



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Invertebrate life cycle responses to PAC exposure

León Paumen, M.

**Publication date**

2009

**Document Version**

Final published version

[Link to publication](#)

**Citation for published version (APA):**

León Paumen, M. (2009). *Invertebrate life cycle responses to PAC exposure*. Universiteit van Amsterdam.

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# Summary

Polycyclic Aromatic Compounds (PACs) have been classified as priority toxic substances by the European Commission. PACs frequently determine the need for soil and sediment remediation, since total PAC concentrations in the environment are often far above background levels and in some cases still increasing.

PACs accumulated in soils and sediments usually occur as a complex mixture, consisting of homocyclic hydrocarbons and, in smaller fractions, a myriad of heterocyclic structures. Although they are present in fairly high concentrations, heterocycles are not included in PAC risk assessment, and are rarely included in ecotoxicological test schemes. Hence, heterocycles deserve much more scientific attention than they have received so far. Azaarenes and their stable degradation products, the most ubiquitous group of heterocycles, have therefore been chosen as 'model' heterocyclic toxicants by our research group.

PAC environmental risk assessment is performed using a limited set of merely homocyclic structures. The occurrence of heterocyclic structures is thus neglected, while they are ubiquitous and as toxic as their homocyclic analogues. Aiming to diminish the uncertainties that complicate PAC effect prediction and hinder the reliability of PAC risk assessment, in this thesis:

- life cycle effects of homo- and heterocyclic PACs on soil and sediment inhabiting invertebrates were determined
- the application of  $K_{ow}$  based prediction models to establish general patterns and exceptions in the outcome of life cycle PAC toxicity experiments was validated
- multi-generation effects of a homocyclic PAC on a soil inhabiting invertebrate were established and compared to effects of single generation exposure and
- the validity of the present PAC risk assessment was reviewed by examining the implications of the generated long-term toxicity data.

For the experiments described in chapter 2, eleven PACs were chosen as test compounds: six homocyclic PACs, three azaarenes and two Phase I azaarene transformation products. For the experiments performed in chapters 3 and 4, a subset of three three-ring PAC isomer pairs (two homocycles, their two azaarene analogues and the two main azaarene transformation products) was used. In the multi-generation experiment (chapter 6), the homocyclic PAC phenanthrene was used as test

## Summary

compound. Four test organisms were chosen to perform the life cycle experiments: two soil inhabiting invertebrates, the springtail *Folsomia candida* and the oligochaete *Enchytraeus crypticus*, and two sediment inhabiting invertebrates, the oligochaete *Lumbriculus variegatus* and the non-biting midge *Chironomus riparius*.

In chapter 2, the chronic effects of the eleven PACs on the two terrestrial invertebrates were determined, using reproduction and survival as endpoints. The results demonstrated that as far as narcosis induced mortality is concerned, effects of both homocyclic and heterocyclic PACs were well described by the relationship between estimated acute pore water LC50 values and  $\log K_{ow}$ . In contrast, specific effects on reproduction varied between species and between compounds as closely related as isomers, showing up as deviations from the relationship between pore water effect concentrations and  $\log K_{ow}$ .

In chapter 3, the chronic effects of the six selected PACs on the emergence of the midge *Chironomus riparius* were evaluated. Twenty eight-day LC50 values and 50% emergence times (E<sub>mt50</sub>) were determined. Concentration response relationships were observed for phenanthrene, acridine, phenanthridine and acridone. Anthracene and phenanthridone had no effect on total emergence, but did cause a delay in emergence. As observed for the soil organisms, calculated porewater LC50 values correlated well with  $\log K_{ow}$  values, suggesting narcosis as mode of action. In contrast, effect concentrations for delay in male emergence (E<sub>mt50</sub>) deviated from narcosis, suggesting a sex-related specific mode of action of PACs during long term exposure.

Chronic toxicity experiments using sediment or soil deal with the uncertainty of uncontrolled exposure, because in the spiked substrate various processes modify the availability of the test substance to the test organisms and hamper an accurate determination of exposure concentrations. The study presented in chapter 4 aimed therefore to monitor the availability of the selected PACs to the oligochaete *Lumbriculus variegatus* during 28 days of exposure to spiked sediments, in order to obtain reliable chronic effect concentrations for reproduction. During the sediment toxicity tests, available PAC concentrations in pore water (estimated using Solid Phase Microextraction) decreased more than total PAC concentrations in the sediment. Relating effects to PAC concentrations in pore water and in organisms showed that the two homocyclic compounds caused narcotic effects during chronic exposure, but only one of the four tested heterocyclic PACs caused narcotic effects. The transformation product phenanthridone was not toxic at the tested concentrations, whereas EC50 values for the parent compound phenanthridine and the isomer acridone were below the estimated limit for narcosis, suggesting a specific mode of

action. These results demonstrated the unpredictable (isomer) specific chronic toxicity of azaarenes and their transformation products.

To elucidate consistent patterns in PAC toxicity to soil and sediment inhabiting invertebrates, in chapter 5 we examined our complete experimental dataset (chapters 2-4), consisting of twenty-one chronic effect concentrations for the four invertebrates exposed to six selected PACs. In order to determine if effect concentrations were well predicted by existing toxicity-  $K_{ow}$  relationships describing narcosis, chronic pore water effect concentrations were plotted jointly against  $\log K_{ow}$ . Fifteen of the twenty-one effect concentrations (71%) fitted well on the acute LC50- $\log K_{ow}$  relationship, showing that narcosis was the main mode of action for the majority of the tested homo- and heterocyclic PACs during chronic exposure. Toxicity of all tested compounds to soil organisms was well described by the effect-  $K_{ow}$  relationship. However, for the sediment invertebrates exposed to some of the tested heterocyclic PACs deviations from narcosis were identified, related to specific physicochemical properties of the test compounds and/or species specific sensitivities. It was concluded therefore that existing toxicity-  $K_{ow}$  relationships describing narcosis in some cases underestimate chronic PAC toxicity to sediment inhabiting invertebrates.

Results of life-cycle toxicity experiments are supposed to be indicative for long-term effects of exposure to toxicants. Several studies, however, have shown that adaptation or extinction of populations exposed for several generations may occur. Therefore, in chapter 6, a multi-generation experiment was performed to determine if the effects of the PAH phenanthrene on survival and reproduction of the springtail *Folsomia candida* exposed for ten consecutive generations would progressively increase. LC50 values for the first four generations were similar, as expected for a narcotic compound. In the fourth generation, however, springtails exposed to a concentration similar to the EC50 for one generation showed internal phenanthrene concentrations in the range known to cause mortality; no reproduction took place, and the population went extinct. From the fifth generation onwards, survival and reproduction were not affected by the remaining exposure concentrations. Apparently, up to a certain threshold concentration the springtails were able to metabolize phenanthrene, as shown by the lack of adverse effects and the lack of adaptation. During multi-generation exposure, the graded concentration-response relationship changed into an all-or nothing response with a defined threshold concentration. Together with the worsening of effects, this raises concerns about the use of single-generation studies to tackle long-term population effects of environmental toxicants.

## Summary

Due to the lack of chronic toxicity data, risk assessment for homocyclic PACs can not be performed according to the best available method. Also, PAC heterocycles are neglected in actual PAC risk assessment. Therefore, in chapter 7 a risk limit derivation was performed using the life cycle toxicity data from chapters 2, 3 and 4. The derivation showed that the use of chronic effect concentrations to derive risk limits was a clear step forward. It was also shown that risk limits for the tested heterocycles were in general in the same range as risk limits for their homocyclic analogues, meaning that heterocycles could be directly incorporated to the current PAC risk assessment. However, sediment risk limits for the tested heterocycles were one order of magnitude lower than soil risk limits, showing that benthic species will be at risk more often due to PAC contamination than soil inhabiting species. In the second part of chapter 7, implications of our results for the main uncertainties regarding PAC risk assessment were discussed. It was concluded that some of these uncertainties, like PAC availability and the occurrence of PACs in mixtures, can be tackled with the tools available at the moment. In contrast, the unexpected changes occurring during multi-generation exposure showed the necessity of mechanistic research. Understanding the mechanisms underlying PAC toxicity together with the results of long term exposure experiments may diminish the uncertainties that complicate PAC effect prediction, and may improve the reliability of PAC risk assessment.

# Samenvatting

Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (PAKs) zijn door de Europese Unie als prioritaire toxische stoffen geclassificeerd. PAKs bepalen vaak de noodzaak tot (water)bodemsanering, omdat gemeten concentraties van deze stoffen in het milieu vaak hoger zijn dan de achtergrondwaarden. Voor sommige PAKs blijven de concentraties in de (water)bodem zelfs toenemen, ondanks het terugdringen van de industriële PAK-emissies.

PAKs komen in de bodem voor als complexe mengsels, bestaande uit een grote fractie homocyclische PAKs en een kleinere (maar zeer gevarieerde) fractie heterocyclische verbindingen. Deze heterocyclische verbindingen worden soms in aanzienlijke concentraties gemeten, maar worden niet meegenomen in toxiciteitstesten en risicobeoordeling. Heterocyclische PAKs verdienen dus veel meer wetenschappelijke aandacht dan tot nu te het geval geweest is. Daarom werden azaarenen en hun transformatieproducten, de meest voorkomende heterocyclische verbindingen, gekozen als modelstoffen voor dit project.

Ecologische risicobeoordeling voor PAKs is gebaseerd op toxiciteitdata voor een kleine groep homocyclische PAKs, terwijl de heterocyclische PAKs genegeerd worden. Als gevolg hiervan is de risicobeoordeling voor PAKs onbetrouwbaar. Dit project had daarom tot doel om de onzekerheden betreffende PAK toxiciteit en risicobeoordeling te verminderen door

- het bepalen van lange termijn effecten van homo- en heterocyclische PAKs op levenscyclusparameters van geselecteerde (water)bodem organismen
- het gebruik van effect- $K_{ow}$  relaties om patronen in de lange termijn effecten van de PAKs vast te stellen en uitzonderingen te analyseren
- het bepalen van multi-generatie effecten van een veel voorkomende homocyclische PAK op een bodeminsect, en het vergelijken van deze data met chronische effectconcentraties
- het toetsen van de huidige PAK risicobeoordeling aan de hand van de in dit project gegenereerde lange termijn toxiciteitsdata.

Voor de experimenten die in het tweede hoofdstuk van dit proefschrift beschreven zijn werden elf PAKs als teststof geselecteerd: zes homocyclische PAKs, drie azaarenen en twee fase I transformatieproducten van de azaarenen. Voor de

## Samenvatting

experimenten in de hoofdstukken drie en vier werd een serie van drie isomerenparen gekozen: twee homocyclische verbindingen, hun twee N-heterocyclische analogen en de twee meest voorkomende transformatieproducten van de twee N-PAKs. In het multi-generatie experiment beschreven in hoofdstuk zes werd de homocyclische PAK phenanthreen getest. Effecten van de gekozen verbindingen op overleving en levenscyclus parameters werden voor vier testorganismen bepaald: twee bodemorganismen, de springstaart *Folsomia candida* en de borstelworm *Enchytraeus crypticus*, en twee sedimentorganismen, de dansmug *Chironomus riparius* en de borstelworm *Lumbriculus variegatus*.

In hoofdstuk twee werden de effecten van elf PAKs op overleving en reproductie van de bodemorganismen bepaald. Het bleek mogelijk om de effecten op overleving goed te beschrijven met behulp van een bestaande relatie tussen  $K_{ow}$  en de acute toxiciteit in water, hier toegepast op poriewater LC50 waardes. Voor reproductie daarentegen werden isomeer- en soortspecifieke afwijkingen van de acute effect- $K_{ow}$  relatie geconstateerd, die duiden op specifieke effecten van enkele van de onderzochte PAKs op de reproductie van de twee bodemdieren.

In hoofdstuk drie werden de effecten van de drie isomerenparen op overleving en emergentietijd van *C. riparius* bepaald, uitgedrukt als achtentwintigdaagse LC50 waardes en 50% emergentietijden (E<sub>mt</sub>50). Voor de effecten van phenanthreen, acridine, phenanthridine en acridone op overleving werden duidelijke concentratie-respons relaties gevonden. Anthraceen en phenanthridone hadden geen effecten op overleving, maar vertraagden wel de emergentie. Net als voor de bodemorganismen waren poriewater LC50 waardes met  $\log K_{ow}$  waardes gecorreleerd, wat narcose als werkingsmechanisme suggereerde. Effect concentraties voor vertraging van de emergentie van de mannetjes waren daarentegen lager dan verwacht op basis van narcose, wat op een geslachtspecifieke werking van de geteste PAKs tijdens lange termijn blootstelling wees.

Lange termijn toxiciteitsexperimenten kampen met de onzekerheid van ongecontroleerde blootstelling, omdat de processen die in de vervuilde waterbodem plaatsvinden (zoals sorptie en degradatie) de beschikbaarheid van de teststoffen veranderen. Daardoor kunnen de blootstellingsconcentraties over- of onderschat worden. De studie die in hoofdstuk vier beschreven is had daarom als doel de blootstellingsconcentraties tijdens de vierweekse blootstelling van de borstelworm *Lumbriculus variegatus* aan de PAKs te volgen en nauwkeurige effectconcentraties voor reproductie te verkrijgen. Tijdens de blootstellingsperiode werd geconstateerd dat de beschikbare PAK concentraties in het poriewater (gemeten met Solid Phase Micro

Extraction) sneller afnamen dan de totale PAK concentraties in het sediment. Het uitdrukken van de effecten op basis van PAK concentraties in het poriewater en interne concentraties in *L. variegatus* liet zien dat de twee homocyclische verbindingen narcotische effecten veroorzaakten, maar dat van de vier heterocyclische verbindingen alleen acridine narcotisch was, hetgeen wederom op specifieke effecten op reproductie duidde. Deze resultaten lieten de onvoorspelbare effecten van azaarenen en PAK transformatieproducten duidelijk zien.

Om consistente patronen in PAK toxiciteit voor (water)bodemorganismen vast te stellen werden in hoofdstuk vijf de sediment- en bodemdatasets (hoofdstukken 2 tot en met 4) gezamenlijk geanalyseerd. Deze dataset bestond uit eenentwintig chronische effectconcentraties voor vier verschillende organismen, blootgesteld aan zes PAKs. Chronische poriewater effectconcentraties voor bodem en sediment werden tegen  $K_{ow}$  uitgezet en vergeleken met de acute effect- $K_{ow}$  relatie voor narcose. Vijftien van de eenentwintig chronische effect concentraties (71%) werden goed beschreven door de acute toxiciteit-  $K_{ow}$  relatie, waarmee werd aangetoond dat over het algemeen narcose het werkingsmechanisme van homo- en heterocyclische PAKs tijdens chronische blootstelling was. Bodemtoxiciteit van alle geteste stoffen werd goed beschreven door de effect- $K_{ow}$  relatie, terwijl specifieke effecten werden gevonden voor de benthische organismen blootgesteld aan sommige van de heterocyclische PAKs. Deze specifieke effecten werden veroorzaakt door fysisch-chemische eigenschappen van de stoffen en/of soortspecifieke gevoeligheid. Er werd geconcludeerd dat bestaande effect- $K_{ow}$  relaties in sommige gevallen de chronische toxiciteit van PAKs voor sediment organismen onderschatten.

Resultaten van levenscyclusexperimenten worden beschouwd als een schatting van lange-termijn effecten van toxicanten. Sommige studies hebben echter aangetoond dat zowel adaptatie als uitsterven van populaties die meerdere generaties blootgesteld zijn mogelijk is. In hoofdstuk zes werd daarom een multi-generatie experiment uitgevoerd om de lange termijn effecten van de homocyclische PAK phenanthreen op overleving en reproductie van de springstaart *F. candida* vast te stellen. LC50 waardes voor de eerste vier generaties waren vergelijkbaar, zoals verwacht voor een narcotische stof. In de vierde generatie werden in de springstaarten blootgesteld aan de hoogste concentratie interne phenanthreen concentraties gemeten waarbij sterfte verwacht werd. Deze springstaarten plantten zich niet meer voort en de populatie stierf uit. Vanaf de vijfde generatie werden geen effecten op *F. candida*'s overleving en reproductie gevonden bij de overblijvende phenanthreen concentraties in de bodem. Blijkbaar konden de springstaarten tot een bepaalde concentratie phenanthreen metaboliseren, en werden er daarom geen toxische effecten en ook geen adaptatie



## Samenvatting

gevonden. Tijdens multi-generatie blootstelling veranderde de concentratie-respons relatie voor phenanthreen in een alles-of-niets reactie met een duidelijke grenswaarde, die dicht bij de EC50 voor een enkele generatie lag. Deze waarneming dwingt tot een nieuwe omgang met effect concentraties die duidelijk anders is dan in de traditionele risicoberekening, die uitgaat van graduele effecten.

Omdat chronische data in veel gevallen niet beschikbaar zijn wordt PAK risicobeoordeling momenteel niet uitgevoerd met de best beschikbare methode, zijnde het gebruik van Species Sensitivity Distributions (SSDs). Daarnaast worden heterocyclische PAKs niet meegenomen in de huidige risicobeoordeling. Daarom werden in hoofdstuk zeven Maximaal Toelaatbare Risiconiveaus (MTRs) afgeleid, met gebruik van de chronische data voor de stoffen die in hoofdstukken twee tot en met vier getest waren. Deze afleiding liet duidelijk zien dat het gebruik van chronische data een positieve ontwikkeling is, en ook dat de MTRs voor de geteste heterocyclische PAKs in het algemeen vergelijkbaar waren met de MTRs voor de homocyclische stoffen. Dit betekent dat heterocyclische PAKs direct meegenomen kunnen worden in de risicobeoordeling. Risiconiveaus voor het sediment waren echter tien keer lager dan die voor de bodem, wat liet zien dat populaties van sedimentorganismen vaker risico zullen lopen door PAK blootstelling dan populaties van bodemorganismen. In het tweede deel van hoofdstuk zeven werden de implicaties van onze resultaten voor de verdere ontwikkeling van de PAK risicobeoordeling besproken. Er werd geconcludeerd dat sommige onzekerheden, zoals beschikbaarheid van PAKs en mengseltoxiciteit, met de huidige kennis aangepakt kunnen worden. De onverwachte veranderingen die waargenomen werden tijdens de multi-generatie blootstelling aan PAKs onderstrepen echter de noodzaak van verder mechanistisch onderzoek. Dit onderzoek samen met de resultaten van lange termijn experimenten zoals beschreven in dit proefschrift zal bijdragen aan het verminderen van de onzekerheden betreffende PAK toxiciteit en risicobeoordeling.

# Resumen

La Comisión Europea ha clasificado ciertos Hidrocarburos Aromáticos (PACs en inglés) como sustancias prioritarias para las cuales es necesario tomar medidas de reducción de riesgos ambientales, porque concentraciones de estas sustancias tóxicas superan las concentraciones de su incidencia natural, y se desconocen las consecuencias a largo plazo de su presencia en el ambiente. Concentraciones de PACs en suelo y sedimento, los dos compartimentos en los que se acumulan debido a su hidrofobicidad, siguen aumentando hoy en día, a pesar de que en la última década se han reducido sustancialmente las emisiones industriales.

PACs se acumulan en suelo y sedimento en mezclas complejas, formadas en su mayor parte por compuestos homocíclicos, y en menor cantidad (con un máximo de aproximadamente 10%) por compuestos heterocíclicos con sustituciones de uno o varios de los átomos de carbono de la molécula por átomos de por ejemplo nitrógeno, azufre o cloro. Concentraciones de PACs heterocíclicos son fácilmente detectables en el ambiente, pero su toxicidad no se suele determinar experimentalmente, y tampoco se hacen inventarios del riesgo ambiental asociado a su presencia. En este proyecto se seleccionaron varios N-PACs, moléculas con sustituciones de nitrógeno y los heterociclos más comunes, como sustancias experimentales modelo.

Los riesgos asociados a la presencia de PACs en el ambiente se calculan usando datos sobre la toxicidad de sustancias homocíclicas, ignorando así la vasta variedad de moléculas que existen porque se supone que la toxicidad de todos los compuestos del grupo es ejercida a través de narcosis, un mecanismo de toxicidad inespecífica causada por la interacción de la sustancia a nivel molecular con los lípidos de membrana. Estas extrapolaciones hacen que las predicciones resultantes sean bastante inciertas. Este proyecto se inició con el propósito de reducir la incertidumbre en la evaluación de los riesgos asociados a la contaminación por PACs, por medio de experimentos para

- determinar los efectos a largo plazo de PACs homo- y heterocíclicos sobre poblaciones de invertebrados que habitan suelo y sedimento
- utilizar relaciones entre los efectos encontrados y la hidrofobicidad de los compuestos analizados para tratar de describir la toxicidad crónica de los PACs escogidos

- determinar los efectos multigeneracionales de un PAC muy común sobre poblaciones de un insecto terrestre, y comparar los resultados con los de experimentos de una generación de duración

- usar los resultados experimentales obtenidos para evaluar las concentraciones límite incluidas en la legislación medioambiental holandesa actual

Para los experimentos descritos en el capítulo dos se utilizaron once sustancias: seis PACs homocíclicos, tres N-PACs y dos de los metabolitos de primera fase de los N-PACs. Para los experimentos de los capítulos tres y cuatro se utilizó una serie de tres pares de isómeros: dos PACs homocíclicos, sus dos análogos nitrogenados y los dos metabolitos más comunes de los N-PACs. Para el experimento multigeneracional del capítulo seis se utilizó fenantreno, un PAC muy común en suelos contaminados. Se determinaron los efectos de los compuestos escogidos sobre la supervivencia y parámetros del ciclo vital de cuatro invertebrados: dos terrestres, el poliqueto *Enchytraeus crypticus* y el colémbolo *Folsomia candida*; y dos habitantes del sedimento, el poliqueto *Lumbriculus variegatus* y el díptero *Chironomus riparius*.

En el capítulo dos se determinaron los efectos de once PACs sobre la supervivencia y reproducción de los dos organismos terrestres. Los resultados dejaron ver que es posible describir la supervivencia de estos organismos usando una relación entre concentraciones letales (LC50) e hidrofobicidad ( $K_{ow}$ ) determinada previamente para los efectos de compuestos similares en el medio acuático. Contrariamente, los efectos de los compuestos escogidos sobre la reproducción de los dos organismos mostraron desviaciones específicas sin ningún patrón definido: se encontró mayor toxicidad para ciertos isómeros, pero estos a su vez diferían entre los dos organismos.

En el capítulo tres se investigaron los efectos de las tres parejas de isómeros sobre la emergencia de *C. riparius*, expresada como tiempo medio de emergencia tras veintiocho días de exposición en sedimento contaminado (E<sub>mt50</sub>). Los efectos de fenantreno, acridina, fenantridina y acridona sobre la supervivencia de *C. riparius* aumentaron al incrementar la concentración del compuesto en el sedimento. Antraceno y fenantridona no afectaron la supervivencia de las larvas de mosquito, pero retrasaron la emergencia de los mosquitos adultos. La supervivencia de las larvas de *C. riparius*, expresada como LC50, se pudo describir de manera similar a la supervivencia de los organismos terrestres, sugiriendo narcosis como mecanismo de toxicidad. El retraso en la emergencia de los machos, por el contrario, tuvo lugar a concentraciones por debajo de las predicciones obtenidas usando narcosis como mecanismo. Este resultado sugiere un efecto específico de los compuestos examinados sobre el sexo masculino.

Una de las consecuencias del uso de experimentos ecotoxicológicos de larga duración es la pérdida de control sobre la exposición de los organismos, debida a los diferentes procesos (degradación, absorción) que se dan en suelo y sedimento y modifican la disponibilidad de los compuestos. PACs son sustancias hidrofóbicas que se asocian a partículas, reduciéndose así en gran medida su disponibilidad y toxicidad directa. De esta manera, las concentraciones a las que se producen efectos tóxicos se pueden sobre- o subestimar fácilmente. El experimento descrito en el capítulo cuatro tuvo como objetivo evaluar las concentraciones disponibles en el sedimento durante un experimento de cuatro semanas, para obtener concentraciones precisas a las que los compuestos utilizados afectan la reproducción del poliqueto *Lumbriculus variegatus* a un 50% del valor medio de los controles (EC50). Esto se estudió aplicando la técnica de Solid Phase Microextraction. Durante el experimento se vio que las concentraciones en los poros del sedimento disminuían más rápidamente que las concentraciones totales en el sedimento. La comparación de las EC50 obtenidas con concentraciones internas de los compuestos en *L. variegatus* dejó ver que los dos compuestos homocíclicos eran narcóticos, pero de los cuatro PACs heterocíclicos solo acridina lo era. Esto demuestra que los efectos de N-PACs y sus metabolitos para organismos que habitan el sedimento pueden ser totalmente impredecibles.

Para determinar la consistencia de los resultados obtenidos en los capítulos dos, tres y cuatro, en el capítulo cinco se analizaron los datos para los cuatro organismos de forma conjunta. El conjunto de datos analizados estaba formado por veintiuna concentraciones causando 50% de efecto (LC y EC50) para las tres parejas de isómeros. Quince de las veintiún concentraciones correlacionaron con la relación descrita anteriormente, demostrando que en general, la toxicidad crónica de PACs homo- y heterocíclicos está causada por efectos narcóticos. Las excepciones encontradas siempre se dieron en los organismos del sedimento, demostrando que el uso de relaciones basadas en datos sobre la toxicidad aguda para predecir los efectos a largo plazo de estas sustancias puede subestimar los efectos en el sedimento, y es insuficiente para proteger a los organismos que lo habitan.

Los resultados de experimentos crónicos usando parámetros del ciclo vital son vistos como una predicción de los efectos a largo plazo de sustancias tóxicas. Varios estudios han demostrado, no obstante, que poblaciones expuestas durante varias generaciones pueden extinguirse o adaptarse. Por esta razón, en el capítulo seis se realizó un experimento multigeneracional para determinar los efectos de suelo contaminado con fenantreno sobre la supervivencia y reproducción del colémbolo *Folsomia candida*. Las LC50 encontradas en las cuatro primeras generaciones eran similares, como es de esperar para un compuesto narcótico. En la cuarta generación,

sin embargo, los organismos expuestos a la concentración más alta acumularon concentraciones internas a las que se prevé mortandad. Estos colémbolos no se reprodujeron, y la población se extinguió. De la quinta a la décima generación no se detectaron efectos negativos sobre la supervivencia y reproducción de los organismos expuestos a las concentraciones restantes. Los resultados sugieren que hasta una cierta concentración crítica de fenantreno en el suelo los colémbolos son capaces de metabolizar el compuesto, neutralizando así sus efectos tóxicos. Por eso no se encontraron efectos en las últimas cinco generaciones, y tampoco se produjo adaptación alguna. Durante la exposición multigeneracional se dió una transición desde una relación de concentración-respuesta a una situación de todo-o-nada con una clara concentración tóxica umbral, que se encontraba cerca de la EC50 para una sola generación. Este hecho limita el uso de resultados de experimentos crónicos para predecir los efectos a largo plazo de PACs en suelo y sedimento, porque los métodos que se usan actualmente se basan en efectos graduales.

La falta de datos experimentales sobre la toxicidad de PACs en suelo y sedimento fuerza hoy en día a realizar la evaluación de los riesgos asociados a su presencia de manera bastante primitiva. Esta evaluación ignora también la presencia de sustancias heterocíclicas. En el capítulo siete se calcularon concentraciones límite en suelo y sedimento (CMA, Concentraciones Máximas Admisibles) usando los datos generados en los capítulos anteriores. Estas CMA mostraron que el uso de concentraciones de efecto crónico es un paso adelante para la evaluación del riesgo asociado a la contaminación por PACs, y también que las CMA para los PACs heterocíclicos son cercanas a las CMA para los PACs homocíclicos. Esto significa que los heterociclos se podrían incorporar directamente a la evaluación de riesgos actual. Las CMA generadas para el sedimento eran diez veces menores que los valores para el suelo, mostrando que poblaciones de organismos que habitan el sedimento correrán riesgos más a menudo debido a la presencia de PACs que sus tocayos en el suelo. En la segunda parte del capítulo siete se discutieron las consecuencias de los resultados de esta tesis para la evaluación de riesgos actual. Se concluyó que algunas incertidumbres, como la disponibilidad de PACs en el suelo y la toxicidad de mezclas, se pueden abordar con el conocimiento disponible actualmente. Las consecuencias debidas a la exposición multigeneracional, común para este tipo de sustancias, demuestran en cambio la necesidad de investigar en profundidad los mecanismos concretos que causan la toxicidad de estos compuestos. Añadiendo estos datos a resultados de experimentos de larga duración como los descritos en esta tesis se podrá reducir posiblemente la incertidumbre asociada a la contaminación ambiental por PACs.