Chlorinated hydrocarbon residues in fish from Nové Mlýny reservoirs along Dyje River, Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*. 73, 275-281.
- McEwen, L.C., Stafford, C.J., Hensler, G.L. 1984. Organochlorine residues in eggs from black-crowned night-herons from Colorado and Wyoming. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 3, 367-376.
- McIntyre, J.K. i Beauchamp, D.A. 2007. Age and trophic position dominate bioaccumulation of mercury and organochlorines in food web of Lake Washington. *Science of the Total Environment*. 372, 571-584.
- Mersch, J., Jeanjean, A., Spor, H., Pihan, J.-C., 1992. The freshwater mussel *Dreissena polymorpha* as a bioindicator for trace metals, organochlorines and radionuclides. In: Neumann, D., Jenner, H.A. (Eds.), *The Zebra Mussel, Dreissena polymorpha*. Gustav Fischer Verlag, New York. 245–254.
- Metcalf, R.L. 1973. A century of DDT. *Journal of agricultural and food chemistry*. 21, 511-519.
- Metcalf, T.L., Metcalfe, C.D. 1997. The trophodynamics of PCBs including mono and non-ortho congeners in the food web of north-Central Lake Ontario. *Science of the Total Environment*. 201, 245–72.
- Miglioranza, K.S.B., de Moreno, J.E.A., Moreno, V.J. 2004. Organochlorine pesticides sequestered in aquatic macrophyte *Schoenoplectus californicus* (C.A. Meyer) Soják from a shallow lake in Argentina. *Water Research*. 38, 1765-1772.
- Ministerio de Medio Ambiente. 2001. Localización i evaluación de una nueva invasión biológica: el mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en el Ebro. Dirección General para la Conservación de la Naturaleza.
- Moermond, C.T., Roozen, F.C.J.M., Zwolsman, J.J.G., Koelmans, A.A. 2004. Uptake of sediment-bound bioavailable polychlorobiphenyls by benthivorous carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology*. 38. 4503-4509.
- Montone, R.C., Taniguchi, S., Sericano, J., Weber, R.R., Lara, W.H. 2001. Determination of polychlorinated biphenyls in Antarctic macroalgae *Desmarestia* sp. *The Science of the Total Environment*. 277, 181-186.

- Montuori, P., Jover, E., Díez, S., Ribas-Fito, N., Sunyer, J., Triassi, M., et al. 2006. Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Science of the Total Environment*. 369, 51–8.
- Muir, D., Braune, B., DeMarch, B., Norstrom, R., Wagemann, R., Lockhart, L., Hargrave, B., Bright, D., Addison, R., Payne, J., Reimer, K., 1999. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review. *Science of the Total Environment*. 230, 83–144.
- Muñoz P. 1994. Alemanys a l'Ebre, La colònia química alemanya de Flix (1897-1994). El Mèdol. Tarragona.
- Murvoll, K.M., Skaare, J.U., Moe, B., Anderssen, E., Jenssen, B.M., 2006. Spatial trends and associated biological responses of organochlorines and brominated flame retardants in hatchlings of North Atlantic kittiwakes (*Rissa tridactyla*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 1648–1656.

N

- Navarro, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D. 2010. Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro river Basin. *Journal of Hidrology*. 383, 5–17
- Navarro, A., Tauler, R., Lacorte, S., Barceló, D. 2010b. Occurrence and transport of pesticides and alkylphenols in water samples along the Ebro River Basin. *Journal of Hidrology*. 383, 18-29.
- Newton I, Berkhamsted T, Poyser AD. 1979. Population ecology of raptors. 399.
- Niesink, R., J. de Vries, et al. 1996. Toxicology: Principles and Applications. *CRC Press*.
- Niimi, A.J., Oliver, B.G. 1989. Distribution of polychlorinated biphenyl congeners and other halocarbons in whole fish and muscle among Lake Ontario salmonids. *Environmental Science and Technology*. 23, 81-88.

O

- O'Connor, T.P. 1998. Mussel watch results from 1986 to 1996. *Marine Pollution Bulletin*. 37, 14-19.
- Ofstad, E.B., Lunde, G., Martinsen, K. 1978. Chlorinated aromatic hydrocarbons in fish from an area polluted by industrial effluents. *The Science of the Total Environment*. 10, 219-230.

Ohlendorf, H.M., Marois, K.C. 1990. Organochlorines and selenium in California night-heron and egret eggs. *Environmental Monitoring and Assessment*. 15, 91-104.

Omurtag, G.Z., Tozan, A., Aehirli, A.O., Aener, G., 2008. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *Journal of Pineal Research*. 44, 432–438.

P

Pacyna, J.M., Breivik, K., Munch, J., Fudala, J. 2003. European atmospheric emissions of selected persistent organic pollutants, 1970–1995. *Atmospheric Environment*. 37(S1), 119-31.

Pain, D.J., Burneleau, G., Bavoux, C., Wyatt, C. 1999. Levels of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, mercury and lead in relation to shell thickness in marsh harrier (*Circus aeruginosus*) eggs from Charente-Maritime, France. *Environmental Pollution*. 104, 61-68.

Painter, S., 1990. Ecosystem health and aquatic macrophytes: status and opportunities. Symposium of the aquatic ecosystem health and management society, July.

Palanques, A. 2011. La problemàtica de l'embassament de Flix. Diagnosi i solucions. Fòrum Flix.

Palanques, A., Grimalt, J.O., Belzunces, M., Estrada, F., Puig, P., Guillén, J. 2014. Massive accumulation of highly polluted sedimentary deposits by river damming. *Science of the Total Environment*. 497-498, 369-381.

Pan, J., Yang, Y.L., Xu, Q., Chen, D.Z., Xi, D.L. 2007. PCBs, PCNs and PBDEs in sediments and mussels from Qingdao coastal sea in the frame of current circulations and influence of sewage sludge. *Chemosphere*. 66, 1971-1982.

Parkyn, S.M., Collier, K.J., Hicks, B.J. 2001. New Zealand stream crayfish: functional omnivores but trophic predators? *Freshwater Biology*. 46, 641-652.

Pastor, A., Hernández, F., Medina, J., Melero, R., López, F.J., Conesa, M. 1988. Organochlorine pesticides in marine organisms from the Castellón and Valencia coasts of Spain. *Marine Pollution Bulletin*. 19, 235-238.

Pastor, D., Sanpera, C., González-Solís, J., Ruiz, X., Albaigés, J. 2004. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere*. 55, 567-576.

- Pastor, D., Jover, L., Ruiz, X., Albaigés, J. 1995. Monitoring organochlorine pollution in Audouin's Gull eggs: the relevance of sampling procedures. *The Science of the Total Environment*. 162, 215-223.
- Phillips, D.J.H., 1980. Quantitative Aquatic Biological Indicators. Their Use to Monitor Trace Metal and Organochlorine Pollution. *Applied Science*, London.
- Pikkarainen, A.L. 2007. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in Baltic Sea sediments and bivalves. *Chemosphere*. 68, 17-24.
- Provini, A., Galassi, S. 1999. Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in bird 563 eggs from Calabria (Southern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 43, 91-97.
- Provini, A., Binelli, A., Galassi, S. 1997. Ruolo di *Dreissena polymorpha* nel ciclo dei nutrienti e dei PCB nel bacino occidentale del Lago di Como. *Documenta dell'Instituto italiano di idrobiologia*. 61, 117-133.
- Pyysalo, H., Wickström, K., Litmanen, R. 1983. A baseline study on the concentrations of chlordane-, PCB- and DDT- compounds in Finnish fish samples in the year 1982. *Chemosphere*. 12, 837-842.

Q

- Quemerais, B., Lemieux, C., Lum, K.R., 1994. Temporal variation of PCB concentrations in the St. Lawrence river (Canada) and four of its tributaries. *Chemosphere*. 28, 947-959.
- Quiroz, R. 2009. Estudio de Contaminantes Orgánicos Persistentes en zonas de alta montaña. *Tesi Doctoral*.
- Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., Piña, B. 2008. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environmental Pollution*. 155, 81-87.

R

- Raldúa, D., Fernando, P., Duran, C., Pedrocchi, C. 1997. The influence of place of capture, sex and season on the organochlorine pesticide content in barbel (*Barbus graellsii*) from Northeastern Spain. *Chemosphere*. 35, 2245-2254.
- Ramdahl, T. i Carlberg, G.E. 1986. Analysis of chlorinated styrenes in environmental samples using negative ion chemical ionization mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*. 48, 147-155.



- Rankin, G.O., Racine, C., Sweeney, A., Kraynie, A., Anestis, D.K., Barnett, J.B., 2008. In vitro nephrotoxicity induced by propanil. *Environmental Toxicology*. 23, 435–442.
- Regoli, F., 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology*. 50, 351–361.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquatic Toxicology*. 68, 167–178.
- Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Fattorini, D., Gorbi, S., 2005. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquatic Toxicology*. 75, 43–52.
- Regoli, F., Principato, G., 1995. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis* exposed to metals under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 31 143–164.
- Reichel, W.L., Prouty, R.M., Gay, M.L. 1977. Identification of polychlorinated styrene compounds in heron tissues by gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 60, 60-63.
- Risebrough, R., de Lappe, B., Walker II, W., Simoneit, B.R.T., Grimalt, J.O., Albaigés, J., García, J., Ballester, A., Mariño, M. 1983. Application of the Mussel Watch Concept in studies of the distribution of hydrocarbons in the coastal zone of the Ebro Delta. *Marine Pollution Bulletin*. 14, 181-187.
- Riva, C., Binelli, A., Provini, A., 2008. Evaluation of several priority pollutants in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the largest Italian subalpine lakes. *Environmental Pollution*. 151, 652–662.
- Roe, S.L. i MacIsaac, H.J. 1998. Temporal variation of organochlorine contaminants in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* in Lake Erie. *Aquatic Toxicology*. 41, 125-140.
- Rostad, C.E. 1997. From the 1988 drought to the 1993 flood: transport of halogenated organic compounds with the Mississippi River suspended sediment at Thebes, Illinois. *Environmental Science and Technology*. 31, 1308-1312.
- Rosseland, B.O., Rognerud, S., Massabuau, J.C., Hofer, R., Grimalt, J.O. 2003. Protocol for fish sampling: test fishing, fish physiology, fish histology, heavy metals, organic micropollutants. *Molar*.

Rutzke, M.A., Gutenmann, W.H., Lisk, D.J., Mills, E.L., 2000. Toxic and nutrient element concentrations in soft tissues of zebra and quagga mussels from Lakes Erie and Ontario. *Chemosphere*. 40, 1353–1356.

S

Salvadó J.A., Grimalt, J.O., López, J.F. 2012. Rapid and simplified method for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, lipid biomarkers and organochlorine compounds in marine settling particles. *Microchimica Acta*. 179, 131-139.

Sakellarides, T.M., Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Lambropoulou, D., Dimou, A., Albanis, T.A. 2006. Accumulation profiles of persistent organochlorines in liver and fat tissues of various waterbird species from Greece. *Chemosphere*. 63, 1392-1409.

Saponjic, J.S., Borkovic, S.S., Kovacevic, T.B., Pavlovic, S.Z., Labus-Blagojevic, S.D., Blagojevic, D.P., Saicic, Z.S., Radojicic, R.M., Zikic, R.V., Spasic, M.B., 2006. Activity of antioxidant defense enzymes in the Mediterranean Sea shrimp (*Parapenaeus longirostris*): relation to the presence of PCBs and PAHs in the south Adriatic Sea. *Periodicum Biologorum*. 108, 117–125.

Sapozhnikova, Y., Zubcov, N., Hungerford, S., Roy, L.A., Boicenco, N., Zubcov, E., Schlenk, D. 2005. Evaluation of pesticides and metals in fish of the Dniester River, Moldova. *Chemosphere*. 60, 196-205.

Schilderman, P.A.E.L., Moonen, E.J.C., Maas, L.M., Welle, I., Kleinjans, J.C.S. 1999. Use of crayfish in biomonitoring studies of environmental pollution of the River Meuse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44, 241-252.

Shen, L., Wania, F. 2005. Compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for organochlorine pesticides. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 50, 742-768.

Simonich, S.L., Hites, R.A. 1995. Global distribution of Persistent Organochlorine Compounds. *Science*. 269, 1851-1854.

Squadrone, S., Favaro, L., Prearo, M., Vivaldi, B., Brizio, P., Abete, M.C., 2013. NDL-PCBs in muscle of the European catfish (*Silurus glanis*): an alert from Italian Rivers. *Chemosphere*. 93, 521–525.

- Soto, D.X., Roig, R., Gacia, E., Catalan, J. 2011. Differential accumulation of mercury and other trace metals in the food web components of a reservoir impacted by a chlor-alkali plant (Flix, Ebro River, Spain): implications for biomonitoring. *Environmental Pollution*. 159, 1481-1489.
- Stancheva, M., Georgieva, S., Makedonski, L., 2013. Persistent organic pollutants — PCBs and DDTs in fish from the Danube River and from the Black Sea, Bulgaria. CBU International Conference on Integration and Innovation in Science and Education (Prague).
- Stohs, S.J., Bagghi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology Medicine*. 18, 321–336.
- Stoncius, D., Lazutka, J.R., 2003. Spontaneous and benzo[a]pyrene-induced micronuclei in the embryos of the black-headed gull (*Larus ridibundus* L.). *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 538, 31–39.
- Strum, K.M., Alfaro, M., Haase, B., Hooper, M.J., Johnson, K.A., Lanctot, R.B., Lesterhuis, A.J., López, L., Matz, A.C., Morales, C., Paulson, B., Sandercock, B.K., Svobodova, Z., Zlabek, V., Randak, T., Machova, Z., Kolarova, J., Hajslova, J., Suchan, P., Dusek, L., Jarkovsky, J. 2004. Profiles of PCBs in tissues of marketable Common Carp and bottom sediments from selected ponds in South and West Bohemia. *Acta Veterinaria Brno*. 73, 133-142.

T

- Tanabe, S., Prudente, M.S., Kan-atireklap, S., Subramanian, A. 2000. Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean and Coastal Management*. 43, 819-839.
- Tarkpea, M., Hagen, I., Carlberg, G.E., Kolsaker, P., Storflor, H. 1985. Mutagenicity, acute toxicity and bioaccumulation potential of six chlorinated styrenes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 35, 525, 530.
- ten Noever de Brauw, M.C. i Koeman, J.H. 1972/1973. Identification of chlorinated styrenes in cormorant tissues by a computerized gas chromatography-mass spectrometry system. *The Science of the Total Environment*. 1, 427-432.
- Terrado, M., D. Barcelo, et al. 2006. Identification and distribution of contamination sources in the Ebro river basin by chemometrics modelling coupled to geographical information systems. *Talanta*. 70 (4), 691-704.

- Thoman, R.V. 1989. Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environmental Science and Technology*. 23, 699–707.
- Thomas, C.M., Anthony, R.G. 1999. Environmental contaminants in great blue herons (*Ardea herodias*) from the lower Columbia River and Willamette Rivers, Oregon and Washington, USA. *Environmental Contamination and Toxicology*. 18, 2804-2816.
- Tillitt, D.E., Ankley, G.T., Giesy, J.P., Ludwig, J.P., Kurita-Matsuda, H., Weseloh, D.V., Ross, P.S., Bishop, C.A., Sileo, L., Stromborg, K.L., Larson, J., Kubiak, T.J. 1992. Polychlorinated biphenyl residues and egg mortality in double-crested cormorants from the Great Lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 11, 1281-1288.
- Timbrell, J. 2005. The poison paradox. Chemicals as friends and foes. *Oxford University Press Inc., New York*.
- Torres-Dowdal, J., Zaccagnini, M.E., 2008. Plasma cholinesterases for monitoring pesticide exposure in nearctic-neotropical migratory shorebirds. *Ornitologia Neotropical*. 19, 641–651.

V

- Van den Brink, N.W., Bosveld, B.T.C. 2001. PCB concentrations and metabolism patterns in common terns (*Sterna hirundo*) from different breeding colonies in The Netherlands. *Marine Pollution Bulletin*. 42, 280-285.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology Pharmacology*. 13, 57–149.
- Van der Oost, R., Heide, H., and Opperhuizen, A. 1988. Polychlorinated biphenyl congeners in sediments, plankton, molluscs, crustaceans, and eel in a freshwater lake: implications of using reference chemicals and indicator organisms in bioaccumulation studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 17, 721-729.
- Vericat D, Batalla R.J. 2005. Sediment transport in a highly regulated fluvial system during two consecutive floods (lower Ebro River, NE Iberian Peninsula). *Earth Surface Processes and Landforms*. 30, 385-402.
- Vericat, D. i Batalla, R. J. 2006. Sediment transport in a large impounded river: The lower Ebro, NE Iberian Peninsula. *Geomorphology*. 79 (1-2), 72-92.



- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*. 44, 69–84.
- Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., Ballesteros, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., López-Barea, J., 2007. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicology Letters*. 168, 260–268.
- Vives, I., Grimalt, J.O., 2002. A method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. *Journal of Chromatography B* 768, 247–254.
- Vives, I., Grimalt, J.O., Catalan, J., Rosseland, B., Battarbee, R.W. 2004. Influence of altitude and age in the accumulation of organochlorine compounds in fish from high mountain lakes. *Environmental Science and Technology*. 38, 690-698.
- Voets, J., Talloen, W., de Tender, T., van Dongen, S., Covaci, A., Blust, R., Bervoets, L., 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology*. 79, 213–225.
- Voldner, E.C. i Li, Y.F. 1995. Global usage of selected persistent organochlorines. *The Science of the Total Environment*. 160/161, 201-210.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology*. 30, 71–133.

W

- Wania, F. i Mackay, D. 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio*. 22, 10-18.
- Wania, F. i Mackay, D. 1996. Peer reviewed: tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environmental Science and Technology*. 30, 390A-396A.
- Wang J.S., Chou H.N., Fan J.J., Chen C.M. 1998. Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota. *Chemosphere*. 36, 1201-1210.
- Walker, K., Vallero, D.A., Lewis, R.G. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environmental Science and Technology*. 33, 4373-4378.

- Watanabe, M., Tanabe, S., Tatsukawa, R., Amano, M., Miyazaki, N., Petrov, E.A., Khuraskin, S.L. 1999. Contamination levels and specific accumulation of persistent organochlorines in Caspian Seal (*Phoca caspiaca*) from the Caspian Sea, Russia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37: 396-407.
- Wei, S., Wang, Y., Lam, J.C.W., Zheng, G.J., So, M.K., Yueng, L.W.Y., Horii, Y., Chen, L.Q., Yu, H. Yamashita, N., Lam, P.K.S. 2008. Historical trends of organic pollutants in sediment cores from Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*. 57, 758-766.
- Whitledge, G.W., Rabeni, C.F., 1997. Energy sources and ecological role of crayfishes in an Ozark stream: insights from stable isotopes and gut analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54, 2555–2563.
- Willet, K.L., Ulrich, E.M., Hites, R.A. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environmental Science and Technology*. 32, 2197-2207.
- Winkels, H.J., Kroonenberg, S.B., Lychagin, M.Y., Marin, G., Rusakov, G.V., Kasimov, N.S. 1998. Geochronology of priority pollutants in sedimentation zones of the Volga and Danube delta in comparison with the Rhine delta. *Applied Geochemistry*. 13, 581-591.
- Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*. 24, 480–493.

X

- Xiao, H., Li, N., Wania, F. 2004. Compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for α -, β - and γ -hexachlorocyclohexane. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 49, 173-185.

Y

- Yamaguchi, N., Gazzard, D., Scholey, G., Macdonald, D.W. 2003. Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predators. *Chemosphere*. 50, 265-273.

Z

- Zar, J.H., 1996. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey.



Pàgines web

Aqua Pro Omnibus. <http://aquaproomnibus.blogspot.com.es>

Blog personal consultat al 2012. <http://blogdejaume.blogspot.com>

Catalunya Caixa. Obra social. <http://obrasocial.catalunyacaixa.com>

Confederación Hidrográfica del Ebro (2011). <http://www.chebro.es>.

Centre d'Estudis Demogràfics. <http://www.ced.uab.cat>

Ebro's Hydrographic Confederation. Basic Information. River Basin description. www.chebro.es
(Downloaded 2015.)

Eawag Aquatic Research

http://www.eawag.ch/organisation/abteilungen/umik/schwerpunkte/gruppe2/hch_degradation/index

Greenpeace, 1999. "Down to Zero."

<http://archive.greenpeace.org/toxics/downtozero/POPS/exposure.html>.

Instituto Nacional de Estadística. <http://www.ine.es>

Física Colegio Alberto Pérez. <http://fisica-alperit.blogspot.com.es/>

Freyhof, J., Kottelat, M., 2008. *Silurus glanis*. The IUCN red list of threatened species Version 2015.1, www.iucnredlist.org (Downloaded on 14 June 2015).

Lagos y Lagunas de México. <http://lagosylagunasdemexico.blogspot.com.es>

Ríos y cuencas. <http://www.riosycuencas.com>

Secretariat of the Stockholm Convention. <http://www.pops.int>

Slideshare. <http://slideshare.net>

Territori. Observatori de projectes i debats territorials de Catalunya.

http://territori.scot.cat/cat/notices/contaminacio_del_riu_ebre_a_flix_2004_570.php

Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactivity Materials. <http://www.tenorm.com>

Todo Colección. <http://www.todocoleccion.net>

