

ANEXO 1

Aspectos toxicológicos del uso de lodos de aguas servidas en agricultura

En la búsqueda de antecedentes no se encontró guías o reglamentaciones específicas sobre toxicidad por uso de suelos enmendados con lodos de aguas servidas.

La bibliografía consultada se refiere a estudio de casos en los cuales se determinan efectos sobre organismos propios del suelo, plantas y sobre el ser humano, en suelos a los que se adiciona tóxicos normalmente presentes en el lodo, y suelos enmendados con lodos de aguas residuales. Las investigaciones incluyen: evaluación de toxicidad de metales pesados, compuestos orgánicos de uso común y orgánicos persistentes; actividad genotóxica y teratogénica en suelos fertilizados con lodos y traspaso potencial de compuestos orgánicos persistentes (COPs) a través de la alimentación humana por uso de lodo de aguas servidas en suelos agrícolas, entre otros.

Los antecedentes corresponden a estudios publicados en los últimos años cinco años (2000-2005), realizados en Australia, Bélgica, Canadá, China, Dinamarca, Francia, India, Reino Unido, Suecia y USA.

En Chile los estudios de toxicidad en lodos de aguas servidas son escasos. Antecedentes generados por Castillo, et al. (2005) mediante la aplicación de una batería de bioensayos multitrófica, compuesta por un productor primario (*Lactuca sativa* L), consumidor primario (*Daphnia magna*) y secundario (*Hydra attenuata*), demostraron toxicidad aguda y subletalidad extrema en lodos tratados de cinco diferentes plantas de tratamiento de aguas servidas domésticas (lodos activados, lagunas de estabilización, lagunas aireadas y biofiltros) de la zona central. Lodos recolectados de monorelleno de plantas de lodos activados, agregados al suelo en tasas de 30 t ha⁻¹, en general no han demostrado mayor actividad tóxica frente a cultivos de trébol, alfalfa y ballica. Ver trabajo completo al final del anexo

A continuación se presenta un resumen de los trabajos revisados en la literatura.

1. **Toxicidad de metales pesados en suelos agrícolas.** En áreas agrícolas australianas la contaminación por metales pesados en el suelo ha ocurrido por la aplicación de fertilizantes inorgánicos y lodos de aguas servidas (Barzi, et al., 1996). En este trabajo, Ayulungit et. al. (2005) investigaron el efecto de cuatro metales pesados, cadmio, cobre, plomo y zinc, que comúnmente se encuentran en lodos de aguas servidas australianas, sobre el invertebrado del suelo la Collembola *P. minuta* (que juega un importante papel como descomponedor de

suelo y residuos), el cual por alimentarse con material en descomposición y hongos del suelo puede indicar perturbaciones tempranas en el ecosistema (Cole, et al., 2001). Collembolas adultas capaces de producir huevos, fueron enfrentadas a suelos arenosos. Los tratamientos consideraron las siguientes concentraciones: cadmio (3, 10, 50, y 200 $\mu\text{g g}^{-1}$); cobre (60, 150, 300 y 1500 $\mu\text{g g}^{-1}$); plomo (300, 750, 1500 y 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$); y, zinc (200, 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$). Después de 42 días la población adulta disminuyó significativamente respecto al control, en todas las concentraciones altas de los tres metales. La población de juveniles no presentó mortalidad después de 42 días. También se observó efecto tóxico sobre la reproducción. En las concentraciones más altas de cadmio y zinc no hubo reproducción. También disminuyó la reproducción en la concentración más alta de cobre y en la segunda más alta de zinc. En cambio, en todas las concentraciones de plomo hubo una alta reproducción. En cuanto al crecimiento, en los primeros días no hubo mayor efecto, pero al cabo de 36 días se observó una disminución significativa en el tamaño de los animales en la mayor concentración de cadmio, las dos más altas de cobre y plomo y en todas las de zinc. También, en la concentración más alta de todos los metales se observó inhibición en el movimiento de algunos animales. Las Collembolas enfrentadas a las concentraciones más altas de cadmio, cobre y zinc no fueron capaces de consumir levaduras, apareciendo crecimiento de hongos en los contenedores. Se concluye que la Collembola mostró alta mortalidad, baja tasa de crecimiento y reducción en la reproducción frente a las concentraciones más altas de cadmio (200 $\mu\text{g g}^{-1}$), cobre (1500 $\mu\text{g g}^{-1}$) y zinc (2000 $\mu\text{g g}^{-1}$), efectos que pueden deberse a bioacumulación del metal en el cuerpo y aumento de la vulnerabilidad porstarvación que causa perturbaciones en su metabolismo. Cadmio fue el metal más tóxico, seguido de zinc, cobre y plomo.

2. **Investigación del efecto del filtrado de lodo sobre la supervivencia y reproducción de *Ceriodaphnia dubia* (Microcrustacea, Cladocera).** El objetivo de esta investigación fue determinar si el arrastre de suelos fertilizados con lodos de aguas servidas era tóxico para la biota acuática y por lo tanto, una potencial amenaza para la salud pública y ambiental (Veerina, et al. 2002). Bioensayos de siete días con *Ceriodaphnia dubia* mostraron un NOEC (Concentración de Efecto No Observable) de 24 g L^{-1} y un LOEC (Menor Concentración de Efecto Observable) de supervivencia de 30 g L^{-1} , en muestras de suelo tratadas con 35,2 toneladas métricas (TM) ha^{-1} de lodo de aguas servidas. Para suelos tratados con 0 y 17,6 TM ha^{-1} de lodo la supervivencia de *C. dubia* no fue significativamente

afectada a concentraciones de 6 a 30 gL⁻¹ de suelo. Cuando el microcrustáceo fue expuesto a 3,3 gL⁻¹ de concentración de suelo tratado con lodo la reproducción disminuyó en un 25%. Mientras que con 15 gL⁻¹ de exposición frente a suelo tratado con 17.6 TM ha⁻¹, la reproducción disminuyó un 50%. La aplicación de lodo a una tasa de 17,6 TM ha⁻¹ inhibió completamente la reproducción a un tratamiento de 18 gL⁻¹. Estos datos indican que el arrastre superficial de suelo en tierras agrícolas enmendadas con lodos de aguas servidas puede afectar la reproducción de daphnidos y el ambiente, a través de la cadena alimentaria acuática.

3. **Alquilbencensulfonatos lineales** Los alquilbencensulfonatos lineales (LAS) son compuestos surfactantes sintéticos, ampliamente usados en los detergentes y otros productos de limpieza de uso doméstico e industrial. Por su capacidad tensoactiva superficial se consideran potencialmente peligrosos para los organismos vivos, debido a que pueden destruir la membrana celular y causar desnaturalización de las proteínas (Mieure et al., 1990). No son degradados bajo condiciones anaeróbicas, por lo que generalmente se encuentran en altas concentraciones en lodos de aguas servidas. En este trabajo, Holmstrup, et al. (2001a) evaluaron el efecto del agregado de LAS sódico en un suelo arenoso, sobre la sobrevivencia, reproducción y crecimiento de seis invertebrados típicos de suelos agrícolas temperados: dos especies de gusanos de tierra, un enchytrácido, dos especies del artrópodo Collembola, y un Chironómido. En general, los efectos tóxicos sobre la reproducción y el crecimiento aparecieron cuando la concentración de LAS en el suelo excedió de 40 a 60 mg kg⁻¹. El efecto sobre la reproducción de los gusanos fue aproximadamente cuatro veces mayor en los gusanos y los enchytrácidos que en las Collembolas y Chironómidos. Se argumentó que la diferencia de sensibilidad de los animales respecto a la toxicidad de los LAS sería ocasionada por la dependencia del agua de poro de los anélidos, la que es mucho menor en los artrópodos.
4. **Efecto de la especiación de LAS en suelos agrícolas.** Continuando con la línea de los LAS, Holmstrup, et al (2001) estudiaron el efecto de la especiación de LAS en suelos agrícolas, tomando como parámetros comparativos, la influencia de la especiación de la sal, el tipo de suelo y la toxicidad del lodo de aguas residuales usando como organismos de ensayo Collembola y gusanos. En los detergentes el LAS se encuentra soluble como sal sódica, pero por la dureza del agua y los procesos de tratamiento aplicado a las aguas residuales, los LAS que llegan al suelo pueden ser poco solubles, como sales de calcio o magnesio. En el estudio

se determinó el efecto de las especies químicas de la reproducción de Collembola y crecimiento de gusanos. Se concluyó que la especiación de los LAS agregados al suelo no tuvo ninguna influencia sobre la toxicidad de las especies ensayadas. De la misma forma, los tres tipos de suelos agrícolas ensayados (arenoso, limoso y arcilloso) mostraron igual toxicidad. El LAS agregado a suspensiones de mezclas lodo-agua fue igualmente tóxico a los animales cuando se ensayó en soluciones acuosas. Sin embargo, la incubación anaeróbica de suspensiones de LAS entre 7 a 14 días, causó un incremento en tres veces la toxicidad tanto en las Collembolas como en los gusanos. Se concluye que los ensayos en laboratorio pueden ser usados para predecir cómo el suelo y los animales sometidos a bioensayos responden a LAS en el terreno. Estas conclusiones se refieren a las propiedades químicas del LAS en el ambiente y su biodisponibilidad. Niveles de EC50 de LAS para la inhibición de la reproducción de Collembola fue $345 \pm 198 \text{ mg kg}^{-1}$ (n=10) y la EC50 para la inhibición del crecimiento de los gusanos por LAS fue $225 \pm 95 \text{ mg kg}^{-1}$ (n=9)

5. **Evaluación del impacto de lodos en la agricultura y en la salud de la población expuesta, en India.** Singh, et al., (2004), realizaron estudios para evaluar el impacto de la disposición de lodos de aguas residuales en la agricultura y en salud en la población expuesta, en varias localidades de la India. Los resultados indicaron que el agregado de lodos generó impactos negativos por su alto contenido en metales pesados. y pesticidas, y positivos por el enriquecimiento del suelo con varios elementos como N, P y K, los que actuaron como valiosos fertilizantes. El lodo contenía niveles de cadmio, cromo, níquel y plomo superiores a los límites tolerables por los cultivos de la zona, sin embargo, el alto pH del suelo (>8.0) restringía su disponibilidad para los cultivos y su potencial toxicidad. El nivel de metales y pesticidas en muestras de sangre y orina de dos grupos de poblaciones demostró que los grupos expuestos contenían mucho mayor concentración de estos tóxicos que el grupo no expuesto. Además, en la población expuesta se demostró mediante una encuesta, que estadísticamente, los grupos expuestos presentaban mayores problemas conductuales neurológicos que los no expuestos.
6. **Impacto potencial a la exposición de dioxinas policloradas y dibenzofuranos (PCDD/Fs).** Una investigación realizada por Rideout, et al., (2004), examina el impacto potencial a la exposición de dioxinas policloradas y dibenzofuranos

(PCDD/Fs) en plantas y alimento animal por el uso de suelos enmendados con lodos de aguas servidas. Los niveles de PCDD/F en los lodos de las aguas servidas varía desde 0,0005 a 8.300 pg equivalentes tóxicos (TEQ) g⁻¹. Los niveles en el suelo varían entre 0,003 a 186 pg TEQ g⁻¹. En los suelos enmendados con lodos variaron entre 1,4 y 15 pg TEQ g⁻¹. Estudios que determinaron los niveles antes y después del tratamiento con lodo mostraron un aumento en la concentración del suelo después del tratamiento. Relaciones de niveles de PCDD/F entre el suelo y concentraciones resultantes en las plantas resultaron levemente positivas en cultivos de raíces sin pelar, vegetales frondosos, árboles frutales, heno y pastos. Relaciones algo mayores se observaron en plantas de la familia de los pepinos. En todos los casos se requiere grandes concentraciones en el suelo para alcanzar contaminación en las plantas. Se observó una significativa y alta relación positiva entre PCDD/F en el alimento y los niveles en el tejido de vacunos, lo que sugiere bioacumulación. A pesar que los PCDD/Fs se eliminan por la leche, no se encontraron relaciones entre la contaminación en el alimento y los niveles medidos en la leche. Hay escasos datos que describan el potencial ingreso de PCDD/Fs en los alimentos, vía lodo de aguas servidas. Actualmente datos disponibles sugieren que la aplicación de lodos de aguas servidas al suelo usado para la mayoría de los cultivos no debería aumentar la exposición humana.. Sin embargo, la disposición de lodo en el suelo para pastoreo de animales parece aumentar la exposición humana a los PCDD/F.

7. **Toxicidad potencial, genotoxicidad y teratogenicidad de lodos.** La toxicidad potencial, genotoxicidad y teratogenicidad potencial de lodos provenientes de aguas servidas urbanas fue evaluada usando el ensayo de micronúcleos de larvas del anfibio *Xenopus laevis*, y con el ensayo de mutación somático del tabaco, usando un mutante de *xanthi* Dulieu. El potencial efecto teratogénico fue evaluado mediante el ensayo de teratogenesis con embrión de rana *Xenopus* (FETAX). Varias dosis de lodo fueron agregadas a un cultivo de suelo y enfrentadas a los tres bioensayos. Los ensayos fueron realizados con muestras de lodo o de suelo enmendado con lodo (modelo planta) o con extractos acuosos (modelo animales acuáticos). Con el tabaco no se encontró actividad mutagénica con la mezcla lodo-suelo, tal vez por la naturaleza arcillosa del suelo, cuya gran capacidad de adsorción puede haber prevenido que los contaminantes alcanzaran el blanco. Todos los percolados de suelos enmendados produjeron una significativa reducción del tamaño de los embriones de *Xenopus*. Dependiendo de la relación suelo/lodo, algunos percolados demostraron actividad genotóxica, pero nunca

teratogénica. Los resultados de esta batería de ensayos aplicada en un sistema en vivo permite estimar efectos globales a largo plazo, bajo las condiciones agrícolas estudiadas, con varios resultados genéticos ecológicamente relevantes sobre organismos de los compartimentos acuáticos y terrestres. (Chenon, et al., 2003).

8. Evaluación de la contaminación y genotoxicidad de suelos regados con aguas

servidas. Trabajo realizado por Ying Chen, et al, 2004, en China evalúa la calidad del suelo regado con aguas servidas mediante una batería de parámetros químicos y biológicos. para describir la situación integral de los sitios contaminados. Se determinó pesticidas organoclorados (OCPs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). La actividad de las enzimas polifenol oxidasa y catalasa fueron determinadas para investigar las funciones del suelo. Para determinar la potencial genotoxicidad de extractos acuosos de suelo se aplicó el ensayo de micronúcleos de *Vicia faba*. Se concluyó que tanto los PAHs como los OCPs se habían acumulado en los suelos regados con aguas servidas. Se determinó que la contaminación por PHAs rea originada por la descarga de un efluente de una planta de carbón en las aguas servidas, mientras que los OCPs provenían del uso histórico de aguas servidas tratadas en riego. La frecuencia de los micronúcleos y la actividad de la polifenol oxidasa correlacionaron positivamente con la concentración de PAHs, pero no con los OCPs. Como una herramienta de controlar el posible traspaso de los COPs a la cadena alimentaria, los autores recomiendan el uso de la actividad de la polifenol oxidasa y del ensayo de micronúcleos como indicadores biológicos de la contaminación por PAHs en el riego de suelos con aguas residuales tratadas.

9. **Contaminantes orgánicos persistentes en el lodo de aguas servidas.** Klann, et al. (2001), en su trabajo sobre consumo de contaminantes orgánicos persistentes desde el lodo de aguas servidas comentan que en Suecia los lodos del tratamiento de las aguas residuales (WWTPs) han sido usados como fertilizantes agrícolas por más de 40 años. Indican que, además de P y N, contienen concentraciones relativamente altas de metales pesados y orgánicos persistentes (POPs), lo que constituye un riesgo de bioacumulación de cada uno de estos compuestos por los organismos del suelo. Realizaron experiencias con gusanos (*Eisenia foetida*) usando mezclas de lodo, conteniendo POPs, y compost Después de un periodo de cuatro semanas de exposición se encontraron POPs en la materia grasa de las lombrices extraída con ácido sulfúrico. Análisis de muestras de suelo y de gusanos

demostraron la presencia de los PCBs 138, 153, 170, de los PBDE 47, 99, 153, y varios tipos de pesticidas. Los investigadores concluyen que el lodo no debería ser considerado un fertilizante adecuado en Suecia, debido a los altos niveles de POPs y su capacidad de bioacumulación por organismos del suelo.

Literatura citada

- Ayulungit I. Nursita, Balwant Singh and Esith Lees. 2005. The effect of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tullberg (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 306-314
- Barzi, F., Naidu, R., McLaughlin, M.J. 1996. Contaminants and the Australian soil environment. In: Naidu, R., Kookana, R.S., Oliver, D.P., Rogers, S., McLaughlin, M.J. (Eds), *Contaminants and the Soil Environment in the Australasia-Pacific Region*. Proc. First Australasia-Pacific Conf. on Contaminants and Soil Environment in the Australasia-Pacific Region. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 451-484
- Castillo, G. Inés Ahumada, A. Carrasco, Jorge Mendoza. 2005. Chapter 3. Hazard Assessment Schemes (HAS) with batteries of bioassays. The watertox battery of tests: history, techniques and applications A case study in Chile. (In press, May 2005). Kluwer Publisher
- Chenom Pascale, Laury Gauthier, Pascale Loubières, Alain Séberac, Marcel Delpox. 2003. Evaluation of genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi* Dulieu. *The Science of the Total Environment* 301:139-150
- Cole, L.J., McCracken, D.J., Foster G.N., Aitken M.N. 2001. *Agric. Ecosystem Environ.* 83: 177-189
- Klann, Anja, Jessica Toft, and Ole von Uexkull. 2001. Earthworm's uptake of persistent organic pollutants from sewage sludge. *Bilaga 3. Lost World Journal*
- Rideout Karen and Kay Teschke. (2004) Potential for increased human foodborne exposure to PCDD/F when recycling sewage sludge on agricultural land. *Environmental Health Perspectives* 112 (9): 959-969
- Singh, Kunwar P., Dinesh Mohan, Sarita Sinha, R. Dalwani. 2004. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater/sludge disposal area. *Chemosphere* 55: 227-255
- Martin Holmstrup and Paul Henning Krogh 2001. Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 3. Sublethal effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (8): 1673-1679
- Martín Holmstrup, Paul Henning, Hans Lokke, Watze de Wolf, Stuart Marshall and Kay Fox. (2001). Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 4. The influence of salt speciation, soil type and sewage sludge on toxicity using Collembolan *folsomia fimetaria* and the earthworm *apocryptodea caliginosa* as test organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (8): 1680-1689
- Mieure, J., Waters, J., Holt, M., Matthijs, E. 1990. Terrestrial safety assessment of linear alkylbenzene sulfonate. *Chemosphere* 21:251-262.

- Veerina, Syama S., Nick C. Parker and Clifford B. Fedler. 2002. Effect of sludge filtrate on the survival and reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology* 11: 113-118
- Ying Chen, Chunxia Wang, Zijian & Shengbiao Huagn. (2004) Assessment of the contamination and genotoxicity of soil irrigated with wastewater. *Plant and Soil* 261:189-196

ASPECTOS ECOTOXICOLÓGICOS Chile (2005).

RESUMEN: Ocho lodos procedentes del tratamiento de aguas servidas, independiente del tipo de tratamiento aplicado, fueron enfrentados a una batería de ensayos de toxicidad. El análisis de evaluación de peligrosidad ambiental (HAS), realizado por dos diferentes procedimientos clasificaron a siete lodos como extremadamente tóxicos y uno ellos muy tóxico. Dos suelos sin lodo no mostraron toxicidad para ningún ensayo. Dos suelos enmendados con lodo en tasas de 30 ton/Ha, después de 30 días de aplicación mostraron “alta toxicidad”, pero en menor grado que el lodo. Se demuestra efecto de dilución o neutralización de la toxicidad por efecto de la mezcla con suelo. La toxicidad fue determinada por una batería de ensayos multitrófica conformada por un vegetal (*L. sativa*), un consumidor primario (*D. magna*) y un consumidor secundario (*H. attenuata*)

Chapter of Book: Small-scale freshwater environment toxicity test methods, Blaise, Christian and Jean-François Férard. Editors. Kluwer Academic Press 2004. (In Press). Chapter 3. Hazard Assessment Schemes (HAS) with batteries of bioassays. The watertox battery of tests: history, techniques and applications. A case study in Chile. G. Castillo. Inés Ahumada, A. Carrasco, Jorge Mendoza. U. of Chile. gcastilo@ing.uchile.cl

SUMMARY

The application of a core battery of WaterTox Program toxicity tests (*Daphnia magna*, 24-48 h acute mobility inhibition test; *Hydra attenuata*, 48-96h acute lethality and sublethality test; *Lactuca sativa*, 120 h inhibition of germination and root elongation test; *Pseudokirchneriella subcapitata* -formerly *Selenastrum capricornutum*- 72-h growth inhibition test) were applied to different type of samples by three South American laboratories. Different Hazard Assessment Schemes (HAS) were developed based on existing indexes. In this work, the Chilean application of toxicity ranking scheme based on approaches proposed by the National Water Research Institute of Environment Canada (Dutka 1988, Dutka and Kwan 1988) and Gent University, Belgium (Persoone et al. 2003) was employed to assess soluble contaminants associated to biosolids from municipal wastewater treatment plants. Applications of these Hazard Assessment Schemes are discussed based on the ranking scale of each HAS and toxicity test responses. Overall, application of specific HAS schemes with the WaterTox battery of toxicity tests contributed ecotoxicological information that identified the wastes Chile. Such information is crucial for subsequent decision-taking that will lead to improved protection and conservation of aquatic ecosystems.

OBJECTIVES

The application of existing toxicity ranking systems, based on the use of a battery of tests inspired by the WaterTox Program are presented. These systems enable toxicity assessment of water soluble contaminants from different type of matrixes. Application are given for biosolids from municipal treatment plants.

TEST BATTERY APPROACH

A test battery approach to undertake toxicity testing is now widely advocated internationally for assessing complex mixtures like municipal and industrial effluents, or hazardous wastes from different sources, because different levels of aquatic biota can be affected by specific groups of toxicants. However, ranking samples is complex because different tests in the battery will respond to toxicity in varying degrees. One way to resolve this problem is to integrate test responses into a toxicity index that expresses the relative hazard of different samples by a single numerical value.

HASs CASE STUDY

The following section highlight case studies undertaken independently in three South American countries facing different types of environmental problems related to toxic emissions to aquatic environments. In these document an extract of the the Chilean study is presented.

CHILEAN HAS CASE STUDY

One goal of the Chilean Government is the treatment of all domestic wastewaters by the year 2010. The generation of 220 tons year⁻¹ of sludge is expected as a treatment by-product (SISS, 2003). At the University of Chile a team of investigators from different centres is carrying out studies on land application of sewage sludge and biosolids, considering their sanitary quality, heavy metal content and bioavailability, as well as their ecotoxicity. Their main objectives are to generate information for the environmental administration officials that are setting specific regulations for agricultural use.

HAS Description

To assess soluble contaminants associated with sewage sludge and biosolids from different municipal treatment plants in Chile, a core battery of toxicity tests including *D. magna*, *H. attenuata* and *L. sativa* was used. Two Hazard Assessment Schemes (HAS) toxicity ranking systems were applied to categorize sample toxicity. The first scheme [HAS1] is based on a point ranking system that integrates toxicity data obtained for different tests (Dutka, 1988; Dutka & Kwan, 1988; Dutka, 1993; Castillo et al., 2000). This ranking depends on the number of tests and the weight assigned to each one. The scale comprises five degrees of hazard and ranges from “non toxic”, to “extremely toxic”. The range scheme used in this study was adapted to the three toxicity tests applied here (Table 1). Because of the generally lower sensitivity responses elicited with the *L. sativa* toxicity test in response to chemical contaminants, a higher score was allocated to it as compared to the *D. magna* and *H. attenuata* tests. Essentially, higher scores corresponded to more toxic samples with this ranking system.

The second scheme [HAS2], proposed by Persoone et al. (2003), is based on toxicity responses of one or more tests applied to wastes, and involves two steps: (i) an acute ranking in five classes (Table 2) and, (ii) a weight score for each toxicity class. The class describes hazard from “no toxicity”; if no toxic effects are detected in a sample, to “very high toxicity” when toxic effects for a 100-fold dilution of sample is observed. The class weight quantifies the degree of toxicity in that class. The weight score is expressed in percentage (%), and ranges from 25% - if only one test of the battery reaches the toxicity level of the class - to 93% - if all tests but one reach it. For calculating the class weight, an allocation of a test score is applied for each toxicity test of the battery (Table 3). Then, the total score is divided by the total number of tests. This result is then divided by the maximum particular score obtained, and expressed as

a percentage. The higher the weight score obtained the more of a toxic hazard the class represents.

Table 1: Point allocation scheme for sample ranking and hazard classification based on a toxicity test core battery [HAS 1]

Ranking interval		Test score			Total battery score	Hazard description
L(I)C50%	TU*	D.magna	H.attenuata	L. sativa		
> 90	< 1.1	0	0	0	0	Non toxic
90 – 75	1.1–1.33	1	1	3	1 – 5	Slightly toxic
74.9 – 50	1.34 – 2	2	2	5	6 – 9	Toxic
49.9 – 25	2.01 – 4	4	4	9	10 – 17	Highly toxic
< 25	> 4	6	6	13	18—25	Extremely toxic

*TU (Toxic Units) = $[1/(L(I)C50)] \times 100$

Table 2: Hazard classification scheme for wastes discharged into the environment [HAS 2]

Class	Hazard description	Characteristics
I	No toxicity	- none of the tests show a toxic effect (<0.4 TU)
II	Slight toxicity	- LOEC is reached at least for one test - the effect level is below 50% (0.4 - <1TU)
III	Toxicity	- the L(I)C50 is reached in at least one test - in the 10-fold dilution of sample, the effect is lower than 50% (1-10 TU)
IV	High toxicity	- the L(I)C50 is reached in the 10-fold dilution for at least one test - in the 100-fold dilution of sample, the effect is lower than 50% (>10-100 TU)
V	Very high toxicity	- the L(I)C50 is reached in the 100-fold dilution for at least one test (>100 TU)

*TU (Toxic Units) = $[1/(L(I)C50)] \times 100$

Table 3: Score allocation according to toxic effect of each core battery bioassay for class weight calculation [HAS 2]	
Toxic Effect	Score
No significant toxic effect (< LOEC)	0
LOEC < % effect < L(I)C50 (= <1 TU)	1
1 – 10 TU	2
10 – 100 TU	3
> 100 TU	4

Application of the HASs to Biosolids Toxicity

This study included sludge samples from five different wastewater treatment facilities: (i) one stabilization pond (SP), (ii) two conventional activated sludges (AS), (iii) one compact activated sludge (CAS), and (iv) one trickling filter (TF). The conventional AS plants treat sewage produced by close to two and a half million people; the sludge obtained is anaerobically digested, mechanically dewatered, and dehydrated in sand drying beds. The other plants are located in small towns (~ 25,000 inhabitants). Sludge from the SP is auto digested in the bottom of the pond, remaining there for approximately one year prior to being extracted and air dried; the TF sludge is anaerobically digested in tanks, and dried in conventional sand drying beds; the CAS sludge is not treated.

A total of eight sludge samples and two soils to be amended with sludge were tested with the core testing battery. In addition, two amended soils with AS1 sludge applied in rates 0, and 30 tons per hectare (ton ha^{-1}), incubated during 60 days for agricultural use, were also analyzed. Sludges and soils were air-dried and sieved through a 2 mm mesh-size polyethylene sieve. Portions of the < 2 mm fractions from sludges and soils were ground in an agate mortar and stored in polyethylene sealing bags. Forty g of sludges, soils and amended soils were extracted with the respective culture media from each toxicity test, using a 1:4 ratio; the mixture was shaken at 180 rpm for one hour, then centrifuged at 3000 rpm in a refrigerated centrifuge for 20 minutes. The supernatant was used in the toxicity tests.

Results of global acute toxicity of sludge and soils (dry-weight basis) are presented in Table 4. According to HAS1, independent of source and moisture, all sludges were classified as “extremely toxic”, reaching the maximum battery score (25 points). Neither of the soils exerted toxic effects on the bioassay battery (0 points). In contrast, “high toxicity” was found in soils (12 points), after two months of application of the final sludge (biosolid) from one of the activated sludge treatment plants, at the rate 30 tons ha^{-1} (dry-weight basis).

Table 4: Sewage sludge and agricultural soil toxicity¹ [HAS 1]

Sample	Moisture %	D.magna LC _{50-48H} (%)	UT	H. attenuata LC _{50-96H} (%)	UT	L. sativa IC _{50-5D} (%)	UT	Total score	Hazard description
SP	28.3	9.46	10.5	2.48	40.3	2.6	38.5	25	<i>Extremely toxic</i>
CAS	5.9	9.3	11.6	0.11	909	7.37	13.6	25	<i>Extremely toxic</i>
AS _{1a}	7.0	3.5	28.3	0.32	316	3.6	27.5	25	<i>Extremely toxic</i>
AS _{1b}	8.4	3.5	28.3	0.18	556	3.3	30.6	25	<i>Extremely toxic</i>
AS _{1c}	78.0	1.84	54.5	0.15	667	1.02	98.0	25	<i>Extremely toxic</i>
AS _{1d}	65.4	1.48	67.6	0.14	714	1.17	85.5	25	<i>Extremely toxic</i>
AS _{2a}	34.7	1.26	79.4	0.1	1000	2.17	46.1	25	<i>Extremely toxic</i>
TF	98	3.8	26.3	0.13	769	5.1	19.6	25	<i>Extremely toxic</i>
Soil ₁	2.3	>100	<1.1	>100	<1.1	>100	<1.1	0	<i>Non toxic</i>
Soil ₂	1.3	>100	<1.1	>100	<1.1	>100	<1.1	0	<i>Non toxic</i>
Soil ₁ +AS _{1-2a}	2.5	17.4	5.8	16.5	6.1	>100	<1.1	12	<i>Highly toxic</i>
Soil ₂ +AS _{1-2a}	1.2	17.3	5.8	15.1	6.6	>100	<1.1	12	<i>Highly toxic</i>

¹ Dry-weight basis² Amended soil with final sludge of conventional activated treatment sludge (rate 30 tons ha⁻¹ x 60 days)

Although HAS 1 scheme can not discriminate in different categories the tested sludge samples and therefore their relative toxicity, the results are of interest to set acceptable toxicity levels in specific regulations for sludge land application and agriculture reuse. The tested sludge comes from different type of environments (i.e., small towns of with mining and agriculture as their main productive activities, and a large city with a great diversity of economical activities), and also different type of sewage treatment, showing a similar high toxicity profile, posing a potential risk on phytotoxicity, and surface water and groundwater contamination.

Similarly, the HAS2 classification system confirmed the high toxicity of sludges and the negative responses of both soils (Table 5). Most sludges fell into class V, with a weight of 78%. SP sludge proved to be somewhat less toxic with a weight of 100% into class IV. In contrast, the hazard toxicity of amended soils decreased by two levels, falling into class III, with a weight of 66.7%.

Table 5: Toxicity of sewage sludge and amended soils using [HAS 2]

Sample	Class	Hazard description	Class weight (%)
SP	IV	High toxicity	100
CAS	V	Very high toxicity	77.8
AS1-a	V	Very high toxicity	77.8
AS1-b	V	Very high toxicity	77.8
AS1-c	V	Very high toxicity	77.8
AS1-d	V	Very high toxicity	77.8
AS2-a	V	Very high toxicity	77.8
TF	V	Very high toxicity	77.8
Soil ₁	I	No toxicity	- -
Soil ₂	I	No toxicity	- -
Soil ₁ +AS1-a ²	III	Toxicity	66.7
Soil ₂ +AS1-a ²	III	Toxicity	66.7

¹Dry-weight basis²Amended soil with digested sludge of conventional activated sludge treatment (rate 30 tons ha⁻¹ x 60 days)

Using the HAS1 framework, the *H. attenuata* test yielded the most sensitive toxic responses for all types of sludges. However, although the sensitivity of *D. magna* and *L. sativa* was of the same order of magnitude, classification of sludges as being “extremely toxic” (HAS1, Table 9) was in part attributable to the latter test, because of its high test score attribution (Table 6). In amended soils, both *D. magna* and *H. attenuata* assays generated maximum test scores (Table 6). In this instance, the negative response of *L. sativa* tended to reduce the hazard level of this matrix. The HAS2 classification scheme was similar in its ratings of samples and no major differences with respect to HAS1 were observed (Table 10).

In general, both hazard schemes were found to be simple and easy to apply and they can be considered complementary. When toxicity is present, both can discriminate between high, medium, low and absence of hazardous effects on tested organisms. HAS1 takes into account the response of each toxicity test included in the battery, assigning a particular score related to their respective response to toxicants. In contrast, HAS2 classifies hazard level based on the response of each test, but also includes a weight factor within a toxic class. Again, HAS1 attributes a toxic hazard based on all test scores while HAS2 gauges the hazard level. Based on the HAS1 scheme, all sewage sludge samples reached the highest classification, because their score was > 4 TU in all tests (Table 1). Because of the class and weight criteria

imposed by the HAS2 scheme (Table 2), it appears to offer better possibilities to discriminate sludges on the basis of their toxic properties (Table 5).

Future studies should strive to improve upon these HAS schemes so as to better discriminate between highly toxic samples by separating them into sub-classes. This, in turn, will allow for the development of more precise criteria for the disposal of such hazardous wastes. Presently, some of the samples investigated, whose toxicity demonstrates effects at 1:10 and 1:1000 dilutions, are all grouped in the same class rank as "highly toxic". There is room for improvement in future optimization of HAS schemes to refine their judgement in terms of toxicity classification.

REFERENCES

- Castillo, G., Vila, I and Neild, E. (2000) Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environ. Toxicol.*, 15, 370-375.
- Dutka, B. (1988) Priority setting of hazards in waters and sediments by proposed ranking scheme and battery of test approach. *Zeit Angewandte Zool.*, 75, 303-316.
- Dutka, B, Kwan, K. (1988) Battery for screening tests approach applied to sediment extracts. *Tox. Assess.*, 3, 303-314.
- Dutka, B. (1989a) Short term root elongation toxicity assay, in B. Dutka (ed.), *Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*, National Water Research Institute, Environment Canada, Burlington, Ontario pp. 120-122.
- Dutka, B. (1993) Ecotoxicological assessment of water, effluent and sediment quality using a battery of tests approach. Rivers research Branch, National Water Research Institute, Canada Center for Inland Waters, Burlington, Ontario. pp. 37.
- Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Nalecz-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L., and Kolar, B. (2003) A practical and user friendly toxicity classification system with microbiotests for natural and wastewater. *Environ. Toxicol.* 18, 395-402.
- Superintendencia de Servicios Sanitarios SISS Chile (2003). Informe anual de coberturas de servicios sanitarios. <http://www.siss.cl>
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). (1991) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, Fourth Edition, Report EPA 600/4-90/027, Washington, DC.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of study was financed by Project Fondecyt/Conicyt Chile 1020129-02, and Project DID TNAC 18-02/01, U. of Chile.