

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR "B" E INMUNOLOGÍA

Evaluación de Respuestas Bioquímicas y Anormalidades Cito-genotóxicas en Mejillón Silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) como Biomarcadores de Contaminación Ambiental

> Dña. Beatriz Fernández Galindo 2012



UNIVERSIDAD DE MURCIA



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR "B" E INMUNOLOGÍA

MEMORIA

Evaluación de Respuestas Bioquímicas y Anormalidades Cito-Genotóxicas en Mejillón Silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) como Biomarcadores de Contaminación Ambiental

Presentada para optar al Título de Doctor por

BEATRIZ FERNÁNDEZ GALINDO

Murcia, 2012

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a fondos del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (orden/3 abril/2000) a través de una beca de formación como personal investigador en el Centro Oceanográfico de Murcia del Instituto Español de Oceanografía (IEO), a fondos del IEO concedidos al Proyecto BIOMEJIMED: "Biodisponibilidad de microcontaminantes y efectos biológicos a lo largo de la costa mediterránea ibérica utilizando mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) como bioindicador", y a la financiación del Ministerio de Ciencia y Tecnología al Proyecto DEEP: "Distribución, evolución y efectos del fuel-oil en el litoral afectado por el vertido del Prestige. Estudio integrado" (VEM 2003-2006).

UNIVERSIDAD DE MURCIA



D. Manuel Cánovas Díaz, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y **Director del Departamento*** de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral "EVALUACIÓN DE titulada RESPUESTAS BIOOUÍMICAS Y ANORMALIDADES CITO-GENOTÓXICAS EN MEJILLÓN SILVESTRE (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS) COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN MARINA", realizada por Da Beatriz Fernández Galindo, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Juan Antonio Campillo González, este Consejo de Departamento, en sesión celebrada en fecha 30 de marzo de 2012, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 30 de marzo de 2012

Doctorando: Da. Beatriz Fernández Galindo



UNIVERSIDAD DE MURCIA ÁREA DE GESTIÓN ACADÉMICA SECCIÓN DE POSTGRADO Fecha: 27/2/20/2 SALIDA Nº 224

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Vicerrectorado de Estudios

D^a BEATRIZ FERNÁNDEZ GALINDO C/ San Pedro, 15, 1º 30740 SAN PEDRO DEL PINATAR MURCIA

Vista la solicitud presentada el día 6 de febrero de 2012, por Dª BEATRIZ FERNÁNDEZ GALINDO ,con DNI número 45.595.243, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular B e Inmunología, responsable de la autorización de la tesis doctoral en fase de elaboración, de esta Universidad, y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias de la Salud,

resolvió, en su sesión de 27 de febrero de 2012, **ACCEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica a** D^a BEATRIZ FERNÁNDEZ GALINDO, significándole que contra esta resolución, que pone fin a la vía administrativa, se podrá interponer potestativamente ante el mismo órgano que la ha dictado, recurso de reposición, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a su notificación, de acuerdo con lo dispuesto en el art. 116 de la citada Ley.

Si no hiciera uso del recurso de reposición podrá interponer recurso contenciosoadministrativo, en el plazo de dos meses desde la notificación de este acuerdo, en la forma establecida en la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de dicha Jurisdicción.

> Murcia, 27 de febrero de 2012 Vicerrectora de Estudios y Presidenta de la Comisión General de Doctorado

> > Concepción Palacios Bernal



D. Juan Antonio Campillo González, Científico Titular de los Organismos Públicos de Investigación en el Centro Oceanográfico de Murcia del Instituto Español de Oceanografía

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "EVALUACIÓN DE RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y ANORMALIDADES CITO-GENOTÓXICAS EN MEJILLÓN SILVESTRE (MYTILUS GALLOPROVINCIALIS) COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN MARINA", realizada por D^a Beatriz Fernández Galindo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 8 de Marzo de 2012

El Director: Fdo. Dr. Juan Antonio Campillo González



D. Manuel Cánovas Díaz, Catedrático de Universidad del Área de Conocimiento "Bioquímica y Biología Molecular", y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular "B" e Inmunología,

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "EVALUACIÓN DE RESPUESTAS BIOQUÍMICAS Y ANORMALIDADES CITO-GENOTÓXICAS EN MEJILLÓN SILVESTRE (*Mytilus galloprovincialis*) COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINACIÓN MARINA", realizada por D^a Beatriz Fernández Galindo, bajo la dirección del Dr. Juan A. Campillo González, mi tutoría y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 8 de Marzo de 2012 El Tutor: Fdo. Dr. Manuel Cánovas Díaz

Esta Memoria ha sido concebida como compendio de las siguientes publicaciones:

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J. 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquatic Toxicology 99: 186–197. (Factor de Impacto 2010: 3,333)

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J. Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.024. (Factor de Impacto 2010: 3,155)

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J. Especificidad tisular de la respuesta de biomarcadores en mejillón: glándula digestiva *vs* branquias. Uso integrado para la valoración de la calidad ambiental. En preparación.

Fernández B., Campillo J.A., Martínez-Gómez C., Benedicto J. 2011. Micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of cyto-genotoxic pollution in Mediterranean waters. Environmental and Molecular Mutagenesis 52: 479-491. (Factor de Impacto 2010: 3,493)

Fernández B., Albentosa M., Viñas L., Franco A., González J.J., Campillo J.A. 2010. Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte (Galicia, NW Spain) by means of mussel chemical, biochemical and physiological parameters. Ecotoxicology 19:735–750. (Factor de Impacto 2010: 3,051)

A mis padres, Carmen e Isaac

AGRADECIMIENTOS

El camino recorrido hasta llegar a este momento no ha sido corto ni fácil. Los que me conocen bien saben que no me gustan las cosas a medias, y lo mucho que significa para mí haber acabado esta Tesis Doctoral, más allá de su valor académico o curricular.

A lo largo de estos años, y desde que comencé mi andadura en el Instituto Español de Oceanografía (IEO) como becaria en el grupo de "Contaminación y Efectos Biológicos" del Centro Oceanográfico de Murcia, he compartido y aprendido muchas cosas de compañeros de trabajo, familiares y amigos, a los que tengo mucho que agradecer:

Juan Antonio Campillo, mi Tutor durante la beca y Director de Tesis, que me puso al día de lo que eran los efectos biológicos de la contaminación, me enseñó las primeras técnicas de laboratorio, y me ha dirigido y ayudado durante todo el proceso de elaboración y redacción de esta Tesis.

Concha, coautora de varios de los trabajos de esta Tesis, compañera de andanzas científicas, y que me ha dado sabios consejos, comprensión, apoyo y colaboración antes, durante y, espero, después de esta Tesis.

Nané, coautor de varios de los artículos de esta Tesis, Investigador Principal de los proyectos para los que he estado contratada en el IEO, y que me ha ofrecido su ayuda y confianza durante estos años.

Marina, que confió en mí y me dio la responsabilidad, oportunidad, reto y empujón que necesitaba para escribir el primer artículo de esta Tesis.

Los compañeros del Grupo de Contaminación de Murcia: Pencho, David, Inés, Juliana, Cristóbal, Juan Guerrero, Antoñico y Victor León. Con todos ellos he pasado ratos estupendos en el laboratorio, en campañas oceanográficas, y en el día a día. Recuerdo con especial cariño cómo Pencho me enseñó mi primera técnica de efectos biológicos. Especial mención merecen los muestreos de mejillón, tanto por Galicia como por el Mediterráneo, con Cristóbal, David, y Juanjo. ¡Cuántos buenos momentos!.

Los compañeros del Grupo de Contaminación de Vigo: Juan José González, Lucía Viñas y Ángeles Franco, coautores del artículo sobre los efectos biológicos de la contaminación tras el *Prestige*.

Los compañeros de los grupos de Pesca y Ecosistemas Marinos, y José María Bellido, director del Centro Oceanográfico de Murcia.

Manuel Cánovas, Tutor de esta Tesis y apoyo en la Universidad de Murcia y el Departamento de Biología Molecular "B" e Inmunología.

Los miembros del Tribunal, que generosamente han aceptado formar parte del mismo.

Mis padres y Daniel, que me han apoyado, comprendido, tenido paciencia y confiado en mí incondicionalmente. No hay páginas suficientes en esta Tesis para mostraros mi agradecimiento.

Mi hermano, familiares y amigos, que comparten conmigo la satisfacción de este momento, y sin los que este camino hubiera sido mucho más duro.

Gracias a todos por haber estado ahí.

<u>Abreviaturas</u>

ACP	Análisis de Componentes Principales
AhR	Receptor de hidrocarburos aromáticos- Aryl hydrocarbon Receptor
ATP	Trifosfato de adenosina
BaP	Benzo[a]pireno
BN	Célula Binucleada
BPH	Benzo[a]pireno Hidroxilasa
BEM	Buen Estado Medioambiental
CAT	Catalasa
CDNB	1-cloro-2,4dinitrobenceno
COMU	Centro Oceanográfico de Murcia
COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
COVI	Centro Oceanográfico de Vigo
CYP	Enzimas de la familia citocromo P450
DDD	DicloroDifenilDicloroetano
DDE	DicloroDifenildicloroEtileno
DDT	DicloroDifenilTricloroetano
DTD	DT-diaforasa o NADPH quinona oxidoreductasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético
EMTs	Especies Moleculares Tóxicas
EPA	Agencia de los EEUU para la protección ambiental- U.S. Environmental
	Protection Agency
EROs	Especies Reactivas del Oxígeno
ERX	Elemento de Respuesta a Xenobióticos
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FMN	Flavín Mononucleótido
GCS	Gamma-Glutamilcisteína Sintetasa
GP	Glutatión Peroxidasa
GR	Glutatión Reductasa
GS	Glutatión Sintetasa
GSH	Glutatión Reducido
GSSG	Glutatión Oxidado o Disulfuro de glutatión
GST	Glutatión S-transferasa
G6PDH	Glutatión 6-fosfato Deshidrogrenasa
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer- International Agency for
	Research on Cancer
IC	Índice de Condición
ICES	Consejo Internacional para la Explotación del Mar
IEO	Instituto Español de Oceanografía
LPO	Peroxidación de las Membranas de los Lípidos
MDS	Escalamiento Multidimensional
MEDPOL	Programa para la Evaluación y Control de la Contaminación en la Región
	Mediterránea
MFO	Sistema de Función Oxidasa Mixta- Mixed Function Oxidase system
MN	Micronúcleo

MT	Metalotioneínas
NOAA	Administración Oceánica y Atmosférica de los EEUU- U.S. National Oceanic
	and Atmospheric Administration
nonSeGP	Glutatión Peroxidasa independiente del selenio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCBs	Bifenilos policorados o Policlorobifenilos
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PN o <i>NB</i>	Célula con Puente Nuclear o Nuclear Bud
RAI	Respuesta Antioxidante Integrada
Se-GP	Glutatión Peroxidasa dependiente del selenio
SFG	Esfuerzo para el Crecimiento- Scope for Growth
SOD	Superóxido Dismutasa
TBT	Óxido de Tributilestaño
UNEP	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente- United Nations
	Environment Programme

RESUMEN

La presencia creciente de una gran variedad de contaminantes químicos en el medio marino supone un riesgo para la salud de los organismos y los ecosistemas. Los programas de vigilancia ambiental son una de las herramientas más empleadas para conocer y regular los niveles de contaminantes químicos en matrices abióticas y bióticas. Dentro de estos programas de monitorización ambiental, el mejillón, debido a sus especiales características, es uno de los organismos indicadores más utilizados. En este contexto, hace dos décadas el Instituto Español de Oceanografía (IEO) inició un programa de vigilancia de la contaminación marina a lo largo del litoral mediterráneo y atlántico español utilizando mejillón silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) como organismo indicador. En esta red de vigilancia se han determinado las concentraciones de algunos de los contaminantes químicos considerados prioritarios, como metales pesados (Hg, Pb, Cd, Cu, Zn) y As, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorados (PCBs), y pesticidas organoclorados (p.e. DDTs), con el objetivo principal de determinar su distribución espacial y tendencias temporales.

El hecho de que los análisis químicos "tradicionales" no permitan conocer si los niveles de contaminantes químicos presentes en el medio marino provocan efectos sobre los organismos, y/o suponen una amenaza para los ecosistemas, ha hecho que se desarrollen una serie de metodologías que evalúan respuestas biológicas asociadas a la contaminación. Entre estas metodologías se incluyen los biomarcadores, que son respuestas determinadas a nivel sub-celular, celular, o tisular, que miden la respuesta y/o efectos tóxicos producidos por los contaminantes sobre los organismos. La evaluación de biomarcadores en estos niveles de organización biológica puede ayudar a diagnosticar el impacto y riesgo que los contaminantes pueden producir a nivel de organismo, población o ecosistema.

En las últimas décadas se ha investigado sobre biomarcadores existentes, y nuevos biomarcadores, para conocer su comportamiento y respuesta frente a la contaminación, determinar la influencia que ejercen sobre ellos los factores abióticos y bióticos, y establecer criterios de evaluación para su aplicación en la gestión del medio marino. Esta investigación continúa en la actualidad, ya que de los múltiples biomarcadores propuestos sólo unos pocos son conocidos con precisión en su comportamiento y respuesta frente a la contaminación ambiental, han sido suficientemente validados en estudios de laboratorio y campo, y se han establecido criterios de evaluación para su aplicación en la evaluación de la calidad ambiental. Otros muchos biomarcadores, aunque prometedores, necesitan una mayor investigación.

En los Capítulos que integran esta Memoria se han estudiado una serie de biomarcadores en mejillón del litoral mediterráneo y noratlántico español, con el objetivo general de estudiar e interpretar su respuesta, y determinar su capacidad para reflejar de forma integrada el impacto de la contaminación ambiental. Entre los biomarcadores estudiados se incluyen biomarcadores recomendados para su aplicación en mejillón en la monitorización de la contaminación del medio marino, como las metalotioneínas (MT) y la frecuencia de micronúcleos (MN). También se han investigado otros biomarcadores cuya aplicabilidad para evaluar la exposición y toxicidad de los contaminantes en mejillón es discutida. Estos incluyen las actividades enzimáticas del sistema de biotrasformación de fase I benzo[a]pireno hidroxilasa (BPH), y DT-diaforasa (DTD), la enzima de conjugación glutation S-transferasa (GST), el estrés oxidativo evaluado a través de la determinación de varias actividades enzimáticas antioxidantes (catalasa- CAT, superóxido dismutasa- SOD, glutatión peroxidasa- GP, y glutatión reductasa- GR), la peroxidación de los lípidos de membrana (LPO), y las frecuencias de células con puentes nucleares (PN), y células binucleadas (BN).

Estos biomarcadores se han medido en glándula digestiva y branquias, órganos esenciales en la entrada y acumulación de contaminantes en mejillón. Las branquias son el órgano encargado de la respiración y la filtración, y constituyen la principal vía de entrada de los contaminantes que se encuentran en forma disuelta en el medio marino. En la glándula digestiva se acumulan y/o metabolizan gran parte de los contaminantes que son ingeridos a través del alimento desde la fase particulada. Conjuntamente, se ha estudiado la influencia sobre estos biomarcadores de parámetros ambientales como la temperatura y la salinidad del agua. Así, en el Capítulo II de esta Tesis se investigan enzimas de biotransformación (DTD, GST), enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GP, GR), MT, y LPO en branquias de mejillón del litoral mediterráneo español, y en el Capítulo III se investigan los sistemas de detoxificación de fase I y II (BPH, DTD, GST), enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GP, GR), MT, y LPO en glándula digestiva. En el Capítulo IV se realiza un análisis comparativo de la respuesta de estos biomarcadores en branquias y glándula digestiva, y se evalúa su capacidad para reflejar de forma integrada la contaminación ambiental. En el Capítulo V se investigan los micronúcleos (MN) y otras anormalidades celulares (PN y NB) en branquias de mejillón mediterráneo como indicadores de cito-genotoxicidad. Por último, en el Capítulo VI se investigan, a través de biomarcadores y parámetros fisiológicos, los efectos biológicos a largo plazo derivados del vertido del buque petrolero "Prestige" en mejillones de la costa gallega.

En las Conclusiones Generales de esta Memoria se incluyen las conclusiones específicas obtenidas de cada uno de los cinco Capítulos que conforman el cuerpo de la misma, y unas conclusiones globales en relación con los objetivos iniciales planteados.

<u>ÍNDICE</u>

1.1	PRINCIPALES CONTAMINANTES EN EL MEDIO MARINO
	1.1.1. Contaminantes Inorgánicos
	1.1.1.1. Aniones Inorgánicos
	1.1.1.2. Metales Pesados y arsénico
	1.1.2. Contaminantes Orgánicos
	1.1.2.1. Hidrocarburos
	1.1.2.2. Bitenilos Policlorados
	1.1.2.3. Pesticidas
	1.1.3. Contaminantes Emergentes
1.2.	MONITORIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN MARINA
	Y LOS EFECTOS BIOLOGICOS
	1.2.1. Monitorización Química y Biológica de la Contaminación
	1.2.2. Monitorización de los Efectos Biológicos. Biomarcadores
1.3.	MECANISMOS DE TOXICIDAD Y DAÑO CELULAR DE
	LOS CONTAMINANTES QUÍMICOS
	1.3.1. Generación de Especies Moleculares Tóxicas
	1.3.2. Peroxidación de los Lipidos de Membrana
	1.3.3. Danos Cito-Genotoxicos
1.4.	MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN CELULAR
	1.4.1. Sistema de Biotransformación de Fase I
	1.4.2. Sistema de Biotransformación de Fase II
	1.4.2.1. Glutatión S-transferasa
	1.4.2.2. DT-Diaforasa
	1.4.3. Defensas Antioxidantes
	1.4.3.1. Defensas Antioxidantes no Enzimáticas
	1.4.3.1.1. Glutatión
	1.4.3.1.2. Metalotioneinas
	1.4.3.2. Defensas Antioxidantes Enzimaticas
	1.4.3.2.1. Superoxido Dismutasa
	1.4.3.2.2. Catalasa
	1.4.3.2.3. Glutation Peroxidasa
	1.4.5.2.4. Giutation Reductasa
1.5.	MEDIDAS FISIOLÓGICAS
	1.5.1. Índice de Condición
	1.5.2. Esfuerzo para el Crecimiento
1.6.	ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
1.7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
CAPÍ	ТИГО П
Respi galloj	nestas antioxidantes en branquias de mejillón (<i>Mytilus</i> provincialis) como biomarcadores de estrés ambiental en la costa

2.1.	Resumen	55
2.2.	Publicación	57
2.3.	Recapitulación	69

3.	CAPÍ Evalua enzima	TULO III ción de los mecanismos de detoxificación de compuestos químicos y as antioxidantes en la glándula digestiva de mejillón, <i>Mytilus</i>	71
	3.1. 3.2. 3.3.	Recapitulación	73 75 87
4.	CAPÍ Especi glándu calidad	F ULO IV ficidad tisular de la respuesta de biomarcadores en el mejillón: la digestiva <i>vs</i> branquias. Uso integrado para la valoración de la l ambiental.	89
	4.1. 4.2.	Publicación Recapitulación	91 112
5.	CAPÍ Micror gallopi en agu	ULO V núcleos y otras anormalidades nucleares en mejillón (<i>Mytilus</i> <i>rovincialis</i>) como biomarcadores de contaminación cito-genotóxica as mediterráneas.	115
	5.1.	Resumen	117
	5.2.	Publicación	119
	5.3.	Recapitulación	133
6.	CAPÍ Evalua NO Es mejilló	TULO VI ción integrada de la calidad del agua de la Costa da Marte (Galicia, paña) a través de parámetros químicos, bioquímicos y fisiológicos en n.	135
	6.1.	Resumen	137
	6.2.	Publicación	139
	6.3.	Recapitulación	155
7.	CAPÍ	TULO VII. CONCLUSIONES GENERALES	157
I.	APÉN	DICE I. METODOLOGÍA ANALITICA	163
	I.I.	Obtención de Fracciones Subcelulares	165
	I.II	Benzo[a]Pireno Hidroxilasa	165
	I.III.	DT-Diaforasa	166
	I.IV.	Glutatión S-Transferasa	167
	I.V.	Metalotioneínas	168
	I.VI.	Superóxido Dismutasa	169
	I.VII.	Catalasa	169
	I.VIII.	Glutatión Peroxidasa	170
	I.IX.	Giutation Reductasa	1/1
	1.A. 1 VI	Concentración de Proteínes	1/2
	1.AI. I VII	Cuantificación de micronúcleos, cálulos con puentos	1/2
	1.711.	nucleares y células binucleadas	173
II.	APÉN	DICE II. ÍNDICES DE IMPACTO	175

CAPÍTULO I

Introducción y Objetivos

1.1. PRINCIPALES CONTAMINANTES EN EL MEDIO MARINO

Se entiende por contaminación la presencia en el medio ambiente de uno o más contaminantes o cualquier mezcla de ellos con capacidad para degradar su calidad y perjudicar la flora, fauna, y/o el bienestar humano. En el medio ambiente en general y el medio marino en particular los contaminantes pueden ser i) de naturaleza física, caracterizados por un intercambio de energía (p.e. radiación) entre la fuente y el receptor, ii) de naturaleza biológica, cuando son organismos vivos, la mayoría microorganismos como bacterias, virus, u hongos, y iii) de naturaleza química, cuando se trata de sustancias orgánicas, inorgánicas, naturales o sintéticas en cualquier estado físico.

Los contaminates químicos constituyen el grupo más importante de contaminantes, debido a su gran número y omnipresencia en el medio ambiente. Los dos tipos principales de contaminantes químicos presentes en los ecosistemas marinos son i) los compuestos inorgánicos, de naturalez polar y solubles en agua (p.e. aniones inorgánicos y metales pesados), y ii) los compuestos orgánicos, de naturaleza apolar y poco soluble en agua. La distinta naturaleza de estos contaminantes hace que sus flujos de entrada y salida a los ecosistemas, su acumulación en agua, sedimento y biota, y su comportamiento e impacto toxicológico sobre la biota y los ecosistemas sean distintos.

La mayor parte de los contaminantes químicos presentes en las zonas marinas costeras tienen un origen antropogénico, debido a la presión humana, urbanización, turismo, agricultura, pesca, acuicultura, transporte marítimo, e industria. Las principales vías de entrada de contaminantes químicos al medio marino son el vertido de residuos domésticos sin tratar, el vertido de hidrocarburos y otros compuestos químicos debido a accidentes durante el transporte de mercancías por el mar, el vertido de excedentes y residuos generados por el uso de fertilizantes y pesticidas en la agricultura, así como los vertidos de las industrias químicas, petroquímicas, y metalúrgicas (EEA 1999, 2003).

1.1.1. <u>Contaminantes Inorgánicos</u>

1.1.1.1. Aniones Inorgánicos

Los principales contaminantes aniónicos inorgánicos son los cloruros, sulfatos, nitratos, fosfatos, y carbonatos. Pertenecen también a este tipo de contaminantes los desechos ácidos, alcalinos y gases tóxicos como los óxidos de azufre, de nitrógeno, amoníaco, cloro, y sulfuro de hidrógeno. El origen de los aniones inorgánicos en el medio marino se debe fundamentalmente a descargas de vertidos domésticos, agrícolas e industriales, así como a la erosión del suelo. Aunque los aniones inorgánicos son contaminantes químicos con baja toxicidad, su uso en grandes cantidades en fertilizantes puede provocar problemas ambientales. El principal problema derivado

del incremento en nitratos y fosfatos disponibles en las aguas es la eutrofización, que puede llegar a producir situaciones de anoxia. Los aniones inorgánicos pueden tener efectos directos sobre los organismos que los captan, como sucede por ejemplo con los nitratos, que pueden convertirse en nitritos en ambientes pobres en oxígeno, y unirse a la hemoblobina, provocando metahemoglobinemia (Walker *et al.* 2001).

1.1.1.2. Metales pesados y arsénico

Todos los metales pesados son tóxicos para los organismos acuáticos, aunque su disponibilidad y grado de toxicidad depende fundamentalmente de la forma química o "especiación" bajo la que se encuentran en el medio acuático (Laws 1981). En el medio marino los metales pesados pueden i) estar retenidos en el sedimento, bien disueltos en el agua intersticial o bien fijados por procesos de adsorción, complejación, y precipitación, ii) estar disueltos en agua, o iii) ser absorbidos y acumulados por los organismos.

Entre los metales pesados se distinguen i) los metales esenciales, que son micronutrientes requeridos en cantidades traza por plantas y animales para su ciclo vital, por ejemplo As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn, y ii) los metales no esenciales, que no tienen una función biológica conocida, por ejemplo Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb y Bi. La presencia en los organismos de bajas concentraciones de metales esenciales es necesaria. Sin embargo, tras un cierto umbral de acumulación, los metales esenciales pueden volverse tóxicos. Por el contrario, los metales pesados no esenciales son tóxicos incluso en baja concentración, debido fundamentalmente a su capacidad para combinarse con una gran variedad de biomoléculas.

El origen de la mayoría de los metales pesados presentes en el medio marino es natural, ya que la influencia de las actividades humanas en los problemas locales de contaminación marina por metales es limitada (Bryan 1976). Las principales fuentes antropogénicas de metales pesados en el medio marino se deben a la extracción de minerales, su fundición, y refinado. La mayor parte de los metales pesados presentes en el mar Mediterráneo tienen un origen natural, ya que sus fuentes antropogénicas (p.e. vertidos desde industrias químicas, aguas de desecho, y agricultura) tienen un efecto limitado, y espacialmente restringido (EEA 1999; Migon 2005). La principal vía natural de entrada de metales en la cuenca mediterránea occidental es el agua atlántica superficial que penetra en el mar Mediterráneo por el Estrecho de Gibraltar (Elbaz-Poulichet *et al.* 2001). El agua atlántica superficial está enriquecida en metales (especialmente Mn, Ni, Cu, Zn y Cd) debido al drenaje hacia el Golfo de Cádiz por parte de los ríos Tinto y Odiel de la "Faja Pirítica Ibérica" (Palanques *et al.* 1995; van Geen *et al.* 1997), una de las provincias metalogénicas más importantes del mundo y, probablemente, la mayor concentración de sulfuros masivos de la corteza terrestre (Strauss y Madel 1974; Quesada 1996). De hecho, la escorrentía de áreas mineras en el sureste de España es aún una de las mayores fuentes de metales pesados en el litoral mediterráneo ibérico (Benedicto *et al.* 2011).

Por otro lado, la principal vía antropogénica de entrada de metales a los mares europeos es la deposición atmosférica, seguida de los aportes de grandes ríos como el Ebro, Ródano o Po, cuya influencia es notable en áreas costeras, y puede constituir la principal fuente de metales particulados en algunas plataformas continentales (Bethoux *et al.* 1990). Esto es particularmente importante cuando se producen episodios de inundaciones que suponen la llegada de grandes cantidades de metales al medio marino.

En los seres vivos la mayoría de los metales se absorben en forma de sales inorgánicas. Sin embargo, algunos metales se absorben significativamente en forma de compuestos organometálicos. Esto es debido principalmente a la "biometilación", proceso que tiene lugar sobre todo en sedimentos, estuarios, ríos, lagos, y océanos, y en el que se adiciona un grupo metilo a un metal o metaloide, lo que transforma sustancialmente sus propiedades físicas, químicas, y biológicas, incluyendo su toxicidad. Entre los compuestos organometálicos más tóxicos se encuentran los derivados orgánicos del mercurio, como el dimetilmercurio y metilmercurio, los derivados orgánicos del arsénico, mono y di-metilados, los compuestos orgánicos de níquel, y los derivados organometálicos de estaño.

La presencia de cinc (Zn) en el medio marino tiene un origen fundamentalmente natural, siendo las principales fuentes antropogénicas de este metal la extracción de esfalerita y pirita, la industria metalúrgica y galvánica, las plantas incineradoras, los productos anticorrosivos, las pinturas, los plásticos, y el caucho. En los seres vivos el Zn forma parte de un gran número de metaloenzimas que participan en el metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, dando estabilidad a moléculas biológicas como el ADN, y a estructuras como las membranas y los ribosomas. No obstante, el Zn puede llegar a ser tóxico para los invertebrados acuáticos y peces dependiendo de su concentración, la especie química en que se encuentre, y el grado de conversión entre sus distintas formas (Leonard y Gerber 1989; Eisler 1993). La mayor parte del Zn que entra en el medio acuático se acumula en los sedimentos, mientras que en disolución el Zn se especia en la forma tóxica de ión hidratado [Zn(H₂O)₆]²⁺, otras especies químicas disueltas, y varios complejos inorgánicos y orgánicos (Young et al. 1980). La biodisponibilidad y toxicidad del Zn para los organismos acuáticos es mayor a menor pH, alcalinidad y contenido en oxígeno disuelto, y a mayor temperatura del agua. Así mismo, las especies solubles de Zn son más biodisponibles y más toxicas que las formas no solubles (Weatherley et al. 1980). El principal efecto tóxico del Zn para los organismos acuáticos es su capacidad para dañar el epitelio branquial, lo que puede provocar hipoxia, fallos osmoregulatorios, acidosis, y disrupción del intercambio de gas en la superficie de las branquias y en tejidos internos (Spear 1981).

La mayor parte del cobre (Cu) presente en el medio marino tiene un origen natural, siendo sus principales fuentes antropogénicas las industrias eléctricas, de construcción y canalización, la

agricultura, y su aplicación en farmacología. En los países mediterráneos la producción de Cu ha disminuido en los últimos años debido a su sustitución por materiales más baratos. No obstante, su uso como fungicida en viñedos, así como en pinturas antiincrustantes, especialmente tras las restricciones impuestas sobre el óxido de tributilestaño (TBT), suponen aún importantes fuentes de emisión de Cu al medio marino (EAA 1999). El Cu es un micronutriente esencial implicado en el metabolismo de carbohidratos, el funcionamiento de enzimas, o la formación de hemoglobina y hemocianina, entre otras funciones. El Cu es acumulado en alto grado por los organismos filtradores, principalmente por los macroinvertebrados (Laws 1981). La especiación química del Cu en el medio acuático es muy compleja, pudiendo aparecer en la fracción insoluble en forma de coloides, o en la fracción soluble en forma de iones de Cu hidratados y una gran variedad de complejos orgánicos e inorgánicos. No obstante, la forma más común del Cu en el medio acuático es Cu(II), estando su mayor parte adsorbido en las partículas suspendidas o formando complejos con diversos ligandos orgánicos e inorgánicos. Sólo una pequeña fracción de este Cu(II) se presenta como ión "libre" (Cu²⁺), que es su forma más biodisponible y tóxica para los organismos acuáticos (Moore y Ramamoorthy 1984). De hecho, la toxicidad del Cu está más relacionada con la actividad de sus iones libres y las mezclas de este metal con otros metales que con la concentración total del metal. La toxicidad del Cu se debe principalmente a su rápida unión con la membrana de las branquias, lo que hace que ésta pierda su habilidad para regular el transporte de sales y perjudica el sistema cardiovascular y nervioso. Además, el Cu afecta negativamente al sentido del olfato en peces, limitando su capacidad para encontrar comida, evitar predadores, y migrar (Hodson et al. 1979).

La presencia de mercurio (Hg) de forma natural en el medio acuático se debe principalmente a su arrastre por parte del agua de escorrentía, así como a la erosión de la corteza terrestre, y el vulcanismo. Las principales fuentes antropogénicas de Hg en el medio acuático son la explotación de yacimientos minerales, procesos metalúrgicos e industriales, centrales térmicas de carbón, aguas residuales urbanas, termómetros, barómetros, fármacos, plaguicidas, pinturas antisuciedad, baterías, catalizadores, y amalgamas. También son fuente de Hg los combustibles fósiles y la producción de acero, cemento, y fosfatos. La utilización de fungicidas alquilmercuriales para el tratamiento de semillas fue también, hasta su prohibición, una fuente importante de este elemento. Los niveles de Hg en el mar Mediterráneo son superiores a los del océano Atlántico, lo que parece ser debido al hecho de que la región mediterránea es parte del cinturón Cincunpacifico-Mediterráneo-Himalayo, rico en Hg (Moore y Ramamoorthy, 1984). Aunque el Hg es tóxico para los organismos acuáticos incluso a bajas concentraciones, su toxicidad depende de la forma química en la que se encuentre. La forma inorgánica más tóxica es su forma aniónica libre (Hg⁺²), mientras que la forma orgánica más tóxica es el metilmercurio, compuesto en el que se transforma el Hg en el medio acuático a través de su metilación por procesos naturales (Jernelov 1972). El metilmercurio es capaz de atravesar las membranas biológicas y acumularse en los tejidos grasos de los organismos, biomagnificándose en los niveles superiores de la cadena trófica miles o millones de veces más que en agua o sedimento

(Wright y Welbourn, 2002). De hecho, el metilmercurio se encuentra entre los 6 compuestos químicos más peligrosos en el medio ambiente y su uso está restringido en todo el mundo (GESAMP 1986). Los compuestos que contienen Hg interfieren con el metabolismo de las moléculas que contienen grupos tiol, causando inhibición o inactivación de proteínas (Eisler 1987a). Las consecuencias tóxicas del Hg en peces incluyen la pérdida de coordinación y apetito, disminución de la capacidad de nadar, reducción del éxito reproductivo y de la supervivencia de las etapa larvarias, lesiones cerebrales, y muerte (Weiner *et al.* 2003).

El cadmio (Cd) es un metal poco abundante en la naturaleza, donde se encuentra asociado a depósitos minerales de Zn, Pb y Cu. Las principales fuentes antropogénicas de Cd en el medio ambiente se deben a su obtención como subproducto en la extracción minera de Zn y Pb y en la producción de diferentes aleaciones, a su uso como pigmento en pinturas, recubrimiento de metales, baterías, fertilizantes fosfatados, galvanoplastia, soldaduras y estabilizante del PVC, y fabricación de pigmentos para esmaltes, y de pilas de Ni-Cd. En los últimos años las emisiones de Cd al medio marino han aumentado, debido a su mayor producción comercial, y aumento de sus aplicaciones (EAA 1999). La forma dominante y más biodisponible del Cd en el agua marina es como ión libre (Cd²⁺). Los complejos orgánicos de Cd constituyen una parte significativa del Cd disuelto, aunque menos biodisponible que sus formas inorgánicas. El Cd es uno de los metales pesados más peligrosos para los organismos y los ecosistemas debido a su elevada toxicidad a bajos niveles de exposición y su capacidad de acumulación en la cadena alimentaria. Los efectos tóxicos del Cd en los organismos marinos incluyen toxicidad en el riñón, efecto inmunosupresor, efectos teratogénicos, alteración de la función y estructura de órganos como el hígado, branquias e intestino, inducción de estrés oxidativo, aumento de la mortalidad, reducción del crecimiento, o inhibición de la reproducción (Ferm y Layton 1981; Eisler 1985; ATSDR 1999).

El plomo (Pb) se encuenta ampliamente distribuido en la naturaleza en forma de depósitos minerales y tiene numerosas aplicaciones para el hombre como la fabricación de acumuladores eléctricos y soldaduras, fabricación de pinturas y aditivos para las gasolinas, y su utilización en la industria del vidrio y de la cerámica. Las emisiones más importantes de Pb a la atmósfera proceden de la combustión de gasolinas con aditivos antidetonantes (tetraetilo de plomo), de las fundiciones de Pb y Cu, y de las industrias del hierro y del acero (Moore y Ramamoorthy 1984). La principal vía de entrada de Pb al medio marino es la deposición atmosférica, aunque en los últimos años se ha producido un descenso progresivo de las emisiones de Pb en casi todos los países desarrollados, debido fundamentalmente al aumento del uso de gasolinas sin Pb, y a la eliminación casi total de las soldaduras de Pb de los envases metálicos (EAA 1999). En el medio marino el Pb se puede encontrar disuelto, en forma de complejos con cloruros, hidroxilos y compuestos orgánicos, como ion libre divalente (Pb⁺²), como carbonato o sulfato (Pain 1995). El Pb en disolución es tóxico para los organismos acuáticos, siendo las formas iónicas libres más tóxicas que la complejadas. Por otro lado,

las formas orgánicas del Pb son, en general, más tóxicas que las inorgánicas, y los etil-derivados más toxicos que los metil-derivados, incrementadose su toxicidad con el grado de alquilación (Godwin 2001). En organismos acuáticos el Pb disuelto incrementa la formación de mucus, especialmente en las branquias, interfiriendo con la función respiratoria. En peces el Pb produce curvatura espinal, degeneración de la aleta caudal, reducción de la habilidad para nadar, destrucción de neuronas, alteración de la química de la sangre por inhibición de la síntesis del grupo hemo, anemia, destrucción del epitelio respiratorio, inhibición del crecimiento, o retardo de la madurez sexual (Demayo *et al.* 1982).

El arsénico (As) es un metaloide, ya que tiene propiedades metálicas y no metálicas. El As se encuentra presente de forma natural en cantidades abundantes en la corteza terrestre, mientras que sus principales fuentes antropogénicas son la minería, la fundición de metales, plantas eléctricas de carbón, así como su uso en la elaboración de medicamentos y plaguicidas, incluyendo conservantes de la madera. Se ha observado una elevada concentración de As en aguas mediterráneas del noreste peninsular, lo que parece estar relacionado con un distrito minero de Pb-Zn localizado al este de los Pirineos y sur-oeste de Francia, cerca del borde con España (De Vos y Tarvainen 2006). En agua marina el As puede tomar cuatro valencias (+5, +3, 0, -3). El As elemental es muy raro, y la arsina (As^{-3}) solo aparece en medios altamente reductores. Arsenato (As^{+5}) y arsenito (As^{+3}) son las formas inorgánicas dominantes en el medio marino, mientras que las formas orgánicas dominantes son el ácido monometilarsónico y el ácido dimetilarsínico. Los organismos marinos bioacumulan As desde el agua, fundamentalmente en las formas orgánicas no tóxicas de arsenobetaina y arsenocolina, aunque no hay evidencias de que se biomagnifique a través de la cadena trófica (Fattorini et al. 2004). La toxicidad del As depende fundamentalmente de la forma química en que se encuentre, siendo los compuestos inorgánicos más tóxicos que los orgánicos, y los compuestos de As trivalentes más tóxicos que los pentavalentes. No obstante, algunas formas orgánicas solubles metiladas del As que contienen grupos metilo o fenilo (p.e. el ácido monometilarsónico y el ácido dimetilarsínico) también son tóxicas. Los efectos tóxicos del As incluyen la desnaturalización de enzimas a través de la interacción con los grupos sulfhidrilo, daño celular a través del incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno, alteración de la regulación de genes, y generación de cáncer (Eisler 1988; Thomas et al. 2001). La toxicidad y persistencia del As, junto con las evidencias de su efecto carcinógeno en el hombre han hecho que se su uso se haya restringido en todo el mundo (GESAMP 1986).

1.1.2. Contaminantes Orgánicos

Los contaminantes orgánicos pueden clasificarse por su incidencia en el medioambiente en i) contaminantes orgánicos volátiles, y ii) contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Los contaminantes orgánicos volátiles tienen un peso molecular bajo (número de atomos de carbono entre 2 y 12) y su origen puede ser natural o sintético. Los COPs también pueden ser de origen natural o sintético y son semi-volátiles, poco solubles en agua, y de carácter lipofílico. Su lipofilidad hace que los COPs penetren fácilmente a través membranas biológicas y se acumulen en biota y sedimentos, donde tienen una gran capacidad de persistencia y toxicidad. Dentro de los COPs se incluye un sinfín de sustancias que se pueden clasificar fundamentalmente en: i) hidrocarburos, ii) bifenilos policlorados, iii) pesticidas, iv) dibenzofuranos policlorados, v) bifenilos polibromados, vi) dibenzofucanos policlorados.

Los COPs se han asociado con un impacto ambiental importante en un amplio rango de especies y en todos los niveles tróficos. Muchos COPs se han relacionado con efectos adversos en los organismos acuáticos y en humanos tales como fallo reproductivo, disminución del crecimiento, histopatologías, disrupción endocrina, inmunosupresión, mutaciones, cáncer, y muerte. Por ello, en 2001 el "Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos y Persistentes" estableció el control y eliminación de 12 compuestos peligrosos agrupados bajo el calificativo de "La Docena Sucia". Este grupo de compuestos incluyó ocho pesticidas (aldrín, clordano, dieldrín, endrín, heptacloro, mirex, toxafeno y diclorodifeniltricloroetano- DDT), dos productos industriales (hexaclorobenceno y los policlorobifenilos- PCBs), y dos residuos de la actividad industrial (dioxinas y furanos). En 2009 la lista se amplió con otros diez COPs: α -hexaclorociclohexano y β hexaclorociclohexano (subproductos); lindano clordecona (plaguicidas); v éter de tetrabromodifenilo, éter de pentabromodifenilo, hexabromobifenilo, pentaclorobenceno, ácido sulfónico de perfluorooctano, y fluoruro de sulfonilo perfluorooctano (productos químicos industriales).

1.1.2.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos se clasifican en i) hidrocarburos alifáticos (alcanos, alquenos y alquinos), cuando presentan enlaces carbono-hidrógeno simples, dobles y triples en su molécula, o ii) hidrocarburos aromáticos, cuando contienen estructuras de anillo en su molécula. Los hidrocarburos aromáticos son mucho más reactivos que los alifáticos, lo que les confiere una elevada persistencia y toxicidad para los organismos acuáticos y el hombre. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) poseen en su molécula dos o más anillos de benceno o, en algunos casos, un anillo pentagonal, con o sin sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrogeno (Figura 1). Algunos HAPs tienen capacidad mutagénica y teratogénica, lo que ha hecho que este tipo de compuestos se hayan incluido en las listas de sustancias tóxicas peligrosas elaboradas por diferentes organismos internacionales como la Agencia Americana de la Protección del Medio Ambiente (EPA), la Agencia Internacional para la Investigacion del Cancer (IARC), o la Unión Europea (EPA 1980; IARC 1987; Directiva 2000/60/EC).



Figura 1: Estructura y fórmula general de algunos HAPs, PCBs y DDTs

El origen de los HAPs en el medio ambiente puede ser i) pirogénetico, debido a la combustión incompleta de materia orgánica a temperatura muy alta (incendios forestales, combustión de productos fósiles, incineración de residuos, usos industriales, etc.), ii) petrógenico, debido al vertido de petróleo o de sus derivados, y iii) natural, debido a la diagénesis de productos naturales en sedimentos recientes, a la biosíntesis directa por parte de organismos (origen biogénico), y a erupciones volcánicas (Neff 1979). No obstante, la mayor parte de los HAPs presentes en el medio marino son de origen antropogénico, debido al vertido de petróleo y sus derivados por accidentes y fugas desde refinerías o durante su transporte, y su vertido en operaciones de rutina de buques, cargueros, pesqueros o barcos de recreo (p.e. lavado de tanques, carga y descarga, etc). En Europa el transporte anual por vía marítima de petróleo crudo y sus derivados (gasolina, gasóleo, fuel, etc.) es superior a 1.000 millones de toneladas, produciéndose cerca de 3.000 vertidos anuales de hidrocarburos, de los cuales el Mediterráneo recibe entre el 45 y 60% (Oceana 2003). En el periodo 1991-2009 se produjeron 135 accidentes de buques petroleros en el litoral español, siendo el vertido de más de 60.000 toneladas de fuel oil pesado del buque petrolero "Prestige", en noviembre de 2002, la última gran catástrofe de estas características en las costas españolas (OSE 2010).

En el medio acuático los HAPs pueden evaporarse, dispersarse en la columna de agua, incorporarse a los sedimentos, concentrarse en la biota, o experimentar oxidación y biodegradación química, fundamentalmente fotooxidación, oxidación química, y transformación biológica por bacterias y animales. El 50% de los HAPs presentes en el mar Mediterráneo se acumulan en la zona
de 0 a 200 m de profundidad, y la mayor parte están asociados con el material particulado (Lipiatou *et al.* 1997). Sólo un tercio de los HAPs están presentes en disolución en la columna de agua, donde se degradan rápidamente a través de la fotooxidación (Neff 1979). La bioacumulación y toxicidad de los HAPs para los organismos acuáticos es mayor a mayor peso molecular del compuesto, mayor número de sustituyentes alquilo en el anillo aromático, mayor coeficiente de partición octanol/agua, mayor contenido en materia orgánica disuelta en el sedimento, y mayor contenido lipídico del organismo. Además, la toxicidad de los HAPs también depende de una gran variedad de factores endógenos y exógenos (Eisler 1987b). En el litoral mediterráneo español los mayores niveles de HAPs en mejillón silvestre han sido observados cerca de núcleos urbanos y puertos relevantes, como Barcelona, Tarragona, Valencia y Algeciras. El origen de la mayor parte de estos HAPs es pirolítico (León *et al.* en prensa).

1.1.2.2. Bifenilos Policlorados

Los policlorobifenilos o bifenilos policlorados (PCBs) son una clase de 209 compuestos de origen exclusivamente antropogénico constituidos por una molécula de bifenilo a la cual se unen de 1 a 10 átomos de cloro (Figura 1). Los PCBs con distinto número de átomos de cloro se denominan congéneres, mientras que los que tienen el mismo número de átomos de cloro pero en diferente posición se demominan isómeros. El grado de cloración de los PCBs determina sus propiedades fisicoquímicas. Los PCBs se clasifican en función de la posición del cloro en su molécula en i) coplanares o no-orto, ii) mono-orto, y iii) no coplanares.

Los PCBs fueron producidos comercialmente a partir de 1930 por sus múltiples aplicaciones industriales como componentes de transformadores eléctricos, condensadores, sistemas hidráulicos, fluidos de transferencia de calor, dispersores en plásticos, pinturas y tintas, adhesivos y aditivos para aceites, auxiliares textiles, y pesticidas. Sin embargo, debido a su capacidad de bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena alimentaria, alta persistencia en el medio ambiente, y baja tasa de degradación fueron retirados del mercado en los Estados Unidos por la EPA en 1979, y prohibidos en la Unión Europea en los años 80 (WHO 1993a). A pesar de su prohibición, parte de los PCBs emitidos al medio ambiente todavía persisten en los distintos compartimentos ambientales. Los PCBs se acumulan en mayor grado en los organismos y son más resistentes a la degradación al incrementarse el número de átomos de cloro en la molécula (Sánchez et al. 1993). El grado de toxicidad de los PCBs es también proporcional a la posición de los átomos de cloro en su molécula, siendo los PCBs coplanares o no-orto más tóxicos que sus congéneres no coplanares. Los PCBs tienen efectos tóxicos sobre procesos biológicos esenciales para los organismos marinos como la reproducción, desarrollo e inmunidad (Harding y Addison 1986). Los PCBs son capaces de inducir el citocromo P450, que es el responsable de la activación metabólica de promutágenos y procarcinógenos en vertebrados (Nebert et al. 2000). También existen evidencias de que los PCBs

pueden actuar como disruptores endocrinos e inmunosupresores (Safe 1995). En el mar Mediterráneo los PCBs muestran un amplio rango de concentraciones, con menores niveles en mar abierto que cerca del litoral. Las concentraciones más relevantes de PCBs se alcanzan cerca de la desembocadura de los ríos europeos más importantes como Ródano, Po o Ebro (Gabrielides 1994; Tolosa *et al.* 1997). Por ejemplo, los mayores niveles de PCBs detectados en el litoral mediterráneo español a través de una monitorización activa de la contaminación usando mejillones colocados en cajas se encontraron en lugares bajo la influencia de los ríos Ebro, Besos y Llobregat (Scarpato *et al.* 2010).

1.1.2.3. Pesticidas

Los pesticidas son sustancias que se usan para prevenir, destruir, o controlar plagas (WHO 1962). Bajo esta denominación se incluye un amplísimo espectro de productos químicos industriales que ya en 1993 incluían más de 13 millones de sustancias a las que se sumaban cada año unos 500.000 nuevos compuestos (Stephenson y Solomon 1993). En Europa el uso de pesticidas en la agricultura se ha incrementado en los últimos 20 años, especialmente por el desarrollo de la agricultura intensiva. La mayor parte de los pesticidas presentes en el medio marino penetran a través de la deposición atmosférica, aportes de ríos, y agua de escorrentía, siendo esta última su mayor fuente en el medio marino europeo (EAA 1999). En el mar Mediterráneo los principales puntos de entrada de pesticidas son los grandes ríos como el Ródano, el Ebro o el Po (Provini *et al.* 1991).

Su acción espécifica sobre plagas permite clasificar a los pesticidas en acaricidas, algicidas, avicidas, bactericidas, desinfectantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, larvicidas, molusquicidas, nematicidas, pisticidas, o rodenticidas, mientras que su toxicidad permite clasificarlos como supertóxicos, extremadamente tóxicos, muy tóxicos, moderadamente tóxicos, ligeramente tóxicos o prácticamente no tóxicos si su dosis letal para el 50% de la población probrada es <5 mg kg⁻¹, 5-50 mg kg⁻¹, 50-500 mg kg⁻¹ 500-5000 mg kg⁻¹, 5-15 g kg⁻¹ >15g kg⁻¹, respectivamente. Por otro lado, atendiendo a su estructura los pesticidas se pueden clasificar en <u>fungicidas</u> (inorgánicos, azufre orgánico-derivados del ácido ditiocarbámico, derivados del benzeno, benzidimidazol), <u>insecticidas</u> (tradicionales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y otros), y <u>herbicidas</u> (triazinas, fenoxi, amidas sustituidas, dinitroanilina, tiocarbamatos, sulfonil ureas). No obstante, los pesticidas más importantes por su amplio uso durante el siglo XX y su persistenca, toxicidad y capacidad de acumulación en el medio ambiente son los insecticidas organoclorados.

Los <u>insecticidas organoclorados</u> contienen en su composición como ingredientes activos distintos compuestos organoclorados que aportan estabilidad a la descomposición en el medio ambiente, baja solubilidad en agua, alta solubilidad en medios hidrocarbonados, y relativamente alta toxicidad para los insectos, pero baja para los seres humanos. Sin embargo, las mismas propiedades

que hacen que los insecticidas organoclorados sean altamente eficaces para actuar contra las plagas, hacen que sean también altamente tóxicos para otros organismos. En países desarrollados la mayoría de los insecticidas organoclorados han sido retirados del mercado, y su uso ha sido prohibido. Por ejemplo, el DDT fue prohibido en los Estados Unidos en 1972 y en Europa en 1979, y aldrín, clordano, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenzeno, mirex y toxafeno fueron prohibidos en la Unión Europea por el Reglamento 850/2004. No obtante, en mucho países en vías de desarrollo algunos de estos compuestos siguen siendo producidos y usados para el control de los mosquitos como vectores de enfermedades. La principal vía de entrada de insecticidas organoclorados al medio marino en general y al mar Mediterráneo en particular es a través de la deposición atmosférica (GESAMP 1989; EEA 1999). No obstante, en áreas costeras espacialmente restringidas la principal entrada de insecticidas organoclorados puede ser a través de la desembocadura de grandes ríos y aguas de escorrentía.

Los insecticidas organoclorados se dividen fundamentalmente en cuatro grupos atendiendo a su estructura molecular: i) derivados del clorobenzeno: grupo del DDT y análogos (metoxicloro, pertano), ii) derivados del hexaclorociclohexano y sus isómeros (lindano), iii) derivados del indano o ciclodienos (aldrín, endrín, dieldrín, clordano, endosulfan, heptacloro), y iv) canfenos clorados (toxafeno, clordecona). No obstante, el grupo de pesticidas organoclorados más ampliamente distribuido en el medioambiente es el de los DDTs y sus derivados. En este grupo se encuentran el pp'-DDT y sus metabolitos DDE (dicloro-difenil-dicloroetileno), y DDD (dicloro-difenil-dicloroetano) (Figura 1). Los mayores niveles de DDTs en el mar Mediterráneo se encuentran en áreas bajo la influencia de los principales ríos europeos (EEA 1999). Por ejemplo, en el mediterráneo occidental las mayores concentraciones de DDTs detectadas a través de una monitorización activa de la contaminación usando mejillones colocados en cajas se observaron en las costas de Francia, en el área de Marsella, bajo la influencia del río Ródano (Scarpato *et al.* 2010). En España, los mayores niveles de DDT se observaron en el área de Barcelona, debido a la influencia de los ríos Ebro, Llobregat y Besos (Scarpato *et al.* 2010).

1.1.3. Contaminantes Emergentes

Durante las últimas décadas la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos "clásicos", cuya presencia en el medio ambiente está o ha estado regulada por distintas legislaciones. Sin embargo, en los últimos años el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis químico ha alertado sobre la presencia de otros contaminantes potencialmente peligrosos, denominados genéricamente como "contaminantes emergentes". Entre los contaminantes emergentes se incluyen i) contaminantes previamente desconocidos, y ii) contaminantes no reconocidos como tales con anterioridad, y cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí lo es la preocupación por las posibles consecuencias nocivas

derivadas de la misma (Daughton 2004). Los contaminantes emergentes son compuestos para los que los métodos de detección y cuantificación analítica son limitados, de los que se sabe relativamente poco o nada sobre su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, y sobre los que no existen regulaciones. Otra particularidad de estos compuestos es que debido a su elevada producción y consumo y, como consecuencia de su continua introducción en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos tóxicos (Petrovic *et al.* 2003). Por todo esto, el estudio de los contaminantes emergentes se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental (Organización Mundial de la Salud- OMS-, EPA, Comisión Europea).

Entre los contaminantes emergentes se incluyen: i) retardantes de llama bromados que se emplean en una gran variedad de productos comerciales como muebles, plásticos, tejidos, pinturas, aparatos electrónicos, etc.; ii) parafinas cloradas empleadas fundamentalmente como aditivos en fluidos de corte, lubricantes usados en carpintería metálica y en la industria automovilística, y como plastificantes en materiales de PVC, en pinturas, adhesivos, etc.; iii) pesticidas polares, iv) compuestos perfluorados, utilizados como detergentes, refrigerantes, polímeros, en preparados farmacéuticos, retardantes de llama, lubricantes, adhesivos, cosméticos, insecticidas, tejidos, recipientes alimentarios, automóviles, etc.; v) fármacos, como antibióticos, analgésicos, medios de contraste, citostáticos, estrógenos o antiinflamatorios; vi) drogas de abuso, como la cocaína; y vii) metabolitos y/o productos de degradación de todas las clases de sustancias anteriores.

1.2. <u>MONITORIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN MARINA Y LOS EFECTOS</u> <u>BIOLÓGICOS</u>

1.2.1. Monitorización Química y Biológica de la Contaminación Marina

La constatación de que la presencia en el medio marino de algunos compuestos químicos puede ocasionar efectos deletéreos sobre la salud de los organismos y los ecosistemas ha fomentado la investigación para conocer la exposición, destino y efectos de los contaminantes en el medio acuático, así como el establecimiento de controles y regulaciones por parte de diferentes organismos internacionales sobre su producción y uso (Crathorne *et al.* 1996).

Los programas de vigilancia o monitorización son una de las herramientas más empleadas para identificar, seguir, regular, y controlar las concentraciones de compuestos químicos en los distintos compartimentos ambientales. La monitorización consiste en la observación repetitiva en el espacio y tiempo de compuestos químicos o elementos biológicos utilizando métodos estandarizados de medida (WHO 1974). La monitorización puede ser i) <u>química</u>, cuando se miden los niveles de contaminantes en compartimentos ambientales abióticos, y ii) <u>biológica o de bioacumulación</u>, si los niveles de contaminantes se miden en biota (Van der Oost *et al.* 2003). Además, dentro de la

monitorización biológica se pueden usar dos aproximaciones distintas: i) la monitorización activa, en la que organismos no estresados o provenientes de lugares no contaminados son transplantados a sitios contaminados para hacer un seguimiento de las consecuencias químicas y biológicas del transplante a lo largo del espacio y tiempo, y ii) la monitorización pasiva, en la que se emplean organismos de poblaciones naturales localizadas en lugares donde se quiere evaluar la calidad ambiental (Smolders *et al.* 2005).

La monitorización química en el medio marino es complicada debido a que las bajas concentraciones de compuestos químicos disueltos en agua dificultan su cuantificación. Esto ha fomentado la monitorización biológica usando organismos "centinela" capaces de bioacumular en sus tejidos los contaminantes químicos presentes en el medio marino. Entre los organismos centinela más empleados se encuentra el mejillón, especialmente a partir de la implementación del Proyecto Internacional de Vigilancia con Mejillón -Internacional Mussel Watch Project- promovido por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la Organización Educacional, Científica y Cultural (UNESCO), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP), y la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica de los Estados Unidos (NOAA) (Goldberg 1975; NOAA 1995). Esto se debe a que su sedentarismo, carácter filtrador, y alta tolerancia a condiciones de estrés ambiental hace que los mejillones sean capaces de acumular en sus tejidos los compuestos químicos presentes en el agua en concentraciones mucho mayores de las que presentan en el medio marino, pero en una extensión que refleja con bastante exactitud su nivel ambiental (Widdows y Donkin, 1992). Además, la amplia distribución geográfica, tamaño y estabilidad de sus poblaciones hacen que los mejillones puedan ser fácilmente obtenidos de poblaciones naturales o cultivadas para su uso en la monitorización biológica pasiva (Goldberg 1975; Sericano 2000), o que puedan ser transplantados y mantenidos en cajas en lugares de interés para una bio-monitorización activa (Kock y Kramer 1994).

1.2.2. Monitorización de los Efectos Biológicos

Aunque la monitorización química y biológica permiten conocer los niveles de contaminantes en compartimentos ambientales abióticos y bióticos, estas herramientas no evaluan el riesgo que la presencia de estos contaminantes supone para los organismos y los ecosistemas. Para ello, se necesitan metodologías específicas que determinen los efectos biológicos asociados a la contaminación, y que establezcan relaciones entre el nivel de exposición y la severidad del efecto biológico (NRC 1987; WHO 1993b; De Zwart 1995; OSPAR 2004a,b).

Las metodologías de efectos biológicos se pueden calsificar en i) indicadores ecológicos, que identifican efectos sobre la estructura y/o funcionamiento de los ecosistemas a través de medidas en cambios en la composición, abundancia o diversidad de especies, ii) bioindicadores, que estiman la situación de las poblaciones (p.e. estructura genética, estructura de edad o abundancia) a través de medidas de la presencia, ausencia, o comportamiento de individuos, iii) bioensayos, que identifican los efectos sobre individuos a través de medidas de su supervivencia, crecimiento, reproducción, etc., y iv) biomarcadores, que evalúan los efectos de la contaminación a niveles de organización biológica inferior al individuo a través de medidas de respuestas o efectos a nivel tisular, celular o sub-celular (Suter 1993). La relevancia ambiental de estas metodologías es mayor cuanto mayor es el nivel de organización biológica sobre el que diagnostican el efecto de la contaminación. Por lo tanto, las metodologías con mayor relevancia ambiental son los indicadores ecológicos y los bioindicadores. Sin embargo, el diagnóstico de los efectos de la contaminación a estos niveles de organización biológica es muy complicado, ya que éstos suelen manifiestarse tras largos periodos de tiempo, cuando pueden ser irreversibles (Adams 2001; Amiard *et al.* 2000).

Biomarcadores

Se han propuesto diferentes definiciones para el término biomarcador. Genéricamente los biomarcadores han sido definidos como "alteraciones bioquímicas, histológicas o fisiológicas, o manifestaciones de estrés ambiental" (NRC 1987), o "medidas capaces de reflejar la interacción entre un sistema biológico y cualquier riesgo potencial para él de carácter químico, físico o biológico" (WHO 1993b). Más restrictivamente los biomarcadores se han definido como "medidas a nivel molecular, bioquímico o celular tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes" (McCarthy y Shugart 1990; Stegeman et al. 1992). Además, los biomarcadores se han clasificado como i) biomarcadores de "exposición", que detectan la interacción entre un compuesto y una molécula o célula diana, ii) biomarcadores de "efecto", que identifican alteraciones bioquímicas, celulares o tisulares asociadas con un daño en la salud del organismo, y iii) biomarcadores de "susceptibilidad", que miden la capacidad inherente o adquirida para responder a la amenaza que supone la exposición a una sustancia. Los biomarcadores de exposición se suelen usar para verificar la exposición a una sustancia o grupo de sustancias, los biomarcadores de efecto se suelen usar para identificar alteraciones o efectos adversos debido a la exposición y absorción de esas sustancias, mientras que los biomarcadores de susceptibilidad aclaran las variaciones en el grado de respuesta a la exposición a esas sustancias entre distintos individuos o especies. Esta subdivisión de biomarcadores puede llegar a ser un tanto difusa, va que los biomarcadores de exposición pueden considerarse como de efecto tras una cierta exposición (Peakall y Shugart 1993).

El uso de biomarcadores para evaluar los efectos biológicos de la contaminación ofrece varias ventajas: i) identifican las interacciones iniciales de los contaminantes con los organismos, lo que permite detectar y diagnosticar tempranamente el riesgo, y los efectos adversos que estos compuestos pueden provocar en niveles de organización biológica superiores; ii) detectan la

presencia de contaminantes conocidos o desconocidos, así como de las mezclas complejas en las que los contaminantes se presentan en el medio ambiente; e iii) identifican la interacción contaminanteorganismo, ayudando a establecer las rutas de exposición más importantes, y suministrando información temporal y espacial sobre la toxicidad de los contaminantes, su biodisponibilidad, y sus efectos acumulativos en moléculas, células o tejidos diana (Bayne et al. 1985; McCarthy y Shugart 1990; Sarkar et al. 2006). Sin embargo, los biomarcadores también presentan limitaciones. Por ejemplo, la influencia de variables ambientales y biológicas, así como el órgano o tejido en el que se determinan, pueden modificar su respuesta, dificultando su interpretación y limitando su aplicabilidad (Engel y Vaughan 1996). Por ello, la aplicación de biomarcadores en programas de bio-monitorización ambiental debe estar supeditada a la satisfacción de gran parte de estas demandas: i) ser sensibles a los niveles ambientales de contaminantes y tener un amplio espectro de respuesta desde condiciones óptimas hasta condiciones letales; ii) reflejar una relación cuantitativa predecible con los niveles de exposición y acumulación de contaminantes; iii) ser aplicables en laboratorio y en campo para poder relacionar las respuestas encontradas en ambos tipos de estudios; iv) proporcionar una respuesta integrada a la carga total de contaminantes, e informar sobre sus mecanismos de toxicidad y acción; v) tener una relativamente corta respuesta en el tiempo para poder detectar el impacto de la contaminación en sus etapas incipientes; y vi) ser capaces de predecir los efectos negativos de la contaminación sobre los organismos, poblaciones y, en último término, los ecosistemas.

Con el objetivo de superar las limitaciones de los biomarcadores y las restricciones que presenta su uso individualmente, muchos autores recomiendan el uso de baterías de biomarcadores a distintos niveles de organización biológica (Viarengo *et al.* 2000a; Monserrat *et al.* 2007). La utilización de mútiples biomarcadores puede ser esencial, particularmente en ambientes donde están presentes mezclas complejas de contaminantes, ya que una batería de biomarcadores puede reflejar con mayor fidelidad la contaminación ambiental, así como identificar distintos tipos de contaminantes, y el efecto sinérgico de sus mezclas (Domini *et al.* 2007). Por lo tanto, y aunque el uso exclusivo de biomarcadores no puede reemplazar a los métodos clásicos de análisis químico, la integración de biomarcadores en programas de monitorización química y biológica representa una herramienta útil para diagnosticar cualitativa y/o semicuantitativamente la presencia, naturaleza y efectos de las mezclas complejas de contaminates químicos presentes en el medio marino.

1.3. <u>MECANISMOS DE TOXICIDAD Y DAÑO CELULAR DE LOS</u> <u>CONTAMINANTES QUÍMICOS</u>

1.3.1. Generación de Especies Moleculares Tóxicas

En el medio acuático los distintos contaminantes químicos pueden: i) acumularse en el sedimento, ii) distribuirse en la columna de agua, o iii) ser acumulados por los organismos acuáticos,

donde éstos pueden a su vez ser inmovilizados y acumulados a largo plazo, ser metabolizados, o ser excretados al medio externo (Malins y Ostrander, 1991). Una vez en el interior de los organismos los contaminantes químicos pueden producir efectos tóxicos sobre estos, bien de forma directa, o indirectamente, tras su biotransformación.

La toxicidad de los contaminantes químicos se debe fundamentalmente a su capacidad para incrementar la generación de Especies Moleculares Tóxicas (EMTs), que son compuestos que contienen uno o varios electrones desapareados en su molécula, lo que les confiere una alta reactividad química. Esta alta reactividad química hace que las EMTs sean capaces de reaccionar fácilmente con biomoléculas esenciales como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, etc., lo que puede conducir a perturbaciones celulares significativas. Aunque las EMTs se generan de forma natural durante el metabolismo basal, la exposición y acumulación de contaminantes químicos puede incrementar su concentración y, por consiguiente, los efectos negativos derivados de su presencia. Los principales tipos de EMTs son: i) los propios contaminantes y los metabolitos intermedios generados en procesos de biotransformación, ii) los radicales libres, y iii) las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Halliwell 2006).

Las EROs pueden ser radicales libres, como los radicales peróxido (ROO), hidroxilo (OH) y superóxido (O_2), y especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o el oxígeno singlete (O_2). Las EROs se producen endógenamente durante la respiración celular, debido a la reducción tetravalente del oxígeno molecular a agua en las mitocondrias en un proceso de cuatro pasos, en los que se forman distintos radicales de oxígeno parcialmente reducidos y altamente inestables (reacciones 1-4).

- (1) Reducción univalente: $O_2 + e \rightarrow O_2^{\bullet}$
- (2) Reducción bivalente: $O_2 + e + 2H^+ + H_2O \rightarrow H_2O_2$
- (3) Reducción trivalente: $H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow OH^{\bullet}$
- (4) Reducción tetravalente: $OH^{\bullet} + e^{-} + H^{+} \rightarrow H_2O$

La generación de EROs puede verse incrementada exógenamente por compuestos orgánicos y metálicos. Los compuestos orgánicos pueden incrementar la generación de EROs durante los ciclos redox de quinonas, compuestos nitroaromáticos, nitroaminas y herbicidas, durante la auto-oxidación de determinadas oxigenasas (p.e. citocromo P-450), o por la inducción de enzimas de detoxificación (p.e. citocromo P-450, flavoproteínas reductasas, etc.). Los metales de transición como hierro (Fe^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cromo (Cr^{2+}) y vanadio (V^{2+}) también pueden promover la generación de EROs favoreciendo la oxidación de otros compuestos al actuar como catalizadores de la reacción de Fenton (reacción 5), integrada en el ciclo de Haber y Weiss (reacciones 6-7) (Halliwell y Gutteridge 1999; Manduzio *et al.* 2005). Además del incremento en la generación de EMTs, los contaminantes orgánicos y metálicos también pueden interferir en el metabolismo endógeno al competir con

diversas enzimas por los mismos substratos. Las EMTs también pueden inducir determinadas actividades enzimáticas, lo que puede llevar al agotamiendo de substratos o enzimas, impidiendo que estos puedan desempeñar su función original.

(5) $H_2O_2 + L-M^{n+} \rightarrow OH + OH + L-M^{n+1}$

(6) L-Mⁿ⁺¹ +
$$O_2^{\bullet} \rightarrow L-M^{n+} + O_2$$

(7)
$$H_2O_2 + O_2^{\bullet} \rightarrow OH + OH + O_2$$

1.3.2. Peroxidación de los Lípidos de Membrana

La estabilidad de las membranas celulares es esencial para las funciones vitales de la célula, ya que contienen receptores de hormonas, agentes reguladores del líquido extracelular, enzimas, canales, receptores, y antígenos implicados en la interacción con otras células. La estructura básica de las membranas celulares en forma de doble capa lipídica rica en ácidos grasos poliinsaturados hace que éstas sean especialmente vulnerables al ataque de radicales libres. De hecho, una de las principales consecuencias nocivas del incremento en la concentración de EMTs es la peroxidación de los lípidos de las membranas. Esto se debe fundamentalmente a la presencia de grupos metileno con hidrógenos particularmente reactivos entre los múltiples dobles enlaces de los lípidos poliinsaturados que forman parte de la estructura de la membrana (Tappel 1973; Winston y Di Giulio 1991).

La peroxidación de los lípidos de membrana comprende tres fases fundamentales: iniciación, propagación y terminación. El proceso se inicia cuando los radicales libres, generalmente el radical hidroxilo, extraen átomos de hidrógeno desde las uniones insaturadas de los ácidos grasos de las membranas celulares (L₁H), formándose un radical no estable (L₁) (reacción 1). En la etapa de propagación este radical no estable reacciona con oxígeno molecular, generándose un ácido graso peroxil radical (L1OO·), peróxidos cíclicos, y/o radicales alcoxílicos lipofílicos (reacción 2). En la reacción de terminación estos radicales, que tampoco son estables, reaccionan con otro ácido graso (L_2H) , dando lugar a un ácido graso radical diferente (L_2) y a un peróxido lipídico (LOOH), o un peróxido cíclico, si ha reaccionado consigo mismo (reacción 3). Este ciclo se repite, ya que el nuevo ácido graso radical formado se comporta de la misma manera que el ácido graso original (Halliwell y Gutteridge 1985). La peroxidación de los lípidos de membrana puede seguir propagándose en presencia de metales de transición (Meⁿ⁺) que actúan como catalizadores oxidativos sobre los hidroperóxicos lipídicos, que son descompuestos en otros productos radicales adicionales (reacciones 4 y 5). La generación en cadena de radicales lipídicos continúa hasta que el substrato se agote, sucedan suficientes reacciones de terminación, o los antioxidantes interrumpan este proceso (Bus y Gibson 1979).

- (1) $L_1H + OH \rightarrow L_1 + H_2O$
- $(2) \qquad L_1^+ + O_2 \rightarrow L_1 OO^-$
- $(3) \qquad L_2H + L_1OO^{-} \rightarrow L_2^{-} + LOOH$
- (4) $\text{LOOH} + \text{Me}^{n+} \rightarrow \text{LO} \cdot + \text{Me}^{(n-1)+}$
- (5) $\text{LOOH} + \text{Me}^{(n-1)+} \rightarrow \text{LOO} + \text{Me}^{n+}$

Las consecuencias biológicas de la peróxidación de los lípidos de las membranas son extremadamente complejas y no sólo se producen a nivel de lípidos poliinsaturados, sino que también pueden afectar a las biomoléculas asociadas con las membranas, lo que puede afectar a su fluidez y a los orgánulos celulares, llegando incluso a producirse la muerte celular (Halliwell y Gutteridge 1999). Las mitocondrias son unos de los orgánulos celulares que más sufren daño oxidativo en sus membranas debido a la localización en ellas de la cadena de transporte electrónico, donde se generan gran cantidad de EROs. La actividad enzimática que se produce en la membrana microsomal, concretamente en el sistema citocromo P450, también se ve afectada por la peroxidación lipídica (Bus y Gibson 1979).

La cuantificación de la peroxidación de los lípidos de membrana se ha usado como biomarcador para evaluar el daño oxidativo provocado por la exposición a contaminantes en mejillón. De hecho, se ha demostrado que los niveles de peroxidación lipídica en mejillón se incrementan significativamente tras exposiciones a compuestos orgánicos y metálicos (Viarengo *et al.* 1990; Arasu y Reddy 1995; Prakash y Rao 1995; Torres *et al.* 2002; Romeo *et al.* 2003; Cheung *et al.* 2004; Pampanin *et al.* 2005a; Vlahogianni *et al.* 2007; Vlahogianni y Valavanidis 2007). El aumento de la peroxidación de los lípidos de membrana en mejillón se ha relacionado también con el descenso en los niveles de enzimas antioxidantes y de compuestos antioxidantes como el glutatión (Viarengo *et al.* 1990; Cossu *et al.* 1997, 2000; Doyotte *et al.* 1997; de Almeida *et al.* 2004; Gravato *et al.* 2004; Vlahogianni y Valavanidis 2007).

1.3.3. Daños Genotóxicos y Citotóxicos

La genotoxicidad se define como el efecto tóxico que se produce en el material genético como consecuencia de un daño producido sobre el ADN (OSPAR Commission, 2002). Este daño al ADN puede ser producido i) endógenamente por el ataque de EROs y radicales libres generados como metabolitos en los procesos metabólicos, o ii) exógenamente debido a una exposición a radiación, toxinas naturales, o compuestos químicos xenobióticos (De Flora *et al.* 1991). En este segundo caso el daño al ADN puede producirse por acción directa de los xenobióticos sobre el ADN, o indirectamente por un incremento en la generación de metabolitos tóxicos y EROs, o la inhibición de la síntesis y reparación del ADN (Lee y Steinert 2003).

La capacidad de algunos de los contaminantes presentes en el medio marino para dañar el material genético (IARC 1987; L e IS 1988, De Flora et al. 1991) ha fomentado el desarrollo de biomarcadores que detecten la genotoxicidad de estos contaminantes sobre la biota (UNEP/WHO 1995; Kotelevtsev et al. 1994; OSPAR Commission 2002). Este es el caso de la identificación de alteraciones citogenéticas como los micronúcleos (MNs). Los MNs son fragmentos acéntricos de cromosomas o cromosomas completos que no consiguen migrar con uno de los dos núcleos hijos durante la anafase, y permanecen en el citosol tras la mitosis (Heddle 1973; Schmid 1975). Los MNs pueden generarse debido a eventos clastogénicos o aneugénicos (Heddle et al. 1991). Los compuestos clastógenos inducen la generación de MNs a través de la ruptura de la doble hélice de ADN, lo que conduce a la formación de fragmentos acéntricos de cromosomas, que son incapaces de adherirse a las fibras de huso cromático e integrarse en los núcleos hijos. Los compuestos aneunógenos son compuestos que evitan la formación del huso cromático, con lo que las cromátidas completas se quedan fuera del núcleo, formándose MNs o células multinucleadas (Serrano-García y Montero-Montoya 2001). Otro tipo de anormalidades nucleares son los núcleos incompletos, también denominados puentes nucleares (PN), y las células binucleadas. (BN) Los núcleos incompletos son estructuras similares a los MNs en su forma, estructura y tamaño, que están unidos al núcleo principal de la célula por un hilo de cromatina. El origen de los núcleos incompletos parece ser la eliminación de ADN amplificado, y de complejos de ADN reparados (Miele et al. 1989; Haaf et al. 1999), y su existencia y significación biológica parece ser similar a la de los MNs. La aparición de células binucleadas se produce como consecuencia de una división celular anormal debido al bloqueo de la citoquinesis (Rodilla 1993).

El ensayo de micronúcleos fue originalmente desarrollado como biomarcador de genotoxicidad para su aplicación en mamíferos (Heddle 1973), y posteriormente fue modificado para su uso en peces (Hooftman y de Raat 1982; Chaudhary *et al.* 2006; Udroiu *et al.* 2006). En mejillón los MNs se han cuantificado fundamentalmente en hemolinfa y branquias, y numerosos estudios han observado elevadas frecuencias de MNs en mejillones expuestos a contaminantes (Bolognesi *et al.* 1996, 2004; Kalpaxis *et al.* 2004; Venier y Zampieron 2005; Koukouzika y Dimitriadis 2005, 2008; Magni *et al.* 2006; Nigro *et al.* 2006; Ausili *et al.* 2008). Los puentes nucleares (PN) o nucleos incompletos y las células binucleadas (BN) han sido también aplicados satisfactoriamente como biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en mejillón (Venier *et al.* 1997; Dolcetti y Venier 2002; Dailianis *et al.* 2003; Izquierdo *et al.* 2003; Barsiene *et al.* 2006a, b, c, d).

1.4. <u>MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN CELULAR</u>

1.4.1. Sistema de Biotransformación de Fase I

El sistema de biotransformación de fase I es el encargado de la metabolización de cientos de compuestos orgánicos estructuralmente diversos, tanto de naturaleza endógena (p.e. hormonas

esteroideas, vitaminas o ácidos biliares) como exógena (p.e. HAPs, pesticidas o dioxinas). La metabolización de estos compuestos se produce a través de una serie de reacciones químicas conocidas como reacciones de funcionalización o reacciones de fase I (Tabla 1). En estas reacciones se introducen grupos funcionales reactivos (p.e. -OH, -NH₂, -SH, -COOH) en la molécula parental, generándose metabolitos más polares, que son substratos para las siguientes reacciones de conjugación o de fase II (Livingstone 1991).

TT 1 1 1	n '	1 0	г.	· ·	1	C	•	1.	• • •
I a hia i ·	RADOCIONAC	do toco		rageelonag	d D	t11n/	nnn	1170/	noni
raula r.	Reacciones	uc lase.	1 1	reacciones	uu	Tun	JUIIG	uizav	
									/

Oxidación (sistema microsómico)
Oxidación alifática
Hidroxilación aromática
N-desalquilación
O-desalquilación
S-desalquilación
Epoxidación
Desaminación oxidativa
Formación de sulfóxidos
Desulfuración
N-oxidación y N-hidroxilación
Oxidación (mecanismos no microsómicos)
Oxidaciones de alcohol y aldehídos
Oxidación de purinas
Desaminación oxidativa (monoaminooxidasa
y diaminooxidasa)
Reducción
Azorreducción y nitrorreducción
Hidrólisis
Hidrólisis de ésteres y amidas
Hidrólisis de enlaces peptídicos
Hidratación de epóxidos

Las reacciones de oxidación de fase I están catalizadas por una serie de enzimas oxidasas que constituyen el denominado "Sistema de Monooxigenasa" o "Sistema de Oxidasas de Función Mixta", más conocido por sus siglas en ingles - MFO- (*Mixed Function Oxidase system*). El sistema de oxidasas de función mixta está compuesto por una serie de enzimas de naturaleza muy diversa, que incluyen mono-oxigenasas, oxidasas, reductasas, o hidrolasas. No obstante, el miembro más destacado de este grupo de enzimas es el citocromo P450, que cataliza la mono-oxigenación de diferentes substratos orgánicos (RH) en un proceso dependiente del NADPH en el que, utilizando oxígeno molecular, se inserta un átomo de oxígeno en el substrato orgánico y se reduce el otro átomo de oxígeno a agua (reacción 1).

(1) $RH + O_2 + NADPH + H^+ \leftrightarrow ROH + H_2O + NADP^+$

El nombre genérico de citocromo P450 de este sistema se debe a que el pico máximo de absorción que presenta la forma reducida del citocromo cuando está ligada al monóxido de carbono aparece a una longitud de onda de 450 nm, y a que el pigmento citocromo es el componente final de la cadena transportadora de electrones que cataliza la oxidación de sustratos (Omura y Sato 1964).

Las enzimas del citocromo P450 pueden inactivar la toxicidad de substratos orgánicos a traves de la alteración de su estructura química. Sin embargo, estas reacciones también pueden provocar el efecto contrario, es decir, incrementar la toxicidad del compuesto parental. Esto se debe a que los metabolitos intermedios generados durante las reacciones de funcionalización pueden ser más reactivos que el propio substrato original (Nebert *et al.* 2000).

Las enzimas del citocromo P450 (identificadas como CYP) se clasifican en familias y subfamilias en función de las similaridades en su cadena de aminoácidos. Las enzimas del citocromo P450 de una misma familia se identifican por un número (p.e. CYP1), y su secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos un 40%. Las enzimas del citocromo P450 de una misma subfamilia se identifican con una letra adicional (p.e. CYP1A), y son similares en más de un 55% de su cadena de aminoácidos. Por último, cada enzima individual se identifica con un número final (p.e. CYP1A1) (Nelson *et al.* 1996). Los principales componentes del citocromo P450 (Strobel *et al.* 1995) aparecen representados esquemáticamente en la Figura 2, y son:

- <u>NADPH-citocromo P450 reductasa</u>: Flavoproteína de 78 KD formada por flavín adenin dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN), que se encuentra en el retículo endoplasmático y es responsable de la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el citocromo P450 vía cofactores FAD y FMN.
- <u>Citocromo P450</u>: Hemoproteína que tiene como grupo prostético una protoporfirina con un átomo de hierro central. Esta proteína actúa como centro catalítico del sistema, oxidándose y reduciéndose cíclicamente para aceptar los electrones cedidos por la enzima citocromo P450 reductasa. Existen numerosas isoenzimas de este citrocromo que difieren entre sí en su peso molecular (43-600 KD), características espectrales, propiedades inmunoquímicas, secuencia amino terminal, especificidad de substrato, etc.
- <u>NADPH-citocromo b5 reductasa</u>: Flavoproteína que interviene en la reducción de citocromo b5 por medio de la transferencia de electrones desde NADPH. Su peso molecular es 33 KD, y aparece fuertemente unida a la membrana del retículo endoplasmático y a la membrana mitocondrial externa.
- <u>Citocromo b5</u>: Hemoproteína de 16 KD compuesta por dos partes conectadas entre sí por una cadena polipeptídica flexible. Una parte de esta molécula es hidrófila, contiene un grupo hemo y presenta actividad redox, mientras que la otra parte es hidrófoba y está inmersa en la membrana. El citocromo b5 actúa como transportador de electrones desde la NADPH-citocromo b5 reductasa hacia el citocromo P450.



Figura 2: Complejo citocromo P450 localizado en la membrana del retículo endoplasmático.

Una de las características del citocromo P450 es su inducibilidad por la exposición a contaminantes orgánicos. El mecanismo de inducción del citocromo P450, representado esquemáticamente en la Figura 3, se produce por la activación de la síntesis de nuevas enzimas controlada por proteínas capaces de unirse a regiones del ADN (receptores nucleares) que regulan la expresión de los genes del citocromo P450 (Nebert et al. 2000). En la inducción de los genes de la familia CYP1A interviene el receptor de hidrocarburos aromáticos (Aryl hydrocarbon Receptor-AhR), presente en el citoplasma celular en forma de heterodímero con la proteína HSP-90. Una vez el compuesto orgánico penetra en la célula, el heterodímero se escinde (quedando libre la proteína HSP-90) y el compuesto inductor interactúa con el AhR formando un complejo inductor-receptor con ARNt (AhR/ARNt: translocador nuclear del receptor AhR). Este complejo inductor-receptor es translocado hacia el interior del núcleo, donde se une a una secuencia de reconocimiento de ADN, denominada elemento de respuesta a xenobióticos (ERX), que favorece el acceso de los factores de transcripción a la región promotora de los genes CYP1A, y aumenta la velocidad de transcripción de los mismos. Los mecanismos por los cuales los ERXs provocan la activación transcripcional no están completamente definidos. No obstante, todos aquellos genes que son activados como resultado de la interacción entre el complejo inductor-receptor AhR/ARNt y el ERX se incluyen dentro de lo que se conoce como «batería de genes Ah» (Safe 2001).



Figura 3: Esquema del mecanismo de inducción de producción de enzimas citocromo P4501A1

En invertebrados acuáticos las enzimas del sistema de biotransformación de fase I catalizan la transformación xenobióticos, aunque con una menor capacidad que en peces, pájaros o mamíferos (Livingstone 1991; Snyder 2000). En mejillón se ha observado actividad de una subfamilia del citocromo P450 (CYP1A) con características estructurales similares a las de mamíferos y pájaros en tejidos como branquias, pie, gónadas, glándula digestiva, o hemolinfa (Livingstone *et al.* 1990, 1997; Porte *et al.* 1995; Wootton *et al.* 1995, 1996; Peters *et al.* 1998; Zanette *et al.* 2009). No obstante, la mayor concentración de esta subfamilia en mejillón ha sido observada en la membrana del retículo endoplasmático de la glándula digestiva (Stegeman 1985; Livingstone *et al.* 1989). La determinación de componentes del sistema citocromo P450 en mejillón ha sido propuesta como biomarcador de exposición a contaminantes orgánicos. De hecho, varios estudios con mejillón han demostrado la inducibilidad de algunos de estos componentes (p.e. contenido total de citrocromo P450 y actividades NADPH-citocromo c reductasa, NADPH-citocromo b5 reductasa, y benzo(a)pireno hidroxilasa) en relación con la exposición a contaminantes orgánicos (Livingstone *y* Farrar 1985; Livingstone 1988; Narbonne *et al.* 1991; Porte *et al.* 1991, 2001; Michel *et al.* 1994; Solé *et al.* 1994, 1996, 1998; Peters *et al.* 1999).

1.4.2. Sistema de Biotransformación de Fase II

En las reacciones de biotransformación de fase II (Tabla 2) los mebatolitos intermedios resultantes del metabolismo de fase I son conjugados con diversos compuestos solubles en agua. La mayoría de reacciones de fase II requieren de un compuesto intermedio rico en energía en forma de cofactor activado (UDP- ácido glucuronico, UDP-glucosa, acetil-CoA), o un agente conjugante (p.e. glutatión). En algunos casos, si el grupo funcional adecuado está presente, no es necesario el metabolismo de fase I para que tengan lugar reacciones de conjugación de fase II. El resultado de

estas reacciones son compuestos conjugados solubles en agua e inactivos, que pueden ser fácilmente excretados.

Reacción	Enzima	Grupo funcional que reacciona
Glucuronidación (A. glucurónico) Glucosidación (glucosa)	UDP-glucuroniltransferasa UDP-glicosiltransferasa	-OH, -COOH, -NH ₂ , -SH, C-C -OH, -COOH, SH, C-C
Sulfatación (sulfato)	Sulfo-transferasa	-NH ₂ , -OH
Acetilación (acetatil)	Acetil-transferasa	-NH ₂ , -SO ₂ , -OH,
Metilación (metilo)	Metil-transferasa	-OH, -NH ₂ , SH,
Conjugación con aminoácidos	Acil-transferasa	-COOH
Conjugación con glutation	Glutation-S-transferasa	Epóxidos, haluros orgánicos

Tabla 2: Reacciones de fase II (reacciones de conjugación)

1.4.2.1. Glutatión S-transferasa

La familia de las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) es la más importante entre las enzimas de fase II. Las GSTs se encuentran universalmente distribuidas en la mayoría de *phyla* animales, incluyendo los invertebrados (Clark 1989). Se trata de proteínas diméricas formadas por dos subunidades idénticas (homodímeros) o diferentes (heterodímeros), cada una de las cuales posee actividad catalítica independiente. En función de la secuencia de aminoácidos, propiedades enzimáticas y reactividad inmunológica, se distinguen al menos 8 grandes clases de GSTs denominadas alpha, kappa, mu, pi, sigma, omega, theta and zeta (Sheehan *et al.* 2001).

Las GSTs catalizan la reacción de conjugación de compuestos xenobióticos o metabolitos electrófilos procedentes del metabolismo de fase I con glutatión. Esta conjugación hace que aumente el tamaño y carácter hidrofilico del compuesto xenobiótico o metabolito de fase I, lo que generalmente conduce a su inactivación. La reacción de conjugación con glutatión es la primera de una serie de reacciones posteriores que conducen a la formación de ácido mercaptúrico, compuesto mucho más soluble, que es finalmente excretado. Algunas GSTs tienen actividades catalíticas distintas de la conjugación, tales como la unión a substratos sin modificaciones catalíticas, actividad peroxidasa con peróxidos orgánicos, o implicación en reacciones de isomeriación dependientes del glutatión (Prohaska y Ganther 1977). Al igual que las enzimas del citocromo P450, las GSTs son enzimas inducibles. De hecho, el receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) que codifica las enzimas del CYP1A parece estar implicado también en el mecanismo de regulación de los genes que codifican las distintas isoenzimas de la familia GST (Mimura y Fujii-Kuriyama 2003).

Las GSTs han sido purificadas en mejillón, donde se ha observado una mayor actividad en branquias que en glándula digestiva, a pesar de que la actividad enzimática GST en mejillón está asociada con el sistema citocromo P450, más abundante en glándula digestiva (Fitzpatrick y Sheehan 1993; Fitzpatrick *et al.* 1995a, b). Diversos estudios han observado la inducción de las GSTs por exposición a compuestos orgánicos en mejillón (Fitzpatrick et al. 1997; Gowland et al. 2002;

Cheung *et al.* 2004; Moreira y Guilhermino 2005; Rocher *et al.* 2006; Richardson *et al.* 2008), lo que ha apoyado su uso como biomarcador de contaminación orgánica. Otros estudios han sugerido la implicación de las GSTs en los mecanismos de protección contra la toxicidad producida por metales en mejillón (Canesi *et al.* 1999; Khessiba *et al.* 2001; Borkovic *et al.* 2005).

1.4.2.2. DT-Diaforasa

Las quinonas son unos de los principales metabolitos generados durante las reacciones de biotransformación de hidrocarburos y fenoles. Las quinonas son compuestos cuya toxicidad puede superar a la de su compuesto parental, debido a su capacidad de auto-oxidación, de unión con compuestos nucleófilos, o de inhibición de funciones celulares vitales como la síntesis del ADN y el transporte mitocondrial de electrones (Bolton *et al.* 2000). La biotransformación de las quinonas puede producirse por dos vías del citocromo P450 que compiten entre sí. La primera vía es la reducción por parte de un electrón catalizada por las enzimas de fase I NADPH-citocromo P450 reductasa y citocromo b5 reductasa. En esta reacción las quinonas se transforman en radicales semiquinona que, en presencia de oxígeno, se auto-oxidan para formar anión superóxido, y regenerar de nuevo quinonas. La segunda vía de biotransformación de las quinonas es la reducción por parte de las enzima NAD(P)H quinona oxidoreductasa o DT-diaforasa, que las transforma en hidroquinonas, compuestos más estables y făcilmente excretables (Chesis *et al.* 1984; O'Brien 1991).

La enzima DT-diaforasa (DTD) es inducible por ligandos con capacidad para unirse al receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), ya que los elementos que regulan y expresan el gen de las DTDs parecen presentar bastantes homologías con el elemento de respuesta a xenobióticos (ERX) del CYP1A. Los compuestos capaces de inducir la enzima DTD pueden ser de dos tipos: i) inductores bifuncionales como grandes compuestos aromáticos planares (HAPs, flavonoides) que parecen inducir los genes promotores de las enzimas de fase I y fase II por unión a los receptores AhR y ERX, y ii) inductores monofuncionales como compuestos con estructura compatible con reacciones Michael capaces de inducir las enzimas de fase II sin inducir las de fase I, y cuyo mecanismo de regulación genética es menos claro (Prochaska y Talalay 1988; Ross *et al.* 2000).

Las quinonas son los metabolitos más generados durante la biotransformación del benzo[a]pireno en mejillón (Stegeman 1985; Michel *et al.* 1994, 1995). La mayor expresión de la enzima DTD en mejillón se ha observado en la fracción citosólica de la célula, aunque también se expresa en las mitocondrias y el retículo endoplasmático (Cadenas 1995). La actividad enzimática DTD se ha propuesto como biomarcador de exposición a compuestos orgánicos en mejillón, y diversos estudios han observado elevados niveles de esta enzima en glándula digestiva y branquias en relación con la acumulación de compuestos orgánicos (Porte *et al.* 1991; Solé *et al.* 1994; Osman *et al.* 2004).

1.4.3. Defensas Antioxidantes

Existen dos grandes tipos de defensas antioxidantes que detienen el ataque y la formación de EMTs dentro de la célula, protegiéndola contra el daño oxidativo: i) los antioxidantes no enzimáticos, que impiden la formación de radicales libres a partir de otras moléculas, convirtiéndolas en moléculas menos dañinas para el organismo, y ii) los antioxidantes enzimáticos, que son compuestos que donan sus electrones a los radicales libres, neutralizándolos y evitando reacciones en cadena (Winston y Di Giulio 1991).

1.4.3.1. Defensas Antioxidantes no Enzimáticas

Entre los antioxidantes no enzimáticos se incluyen: i) moléculas reductoras de pequeño tamaño molecular y carácter hidrosoluble, como el glutatión o el ascorbato (vitamina C), y ii) moléculas de carácter liposoluble como la vitamina A (ácido retinoico), vitaminaoE (-tocoferol), carotenos, y ubiquinonas (Halliwell 2006).

1.4.3.1.1. Glutatión

El antioxidante no enzimático más abundante en el citoplasma celular es el glutatión (Figura 4). El glutatión es un tripéptido que se sintetiza en el citosol a partir de los aminoácidos glicina, L-cisteína y ácido L-glutámico en un proceso enzimático de dos pasos que dependen del trifosfato de adenosina (ATP). En el primer paso la enzima gamma-glutamilcisteína sintetasa (GCS) cataliza la síntesis de gamma-glutamilcisteína a partir de L-glutamato y cisteína. En el segundo paso la enzima glutatión sintetasa (GS) cataliza la unión de glicina y gamma-glutamilcisteína para sintetizar glutatión (Meister 1988).



Figura 4: Molécula de glutatión

El glutatión participa en la translocación de aminoácidos a través de las membranas celulares, en la catálisis de reacciones de intercambio de disulfuro, actúa como reservorio del aminoácido cisteína, y es capaz de proteger a las membranas, proteínas, enzimas y otras moléculas del ataque de radicales (Meister 1985). El glutatión generalmente está presente en los tejidos en altas concentraciones en estado reducido (GSH). En este estado reducido el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción a moléculas inestables, transformándose en una molécula reactiva que reacciona rápidamente con otro glutatión reactivo, formando la forma oxidada

disulfuro de glutatión (GSSG) (reacción 1). De este modo el glutatión reducido es consumido por su unión directa a radicales, y por su conjugación con reactivos intermedios procedentes del metabolismo de fase I en reacciones catalizadas por enzimas como las glutatión peroxidasas y las glutatión S-transferasas (Meister 1981).

(1) $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$

1.4.3.1.2. Metalotioneinas

Las metalotioneinas (MTs) son unas metaloproteínas de bajo peso molecular con un alto contenido en cisteína y una alta estabilidad térmica. Las MTs fueron identificadas por primera vez en el cortex renal de equinos (Margoshes y Vallee, 1957), y posteriormente en otros muchos vertebrados e invertebrados marinos (Hamilton y Mehrle 1986; Langston *et al.* 1998). Según su estructura se distinguen tres tipos de MTs: i) MT de clase I, como las de los mamíferos, que contienen unos 61 aminoácidos, de entre ellos 20 cisteína, ii) MT de clase II, con muy poca o ninguna similaridad con las MT de clase I, y iii) MT de clase III, que incluyen polipéptidos atípicos que contienen unidades de alfa-glutamilcisteína (Binz y Kägi 1999).

Al igual que sucede con el glutatión, el comportamiento químico de las MTs está definido fundamentalmente por la química del grupo tiol del aminoácido cisteína, que determina su carácter nucleofilico y su capacidad de unirse a distintos compuestos, especialmente metales pesados. Esto confiere a las MTs un papel fundamental en la homeostasis de metales esenciales, para los que actúan como almacén con capacidad para liberarlos y satisfacer su demanda metabólica y enzimática (Viarengo y Nott 1993; Roesijadi 1992). Además, los metales pesados no esenciales con esteroquímica similar a la de los metales esenciales pueden desplazarlos de sus lugares de unión en las MTs y unirse con ellas. De hecho, las MTs normalmente no están saturadas por un solo metal sino que contienen varios átomos de Cu, Zn, Cd, Hg o Ag (Amiard y Cosson 1997). La capacidad de unión a metales no esenciales hace que las MTs puedan actuar como un mecanismo para su detoxificación. Se ha descrito además un papel antioxidante para las MTs, ya que pueden actuar de forma similar a la del glutatión, uniéndose a sustancias electrófilas a través de los grupos sulfhidrilo de los aminoácidos cisteína (Viarengo *et al.* 1999, 2000b).

Se ha recomendado el uso de las MTs en organismos marinos como biomarcador de exposición a metales (Isani *et al.*, 2000; Viarengo *et al.* 2001). En mejillón se han identificado dos isoformas de las MTs en forma de monómeros y dímeros de peso molecular aparente 10 y 20 KDa, denominadas por ello MT-10 y MT-20 (Mackay *et al.* 1993; Lemoine *et al.* 2000). Cada una de estas isoformas parece desempeñar una función distinta, de modo que las MT-10 parecen ser las responsables de la homeostasis de metales esenciales, mientras que las MT-20 parecen estar implicadas en la detoxificación de metales no esenciales, especialmente Cd (Mackay *et al.* 1990; Ivankovic *et al.*

2002; Lemoine y Marc 2003; Vergani *et al.* 2007). Numerosos estudios han demostrado la utilidad de las MT como biomarcador de contaminación metálica en mejillón (Bebianno y Langston 1991, 1992, 1993, Pavicic *et al.* 1993; Couillard *et al.* 1993, 1995; Viarengo *et al.* 2001; Geret y Cosson 2002; Mourgaud *et al.* 2002; Geffard *et al.* 2005; Ivankovic *et al.* 2005; Pampanin *et al.* 2005b), para las que también se ha propuesto y demostrado un papel antioxidante en mejillón (Viarengo *et al.* 1999, 2000a; Cavaletto *et al.* 2002; Pampanin *et al.* 2005a; Raftopoulou *et al.* 2006).

1.4.3.2. Defensas Antioxidantes Enzimáticas

Existen una serie de defensas antioxidantes de carácter enzimático que facilitan la eliminación de EROs, de reactivos intermedios procedentes del metabolismo de fase I y fase II, así como de otro tipo de radicales libres. En la Figura 4 se esquematiza la interrelación de la actividad de estas enzimas antioxidantes, ya que los compuestos generados en algunas de estas reacciones enzimáticas son utilizados como substratos para la actividad de otras enzimas antioxidantes. Así, el peróxido de hidrogeno generado por dismutación del anión superóxido por parte de la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede ser substrato tanto para la enzima catalasa (CAT) como para la enzima glutatión peroxidasa (GP). La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), envuelta en la producción del NADPH que suministra los equivalentes reductores que necesitan muchas enzimas antioxidantes, es esencial en estos procesos. También la enzima glutatión reductasa (GR), que regenera el glutatión oxidado desde su forma reducida, es crucial para la actividad de enzimas dependientes del glutatión, como las GPs y GSTs (Halliwell y Gutteridge 1999).



Figura 4. Principales defensas antioxidantes enzimáticas y consecuencias toxicológicas del ataque de los radicales libres. Adaptada de Kappus (1986)

1.4.3.2.1. Superóxido Dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD), descubierta por McCord y Fridovich en 1969 (McCord y Fridovich 1969), cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno (reacción 1). La enzima SOD juega un papel antioxidante fundamental, puesto que el radical superóxido es la ERO más abundante. El radical superóxido se genera en múltiples procesos metabólicos como la oxidación de moléculas endógenas y metales, actividad de oxidasas y deshidrogenasas, cadena de transporte electrónico, ciclos redox, y metabolismo de xenobióticos como bifenilos y metales de transición (McCord y Fridovich 1969; Winston y Di Giulio 1991).

(1) $O_2^{-} + O_2^{-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Existen 4 clases de SOD en función de los metales presentes como cofactores en su centro activo, y que actúan como catalizadores de la reacción de dismutación del anión superóxido: i) Zn/Cu-SOD que contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu, y otro de Zn, ii) SOD-Mn, iii) SOD-Fe, y iv) SOD-Ni. Los tipos ii, iii y iv de SOD presentan cofactores mononucleares de Mn, Fe y Ni, respectivamente. En animales aparecen sólo Cu/Zn-SOD y Mn-SOD (Fridovich 1986). La enzima Cu/Zn-SOD (35 kDa) está localizada fundamentalmente en el citoplasma, pero también aparece en la cara externa de las células endoteliales y plasma sanguíneo, peroxisomas y lisosomas (Beyer et al. 1991). Esta isoenzima posee dos subunidades idénticas de unos 15 kDa cada una de ellas, y contiene un cluster metálico de Cu y Zn en su centro activo. La capacidad de dismutar el anión superóxido la da el Cu, mientras que el Zn parece tener sólo un papel estructural (Manduzio et al. 2003). Esta isoforma es proclive a ser oxidada por EROs, y puede ser inducida por exposición a contaminantes químicos (Salo et al. 1990). La isoforma Mn-SOD es un homotetrámero de 96 kDa presente en la matriz mitocondrial con un átomo de Mn en cada una de sus cuatro subunidades. Este átomo metálico cambia su estado de oxidación desde Mn(III) a Mn(II), volviendo de nuevo a Mn(III) durante la dismutación del anión superóxido. La Mn-SOD mitocondrial es esencial para la vida y su deficiencia está relacionada con la aparición de serias patologías (Weisiger y Fridovich 1973).

La forma de la enzima SOD que más se expresa en mejillón es la Cu/Zn-SOD (Wenning y Di Giulio 1988; Livingstone *et al.* 1992; Manduzio *et al.* 2003, 2004), de la que se han identificado tres isoformas con distintos puntos isoeléctricos (SOD1, SOD2 y SOD3). La isoforma SOD3 es la que menos se expresa (aproximadamente un 20% de la actividad SOD total) pero la que parece responder específicamente a la exposición a contaminantes (Manduzio *et al.* 2003, 2004). La enzima SOD ha sido aplicada como biomarcador en mejillón, organismo en el que numerosos estudios han detectado un incremento de la SOD en respuesta a una exposición ambiental a contaminantes orgánicos y metálicos (Porte *et al.* 1991; Regoli y Principato 1995; Nasci *et al.* 2002; Cheung *et al.*

2004; Box *et al.* 2007; Rocher *et al.* 2006; Lima *et al.* 2007; Richardson *et al.* 2008). La acumulación de diversos contaminantes o la eliminación del metal de transición presente en su centro activo puede provocar la inhibición de distintas isoenzimas SOD en mejillón (Manduzio *et al.* 2003; Weisiger y Fridovich 1973).

1.4.3.2.2. Catalasa

La enzima catalasa (CAT) es una hemoproteína formada por cuatro monómeros idénticos de 60 KDa. La CAT está compuesta por más de 500 aminoácidos y contiene un grupo prostético ferroprotoporfirina en su centro activo, que es el responsable de su actividad enzimática. En organismos aerobios la CAT es la principal vía de catálisis enzimática del peróxido de hidrógeno (reacción 1) formado tanto por dismutación espontánea o enzimática del radical superóxido por parte de la enzima SOD, como por reducción dielectrónica directa del oxígeno molecular catalizada por oxidasas de ácidos grasos, aminoácidos, etc. La CAT también cataliza la oxidación de toxinas como fenoles y alcoholes en conexión con la reducción del peróxido de hidrógeno (reacción 2) (Stegeman *et al.* 1992). Se trata, por tanto, de una enzima antioxidante fundamental, ya que el peróxido de hidrógeno es una ERO muy peligrosa debido a su toxicidad directa e indirecta como precursor del radical hidroxilo, la especie más reactiva del oxígeno, a través de la reacción de Fenton (reacción 3) (Kruk 1998).

(1) $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

(2)
$$\operatorname{ROOH} + \operatorname{AH}_2 \rightarrow \operatorname{H}_2\operatorname{O} + \operatorname{ROH} + \operatorname{A}_2$$

(3) $O_2^{\cdot \cdot} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH - + OH \cdot$

La mayor parte de la actividad CAT tiene lugar en los peroxisomas, orgánulos celulares donde se produce la síntesis de colesterol y ácidos biliares y la oxidación de los ácidos grasos, que dan lugar a la generación de peróxido de hidrógeno como subproducto (Stegeman *et al.* 1992). Aunque no se conoce el mecanismo completo de la CAT, la reacción que transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular se produce en dos etapas en las que está implicado el núcleo de Fe del grupo hemo unido a la enzima (Fe-E) (reacciones 4 y 5). La eficiencia enzimática de la CAT es muy alta, pudiendo convertir una sóla molécula de CAT seis millones de moléculas de peróxido de hidrógeno por minuto.

(4)
$$H_2O_2 + Fe(III)-E \rightarrow H_2O + O=Fe(IV)-E$$

(5)
$$H_2O_2 + O = Fe(IV) - E \rightarrow H_2O + Fe(III) - E + O_2$$

La enzima CAT ha sido aplicada como biomarcador de contaminación en mejillón, habiéndose demostrado el incremento de sus niveles tras exposición a compuestos orgánicos y metales (Akcha *et al.* 2000; de Almeida *et al.* 2004; De Luca-Abbott *et al.* 2005; Vlahogianni *et al.*

2007; Ricardson *et al.* 2008). Por el contrario, un bajo nivel o el descenso de esta actividad enzimática en mejillón ha sido señalado como indicativo de una saturación de las defensas enzimáticas y de estrés oxidativo (Pampanin *et al.* 2005a; Regoli y Principato 1995; Vlahogianni y Valavanidis 2007).

1.4.3.2.3. Glutatión Peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (GP) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua (reacción 1), y la reducción de hidroperóxidos lipídicos (ROOH) a su correspondiente alcohol (reacción 2), utilizando NADPH como donante de electrones (reacción 3).

- (1) $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$
- (2) $ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + GSSG + H_2O$
- (3) $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$.

Las enzimas GPs están localizadas en el citosol y la matriz mitocondrial de la célula, y se trata de peroxidasas excepcionales debido a su contenido en selenio (Se), su especificidad de substrato, y su alta reactividad con hidroperóxidos. Desde su identificación en 1957 (Mills 1957) se han tipificado 8 isoformas de esta familia de enzimas (GP1 a GP8), que son codificadas por diferentes genes y que varían en su localización celular y especificidad de substrato. De estas isoenzimas, las dos isoformas que se encuentran en prácticamente todos los tejidos animales, y son denominadas glutatión peroxidasas dependientes del Se (Se-GP), son la GP1 y la GP4. Estas isoformas de la enzima GP (Se-GPs) son metaloenzimas tetraméricas de unos 84 KDa constituidas por cuatro subunidades idénticas, que contienen un átomo de Se en forma de residuo selenocisteína en su centro activo, con lo que una deficiencia en Se supondría su inhibición. La GP1 se localiza en el citoplasma celular, y su substrato preferencial es el peróxido de hidrógeno. La GP1 es más abundante que la GP4, denominada también fosfolípido hidroperóxido peroxidasa, que es un monómero de 22 KDa localizado en el citosol y membrana celular. El substrato preferencial de la GP4 son los hidroperóxidos lipídicos, y puede reducir directamente hidroperóxidos de los fosfolípidos, peróxidos de ácidos grasos, e hidroperóxidos de colesterol (Ursini et al. 1985). Aunque muy distinta en su estructura a la GP1, el mecanismo de oxidación/reducción del residuo de selenocisteína de la GP4 es similar al de ésta (Schuckelt et al. 1991). Los mecanismos de catálisis propuestos para la reducción de peróxidos por parte de las Se-GPs se producen en el centro selenocisteína, que se encuentra en forma Se⁻ en estado de reposo (Flohe et al. 1973; Flohe 1979).

Existen otro tipo de GPs, las glutation peroxidasas independientes del Se (nonSe-GPs), que corresponden en realidad a enzimas GSTs con actividad peroxidasa. Se trata de dímeros de unos 50 KDa, localizados principalmente en los microsomas de la célula, que catalizan únicamente la reducción de peróxidos orgánicos (Prohaska y Ganther 1977; Lawrence *et al.* 1978).

Diversos estudios han investigado la utilización de las enzimas GPs como biomarcadores de contaminación en mejillón, mostrando un incremento de esta atividad enzimática en relación con la exposición y acumulación de contaminantes orgánicos y metálicos (Solé *et al.* 1994; Cheung *et al.* 2001, 2002, 2004; de Almeida *et al.* 2004; Tsangaris *et al.* 2007; Gwozdzinski *et al.* 2010; Sureda *et al.* 2011).

1.4.3.2.4. Glutatión Reductasa

La enzima glutatión reductasa (GR) es una flavoenzima dimérica que cataliza la reducción del disulfuro de glutation en dos moléculas de glutatión reducido mediante una reacción acoplada con la oxidación de NADPH a través del FAD (reacción 1).

⁽¹⁾ GSSG + NADPH + $H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$

La enzima GR es la responsable de mantener un ambiente celular reductor, pues controla el nivel celular de tioles reducidos como el glutatión y la tioredoxina (tiol celular primario). La GR participa además en la síntesis de los precursores del ADN, así como en el transporte de protones a través de las membranas (Meister 1988). Aunque no siempre se ha reconocido a la GR como una enzima antioxidante porque no participa directamente en la eliminación de radicales libres, es una enzima esencial para mantener la homeostasis celular y los mecanismos de defensa antioxidante, ya que es necesaria para la actividad de las enzimas antioxidantes que utilizan glutatión como substrato (GPs y GSTs) (Winston y Di Giulio 1991; Manduzio *et al.* 2005). Si el consumo de GSH es alto y éste no es regenerado por la enzima GR o es sintetizado de nuevo en suficiente cantidad por las enzimas GCS y GS, se puede generar una situación de estrés oxidativo debido a un exceso de radicales libres dentro de la célula (Halliwell y Gutteridge 1999).

La enzima GR ha sido utilizada como biomarcador de contaminación marina en mejillón en numerosos estudios, que han observado el incremento de esta actividad enzimática en respuesta a la exposición a contaminantes orgánicos y metálicos (Box *et al.* 2007; Cheung *et al.* 2004; Dafre *et al.* 2004; Giguere *et al.* 2003; Torres *et al.* 2002; Verlecar *et al.* 2008). Por otro lado, los descensos en los niveles de GR en mejillón se han considerado una señal de toxicidad celular (Bochetti *et al.* 2008; Cossu *et al.* 1997, 2000; Doyotte *et al.* 1997).

1.5. <u>MEDIDAS FISIOLÓGICAS</u>

Existen medidas fisiológicas que se han propuesto como un medio para integrar los efectos biológicos de las mezclas complejas de contaminantes y facilitar una detección temprana de los posteriores efectos que pueden producirse sobre los ecosistemas marinos.

El estado de salud de los bivalvos se puede evaluar midiendo el ratio de crecimiento que, en su forma más simple, consiste en determinar el cambio en el peso de la carne o la longitud de la concha. Sin embargo, la medida directa del crecimiento y la producción en moluscos bivalvos es difícil. Esto se debe a que una larga proporción de la producción total puede perderse en forma de gametos, los cambios de peso en animales con concha y con cantidades variables de agua en su interior son difíciles de medir, y no existe una relación aparente entre el crecimiento de la concha y el crecimiento del tejido.

Para poder estimar un ratio instantáneo de crecimiento, y obtener una mayor información acerca de éste proceso y de los factores que lo influyen se han desarrollado varios índices de crecimiento y salud. Entre los índices más comúnmente utilizados para evaluar la salud y el crecimiento en mejillón se encuentran el Índice de Condición y el Esfuerzo para el Crecimiento.

1.5.1 <u>Índice de Condición</u>

El índice de condición (IC) se calcula normalmente a partir del ratio entre el peso del individuo y alguna característica de la concha (por ejemplo su peso o su longitud). Este índice se ha usado habitualmente en la monitorización ambiental debido a su simplicidad de determinación, y su capacidad para informar sobre la composición corporal y las reservas energéticas del organismo (Lucas y Beninger 1985, Crosby y Gale 1990). Existen distintos métodos para estimar el IC que usan el peso fresco de la carne, el peso de la concha, y el tamaño de la concha. En cualquier caso, el IC es menor cuando las condiciones de salud del animal son pobres ya que el peso de su cuerpo se reduce en relación con el peso total del animal, y con el volumen de la cavidad interior de la concha.

El IC es comúnmente empleado como un biomarcador fisiológico en mejillón que indica crecimiento y actividad metabólica. Además, el IC también se ha relacionado con el efecto de la exposición a elevados niveles de contaminación (Andra *et al.* 2004; Pampanin *et al.* 2005c; Wepener *et al.* 2008).

1.5.2 Esfuerzo para el Crecimiento

El esfuerzo para el crecimiento (*Scope For Growth-* SFG) es un índice que estima el crecimiento y la producción secundaria de especies filtradoras, particularmente los bivalvos (Widdows y Johnson, 1988). El esfuerzo para el crecimiento en mejillón mide el balance energético, es decir, la diferencia entre la entrada de energía y la que se pierde durante el metabolismo. El SFG se calcula restando a la energía consumida como alimento, la energía liberada en forma de heces, y la energía liberada a través de la respiración.

La medida del SFG está basada en el análisis fisiológico del presupuesto energético en lugar de medidas directas del crecimiento propiamente dicho, e integra determinaciones fisiológicas como el ratio de alimentación, digestión, respiración, y excreción. EL SFG informa sobre el proceso de crecimiento, y cómo este puede ser perturbado por el estrés ambiental y la contaminación (Bayne y Newell 1983). El SFG puede oscilar desde valores máximos positivos, en condiciones óptimas, hasta valores negativos, cuando el animal está severamente estresado y está utilizando sus reservas corporales para su mantenimiento.

El SFG integra la respuesta a nivel de organismo a los estímulos ambientales que éste recibe, incluyendo el estrés natural y el antropogénico (Widdows 1985). De hecho, el SFG ha sido aplicado en mejillón para la la evaluación de los efectos biológicos de la contaminación en estudios de calidad del medio marino (Widdows *et al.* 1982, 1995, 1997, 2002; Cotou *et al.* 2002, Halldörsoon *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005). La falta de energía para el crecimiento y la reproducción, representada como un descenso en el SFG de un número significativo de organismos, puede afectar al estado de salud de una población, lo que puede a su vez afectar a la supervivencia de la población en un área y a sus posibilidades de sobrevivir en el ecosistema. Así, el SFG podría ser utilizado para predecir posteriores alteraciones a nivel de comunidad y ecosistema. Esto ha hecho que el SFG se haya propuesto como herramienta para ser usada junto con otras técnicas de efectos biológicos en programas de monitorización de la contaminación (ICES TIMES 2006; ICES 2007b, 2009b; OSPAR Commision 2007).

1.6. ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El Instituto Español de Oceanografía (IEO) inició hace dos décadas a través de los Centros Oceanográficos de Murcia y Vigo (COMU y COVI) un programa de vigilancia de la contaminación marina a lo largo del litoral español utilizando mejillón silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) como organismo indicador. Esta red de monitorización de la calidad ambiental se diseñó siguiendo las directrices del Proyecto Internacional de Vigilancia con Mejillón *-Internacional Mussel Watch Project-*, y dentro de la misma se han determinado las concentraciones de algunos de los contaminantes considerados prioritarios en el medio marino, como metales pesados (Besada *et al.* 2002, 2011: Benedicto *et al.* 1999, 2003, 2004; Franco *et al.* 2002; Rodríguez *et al.* 1995), bifenilos policlorados y pesticidas organoclorados (Campillo *et al.*, 2003, 2004; Franco *et al.* 2007a; Soriano *et al.* 2006; Soriano 2009; León *et al.* en prensa). El objetivo principal de esta red de monitorización es determinar la distribución espacial y tendencias temporales de estos contaminantes, determinar valores de referencia en zonas prístinas, e identificar áreas problemáticas.

En los años 1992 y 1993 se comenzó a investigar sobre los efectos biológicos de la contaminación a través de la determinación de biomarcadores en mejillón procedente de la red de monitorización del litoral mediterráneo (Campillo 1997). A partir del año 2000, el Grupo de Contaminación y Efectos Biológicos del COMU integró el estudio los efectos biológicos dentro de

su red de vigilancia de la contaminación marina (Fernández et al. 2003; Martínez-Gómez et al. 2007b, 2008), de acuerdo con las propuestas del Programa para la Evaluación y Control de la Contaminación en la Región Mediterránea (MEDPOL) incluido dentro del Programa de Biomonitorización del Programa Ambiental de las Naciones Unidas y del Convenio de Barcelona para la Protección del Mar Mediterráneo (UNEP 1997). Este Programa recomienda la aplicación de diversos biomarcadores en mejillón (p.e. metalotioneinas y micronúcleos), y señala otros biomarcadores como "prometedores" (p.e. estrés oxidativo medido a través de actividades enzimáticas antioxidantes, peroxidación de las membranas lipídicas o determinación de componentes del sistema citocromo P450) (ICES 2002, 2004, 2007a,b, 2009a, b; UNEP/RAMOGE 1999; UNEP 2005). Estos biomarcadores prometedores necesitan una mayor investigación y validación a través de estudios de campo para ser recomendados. Además de los Convenios Regionales previamente firmados por España, recientemente ha entrado en vigor la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina Europea (Directiva 2008/56/CE). Esta Directiva obliga a los Estados miembros de la Unión Europea a describir el estado actual del medio marino y el Buen Estado Medioambiental (BEM), usando para ello 11 Descriptores, incluidos en el Anexo I de la citada Directiva. El Descriptor 8 informa sobre las concentraciones de contaminantes presentes en el medio marino, y si éstas se encuentran en niveles que no dan lugar a efectos de contaminación. La Decisión de la Comisión 2010/477/UE (Decisión 2010/477/UE) marca dos Criterios para evaluar la concentración de contaminantes en el medio marino y sus efectos, teniendo en cuenta los impactos y las amenazas que pesan sobre el ecosistema. El primer Criterio (8.1) tiene como indicadores las concentraciones de contaminantes medidos en la matriz pertinente (biota, sedimentos o agua), y que han de comparase con normas específicas de calidad ambiental. El segundo Criterio (8.2) ha de informar sobre el nivel de los efectos biológicos de la contaminación en los componentes del ecosistema afectado. En este contexto, los biomarcadores adquieren un papel relevante como herramientas para describir el Buen Estado Medioambiental.

En los trabajos que integran esta Tesis se han estudiado una serie de biomarcadores en mejillón (Tabla 3) entre los que se incluyen biomarcadores recomendados por el Programa MEDPOL, como las metalotioneínas (MTs) y la frecuencia de micronúcleos (MN), y otros biomarcadores cuya aplicabilidad en la evaluación de la calidad del medio marino es discutida, como las actividades enzimáticas del sistema de biotrasformación de fase I benzo[a]pireno hidroxilasa (BPH), y DT-diaforasa (DTD), la enzima del sistema de biotransformación de fase II glutation S-transferasa (GST), el estrés oxidativo evaluado a través de la determinación de las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP), y glutatión reductasa (GR), y el daño oxidativo evaluado a través de la peroxidación de los lípidos de membrana (LPO).

Los Objetivos Generales planteados en esta Tesis, y a los que se trata de dar respuesta en los distintos Capítulos que integran esta Memoria son:

- Investigar la respuesta de estos biomarcadores en mejillón silvestre del litoral mediterráneo y noratlántico español en relación con el tejido (branquias y glándula digestiva), las variables ambientales y, en especial, la bioacumulación de los principales tipos de contaminantes presentes en el medio marino.
- Determinar la capacidad de estos biomarcadores para reflejar de forma integrada el impacto de la contaminación, y determinar la utilidad de su uso en programas de bio-monitorización de la contaminación marina como complemento a los análisis químicos.

Así, en los **Capítulos II** y **III** de esta Tesis se ha determinado una batería de biomarcadores (BPH, DTD, GST, SOD, CAT, GP, GR y LPO) en branquias y glándula digestiva de mejillones de la costa mediterránea española. La selección de estos tejidos se hizo atendiendo a su papel en la asimilación y acumulación de contaminantes en mejillón; las branquias son el órgano encargado de la respiración y filtración, y constituyen la principal vía de entrada de los contaminantes que se encuentran en forma disuelta en el medio marino; la glándula digestiva es el órgano donde fundamentalmente se metabolizan y acumulan los contaminantes ingeridos por el mejillón en forma particulada a través del alimento. En estos estudios se ha investigado la respuesta de estos biomarcadores en cada tejido, su relación con la acumulación de contaminantes, su capacidad para reflejar la contaminación ambiental, y la influencia sobre ellos de parámetros ambientales como temperatura y salinidad. En el Capítulo IV se realiza un análisis comparativo de la información obtenida de la aplicación de esta batería de biomarcadores en branquias, glándula digestiva, y en ambos tejidos simultáneamente. Para determinar la capacidad de estos biomarcadores para integrar y diagnosticar los efectos de la contaminación se han empleado técnicas estadísticas de análisis multivariante. En el Capítulo V de esta Tesis se han estudiado los micronúcleos y otras anormalidades nucleares en branquias de mejillón del litoral mediterráneo español como biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad. Por último, en el Capítulo VI de esta Memoria se estudian varios biomarcadores (DTD, CAT, GP, GR y LPO), y parámetros fisiológicos en mejillones de la costa gallega 17 y 24 meses después del vertido del buque petrolero "Prestige". El objetivo de este Capítulo es la evaluación de los efectos a largo plazo derivados de esta exposición accidental a hidrocarburos.

Biomarcador/Medida	Indicador	Tejido	
Peroxidación de las membranas lipídicas (LPO)	Daño oxidativo	Glándula/Branquias	
Frecuencia de micronúcleos (MN)	Daño genotóxico	Branquias	
Frecuencia de células con puentes nucleares (PN)	Daño genotóxico	Branquias	
Frecuencian de células binucleadas	Daño citotóxico	Branquias	
Metalotioneínas (MT)	Exposición a metales y estrés oxidativo	Glándula/Branquias	
Benzo[a]pireno hidroxilasa (BPH)	Exposición a compuestos orgánicos	Glándula	
Glutation S-transferasa (GST)	Exposición a compuestos orgánicos	Glándula/Branquias	
DT-diaforasa (DTD)	Exposición a compuestos orgánicos	Glándula/Branquias	
Superoxido dismutasa (SOD)	Exposición general a contaminantes	Glándula/Branquias	
Catalasa (CAT)	Exposición general a contaminantes	Glándula/Branquias	
Glutatión peroxidasa (GP)	Exposición general a contaminantes	Glándula/Branquias	
Glutatión reductasa (GR)	Exposición general a contaminantes	Glándula/Branquias	
Índice de Condición (IC)	Medida físiológica del estado de salud y crecimiento	Organismo	
Esfuerzo para el Crecimiento (SFG)	Medida fisiológica del estado de salud y crecimiento	Organismo	

Tabla 3: Biomarcadores y medidas fisiológicas estudiadas en los trabajos que integran esta Memoria

1.7. <u>REREFENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>

- Adams SM. 2001. Biomarker/bioindicator responses profiles of organisms can help differentiate between sources of anthropogenic stressors in aquatic ecosystems. Biomarkers 6(1):33-44.
- Andra B, Stanisiere JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F, Boissery P. 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. Mar Pollut Bull 49:704–712.
- Akcha F, Izuel C, Venier P, Budzinski H, Burgeot T, Narbonne JF. 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus* galloprovincialis. Aquat Toxicol 49:269-287.
- Amiard JC, Cosson RP. 1997. Les métallothionéines. En: Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F. (eds): Biomarqueurs en 'ecotoxicologie. Aspects Fondamentaux. Masson. Paris. 53–66.
- Amiard JC, Caquet T, Lagadic L. 2000. Biomarkers as tools for environmental quality assessment. En Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds.): Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. Rotterdam. 17-26.
- Arasu SM, Reddy PS. 1995. Changes in lipid peroxidation in the gill and muscle of the marine bivalve (*Perna viridis*) during exposure to cadmium and copper. Chem Ecol 11:105-112.
- ATSDR 1999. Toxicological Profile for Cadmium. Final Report. Atlanta GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 434 pp.
- Ausili A, Gabellini M, Cammarata G, Fattorini D, Benedetti M, Pisanelli B, Gorbi S, Regoli F. 2008. Ecotoxicological and human health risk in a petrochemical district of southern Italy. Mar Environ Res 66:215-217.
- Barsiene J, Lethonen KK, Vuorinen P, Lang T, Pempkowiak J, Syvokiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Vountisjaervi H, Kopecka J. 2006a. Biomarker responses in the mussel (*Mytilus edulis*) and the flounder (*Platichthys flesus*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic Sea). Mar Pollut Bull 53:422-436.
- Barsiene J, Shiedek D, Rybakovas A, Syvokiene J, Kopecka J, Forlin L. 2006b. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. Mar Pollut Bull 53: 469-47.
- Barsiene J, Andreikenaite L, Rybakovas A. 2006c. Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil. Ekologiya 1:25-31.
- Barsiene J, Syvokiene J, Bjornstad A. 2006d. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. Aquat Toxicol 78:S105-S108.

- Bayne BL, Newell RC. 1983. Physiological energetics of marine molluses. En: Wilbur KM, Salenddin ASM (editores): The Mollusca. Volume 4. Physiology. Part 1. Academic Press. Londres. pp 407-515.
- Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DA, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD, Widdings J. 1985. The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. Praeger. Nueva York. USA.
- Bebianno MJ Langston WJ. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Mar Biol 108:91-96.
- Bebianno MJ, Langston WJ. 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus* galloprovincialis. Comp Biochem Physiol C 103:79-85.
- Bebianno MJ, Langston WJ. 1993. Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. Biometals 6: 239-244.
- Benedicto J, Rodríguez C, Guerrero J, Jornet A, Gomis C. 1999. Levels of trace metals in marine reserves and areas of ecological interest of the Spanish Mediterranean coast using mussels (*Mytilus* galloprovincialis) as bioindicators. 1st International Workshop on Marine Reserves. 24-26 Marzo 1999. Murcia. España. Abstract book 283-291. ISBN: 84-491-0492-0.
- Benedicto J, Rodríguez C, Martínez-Gómez C, Guerrero J, Jornet A. 2003. Distribución espacial y tendencias temporales de los niveles de metales traza en el litoral de Andalucía utilizando mejillón *Mytilus* galloprovincialis Lamark, 1819, como organismo indicador: 1991-2003. Bol Inst Esp de Oceanogr 19: 1-4.
- Benedicto J, Rodríguez C, Martínez-Gómez C, Guerrero J, Jornet A. 2004. Temporal trends of trace metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Iberian coast (north-western Mediterranean), 1991-2002. Rapp Comm Int Mer Médit 37. ISSN 0373-434-X.
- Benedicto J, Andral B, Martínez-Gómez C, Guitart C, Deudero S, Cento A, Scarpato A, Caixach J, BenBrahim S, Chouba L, Boulahdidi M, Galgani F. 2011. A large scale survey of trace metal levels in coastal waters of the Western Mediterranean basin using caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). J Environ Biol 13:1495-1505.
- Besada V, Fumega J, Vaamonde A. 2002. Temporal trends of Cd, Cu, Hg, Pb and Zn in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast 1991-1999. Sci Total Environ 288 :239-53.
- Besada V, Andrade JM, Schultze F, Gonzalez JJ. 2011. Monitoring of heavy metals in wild mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish North-Atlantic coast. Cont Shelf Res 31:457-465.
- Béthoux JP, Courau P, Nicolas E, Ruiz-Pino D. 1990. Trace metal pollution in the Mediterranean Sea. Oceanol Acta 13:481-488.
- Beyer W, Imlay J, Fridovich I. 1991. Superoxide dismutases. Prog Nucl Acid Res Mol Biol 40: 221-253.
- Binz PA, Kägi JHR. 1999. Metallothione: molecular evolution classification. En: Klaassen C. (ed): Metallothionein IV. Birkhäuser. Verlag. Basel. 7–13.
- Bocchetti R, Lamberti CV, Pisanelli B, Razzetti EM, Maggi C, Catalano B, Sesta G, Martuccio G, Gabellini M, Regoli F. 2008. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea. Mar Environ Res 66:24–26.
- Bolognesi C, Rabboni R, Roggieri P. 1996. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. Comp Biochem Physiol C 113: 319-323.
- Bolognesi C, Frenzilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggieri P. 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus* galloprovincialis: wild versus caged mussels. Mutat Res 552:153-162.
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. 2000. Role of quinones in toxicology. Chem Res Toxicol 13:135-160.
- Borkovic SS, Saponjic JS, Pavlovic SZ, Blagojevic DP, Milosevic SM, Kovacevic TB, Radojicic RM, Spasic MB, Zikic RV, Saicic ZS. 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus* galloprovincialis from the Adriatic Sea. Comp Biochem Physiol C 141: 366-374.
- Box A, Sureda A, Galgani F, Pons A, Deudero S. 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp Biochem Physiol C 146: 531-539.
- Bryan GW 1976. Heavy metal contamination in the sea. En: Johnson R. (ed): *Marine Pollution*. Academic Press. Londres. 729 pp.
- Bus JS, Gibson JE. 1979. Lipid peroxidatin and its role in toxicology. Rev Biochem Toxicol 7: 125-149.
- Cadenas E. 1995. Antioxidant and prooxidant functions of DT-Diaphorase in quinone metabolism. Biochem Pharmacol 49:127-140.
- Campillo JA. 1997. Sistemas enzimáticos de las fases I y II de detoxificación de xenobióticos como biomarcadores de la contaminación marina. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia
- Campillo JA, Benedicto J, Fernández B, Martínez-Gómez C. 2003. Distribution of organochlorine compounds in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Iberian Mediterranean coast. 5th Iberian Congress and 2nd Iberoamerican on Environmental contamination and Toxicology (CICTA). 22-24 Septiembre 2003. Oporto. Portugal. Abstract book: 85.

- Campillo JA, Franco M, Martínez F, Benedicto J. 2004. Comparison of organic contaminant levels in mussels from the Mediterranean coast of Spain (Western Mediterranean) collected in 1993 and 2001. Rapp Comm Int Mer Médit 37: 177. ISSN: 0373-434X.
- Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M, Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. Aquat Toxicol 46: 67-76.
- Cavaletto M, Ghezzi A, Burlando B, Evangelisti V, Ceratto N, Viarengo A. 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Comp Biochem Physiol 131: 447-455.
- Chaudhary R, Pandy S, Kushwaha B, Gaur KK, Nagpure NS. 2006. Fish micronucleus assay: A sensitive tool for ecogenotoxicity studies. J.Ecophysiol Occup Health 6: 143-147.
- Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ernster L, Ames BN. 1984. Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1696-1700.
- Cheung CCC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PKS. 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat Toxicol 52: 189-203.
- Cheung CCC, Zheng GJ, Lam PKS, Richardson BJ. 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.
- Cheung CCC, Siu WHL, Richardson B, Luca-Abbott SB, Lam PKS. 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Environ Pollut 128: 393-403.
- Clark AG. 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. Comp Biochem Physiol B 92: 419-446.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, seleniumdependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol Environ Saf 28: 122-131.
- Cossu C, Doyotte A, Babut M, Exinger A, Vasseur P. 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotoxicol Environ Saf 45: 106-121.
- Cotou E, Papathanassiou E, Tsangaris C. 2002. Assessing the quality of marine coastal environments: comparison of scope for growth and Microtox super (registered) bioassay results of pollution gradient areas in Eastern Mediterranean (Greece). Environ Pollut 119:141-149.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. Limnol Oceanogr 38: 299-313.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A, Pellerin-Massicotte J, Auclair JC. 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I: Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. Can J Fish Aquat Sci 52: 690-702.
- Crathorne B, Dobbs AJ, Rees Y. 1996. Chemical pollution of the aquatic environment by priority pollutants and its control. En Harrison RM. (ed): *Pollution: Causes, Effects and Control*. Royal Society of Chemistry. Cambridge. Reino Unido. 1-25.
- Crosby MP, Gale LD. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. J Shellfish Res 9:233–237.
- Dafre AL, Medeiros ID, Muller IC, Ventura EC, Dias Bainy AC. 2004. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. Chem Biol Interact 149:97-105.
- Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Mar Environ Res 56: 443-470.
- Daughton CG. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. Environ Impact Asses 24: 711-732.
- de Almeida EA, Miyamoto S, Bainy ACD, de Medeiros MHG, Di Mascio P. 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. Mar Pollut Bull 49: 386-392.
- Decisión 2010/477/UE. Decisión de la Comisión Europea de 1 de septiembre de 2010 sobre "los criterios y las normas metodológicas aplicables al buen estado medioambiental de las aguas marinas". Notificada con el número C(2010) 5956. (2010/477/UE).
- De Flora S, Bagnasco M, Zanacchi P. 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. Mutat Res 258: 285-320.

- De Luca-Abbott SB, Richardson BJ, McClellan KE, Zheng GJ, Martin M, Lam PKS. 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar Pollut Bull 51: 694-707.
- Demayo A, Taylor MC, Taylor KW, Hodson PV. 1982. Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. CRC Crit Rev Environ Control 12:257-305.
- De Vos W, Tarvainen T. 2006. Geochemical atlas of Europe. Part 2: Interpretation of geochemical maps, additional tables, figures, maps and related publications. FOREGS atlas. Geological Survey of Finland, Espoo, Findland, pp.690.http://www.gtk.fi/publ/foregsatlas/
- De Zwart D. 1995. Monitoring water quality in the future. Volume 3: Biomonitoring. National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM). Bilthoven. Holanda.
- Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Directiva Marco del Agua. Diario Oficial nº L 327 de 22/12/2000.
- Directiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de junio de 2008 por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino. Directiva Marco sobre la Estrategia Marina. Diario Oficial n° L 164 de 25/6/2008.
- Dolcetti L, Venier P. 2002. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. Mar Environ Res 54: 487-491.
- Domini F, Dinelli E, Sangiorgi F, Fabbri E. 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). Environ Int 33: 919–928.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat Toxicol 39: 93-110.
- EEA 1999. State and Pressures of the Marine and Coastal Mediterranean Environment. Papathanassiou E, Gabrielidis GP (eds.). European Environment Agency. Environmental Assessment Series nº 5. 137 pp.
- EEA 2003. Europe's environment: The third assessment. European Environment Agency. Environmental Assessment Report nº 10.
- Eisler R. 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service. Washington, DC. Biological Report nº 85 (1.2). 30 pp.
- Eisler R. 1987a. Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service. Washington, DC. Biological Report nº 85 (1.10). 63 pp.
- Eisler R. 1987b. Polycylic Aromatic Hydrocarbons Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. US. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report nº 85 (1.11). 81 pp.
- Eisler R. 1988. Arsenic hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. US. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report nº 85 (1.12). 92 pp.
- Eisler R. 1993. Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. US Fish and Wildlife Service. Washington DC. Biological Report nº 10. 106 pp.
- Elbaz-Poulichet F, Morley NH, Beckers JM, Nomerange P. 2001. Metal fluxes through the Strait of Gibraltar: the influence of the Tinto and Odiel rivers (SW Spain). Mar Chem 73:193-213.
- Engel DW, Vaughan DS. 1996. Biomarkers, natural variability and risk assessment: Can they co-exist? Hum Ecol Risk Assess 2: 257–262.
- EPA 1980. Ambient water quality criteria for polynuclear aromatic hydrocarbons. US. Environmental Protection Agency Report. 440/5-80-069. 193 pp.
- Fattorini D, Alonso-Hernández CM, Díaz-Asencio M, Muñoz-Caravaca A, Pannacciulli FG, Tangherlini M, Regoli F. 2004. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: Importance in monitoring studies. Mar Environ Res 58:845-850.
- Ferm VH, Layton Jr. WM. 1981. Teratogenic and mutagenic effects of cadmium. En: Nriagu JO (ed): *Cadmium in the Environment. Part 2. Health Effects*. John Wiley. Nueva York. 743-756.
- Fernández B, Campillo J, Benedicto J, Martínez-Gómez C. 2003. Metallothionein levels in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of heavy metal exposure on the Spanish Mediterranean coast. 5th Iberian Congress and 2nd Iberoamerican on Environmental Contamination and Toxicology (CICTA). 22-24 Septiembre 2003. Oporto. Portugal. Abstract book: 191.
- Fitzpatrick PJ, Sheehan D. 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. Xenobiotica 23: 851-861.
- Fitzpatrick PJ, Krag TOB, Hojrup P, Sheehan D. 1995a. Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Biochem J 305: 145-150.
- Fitzpatrick PJ, Sheehan D, Livingstone DR. 1995b. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. Mar Environ Res 39: 241-244.

- Fitzpatrick PJ, O'Halloran J, Sheehan D, Walsh AR. 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digesive gland of *Mytilus edulis* (L.), as a potential organic pollution biomarkers. Biomarkers 2:51-56.
- Flohé L, Gunzler WA, Schock HH. 1973. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett 32: 132-134.
- Flohe L. 1979. Glutathione perioxidase: fact and fiction. En: *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage*. Ciba Foundation Symposium 65: 95-113. Exerpta Medica. Amsterdam.
- Franco M, Benedicto J, Campillo J, Martínez F, Navarro C. 1997. Contaminación del litoral mediterráneo Español por compuestos organoclorados. VIII Seminario Ibérico de Química Marina. 10-12 Abril 1996. Vigo. España. Procesos Biogeoquímicos en sistemas costeros Hispano-Lusos. 105-108. ISBN: 84-89690-27-8.
- Franco J, Borja A, Solaun O, Perez V. 2002. Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): results from an 11-year monitoring programme. Mar Pollut Bull 44:973-976.
- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. En: Meistner A. (ed): *Advances in Enzymology*. Nueva York. Vol 58: 61–97.
- Gabrielides GP. 1994. Pollution of the Mediterranean Sea. Proceedings of the International Symposium on Pollution of the Mediterranean Sea. 2-4 de Noviembre de 1994. Nicosia. Chipre. 7-16.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC. 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*?. Ecotoxicol Environ Saf 61: 209-220.
- Geret F, Cosson RP. 2002. Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. Arch Environ Contam Toxicol 42:36-42.
- GESAMP 1986. Review of potentially harmful substances Arsenic, Mercury and Selenium. Joint Group of experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Reports and Studies nº 28.
- GESAMP 1989. The atmospheric input of trace species to the world ocean. Joint Group of experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. Report and Studies nº 38. 124 pp.
- Giguere A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O, Hare L, Pinel-Alloul B, Pellerin J. 2003. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. Aquat Toxicol 64: 185-200.
- Godwin AH. 2001. The biological chemistry of lead. Curr Opin Chem Biol 5:223-227.
- Goldberg ED. 1975. The Mussel Watch: a first step in global marine monitoring. Mar Pollut Bull 6:111-114.
- González J, González-Quijano A, Rodríguez C, Benedicto J. 2001. Contribution to the study of the geographical distribution of PCBs and OCPs in the coasts of the Spanish Mediterranean. Oceans III Millennium. 1st International Congress on Marine Science and Technology. 24-27 Abril 2001. Pontevedra. España.
- Gowland BTG, McIntosh AD, Davies IM, Moffat CF, Webster L. 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. Mar Environ Res 54: 231-235.
- Gravato C, Oliveira M, Santos MA. 2004. Genotoxic effects and oxidative stress responses induced by retene in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Fresen Environ Bull 13: 795-800.
- Gwozdzinski K, Gonciarz M, Kilanczyk E, Kowalczyk A, Pieniazek A, Brichon G. 2010. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in *Mytilus galloprovincialis* from the French Mediterranean coast. Oceanol Hydrobiol St 39:33-43.
- Haaf T, Raderschall E, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Golub EI. 1999. Sequestration of mammalian Rad51– recombination protein into micronuclei. J Cell Biol 144: 11-20.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1985. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. En: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds): *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press. Oxford. 188–276.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press Inc. Nueva York. USA. 246 pp.
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol 141:312-322.
- Halldörsson HP, Svavarsson J, Granmo A. 2005. The effect of pollution on scope for growth of the mussel (*Mytilus edulis* L.) in Iceland. Mar Environ Res 59:47-64.
- Hamilton SJ, Mehrle PM. 1986. Metallothionein in fish: Review of its importance in assessing stress from metal contaminants. T Am Fish Soc 115, 596-609.
- Harding GC, Addison RF. 1986. Accumulation and effects of PCBs in marine invertebrates and vertebrates. En: Wood JS (ed): PCBs and the Environment. Vol II. CRC Press. Boca Raton. Florida. 9–30.
- Heddle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat Res 18:307-317.
- Heddle JA, Cimino MJ, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys Ph, MacGregor JT. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. Environ Mol Mutagen 18:277-291.
- Hodson PV, Borgmann U, Shear H. 1979. Toxicity of copper to aquatic biota. En Nriagu JO (ed): *Biogeochemistry of Copper. Part II. Health Effects*. John Wiley and Sons. Nueva York. 307-372.

- Hooftman RN, de Raat WK. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. Mut Res 104:147-152.
- IARC 1987. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluation of carcinigenity: an updating of IAPC monographs. International Agency for Research of Cancer. Vol. 1–42. Supl 7. Lyon. Francia.
- ICES 2002. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC). 11-15 Marzo 2002. Murcia. España.
- ICES 2004. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC). International Council for the Exploration of the Sea. Ostende. Belgica.
- ICES TIMES 2006. Techniques in Marine Environmental Sciences. Biological Effects in Contaminants. Measurement of Scope For Growth in blue mussels. Nº 40. pp 1-34.
- ICES 2007a. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC). 19-23 Marzo 2007. Alejandría. Italia. CM 2007/MHC:03, 129 pp.
- ICES. 2007b. Report of the ICES/OSPAR Workshop on Integrated Monitoring of Contaminants and their Effects in Coastal and Open-sea Areas (WKIMON III). 16–18 Enero 2007. ICES Headquarters. ICES CM 2007/ACME:01. 209 pp.
- ICES. 2009a. Report of the Joint ICES/OSPAR Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC), 12–15 Enero 2009. Copenague. Dinamarca. ICES CM 2008/ACOM:30. 64 pp.
- ICES. 2009b. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC), 16-20 Marzo 2009. Weymouth Laboratory. Reino Unido. ICES CM 2009/MHC:04. 101 pp.
- Isani G, Andreani G, Kindt M, Carpenè E. 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. Cell Mol Biol 46 (2): 311–330.
- Ivankovic D, Pavicic J, Kozar S, Raspor B. 2002. Multiple forms of metallothionein from the digestive gland of naturally occurring and cadmium-exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Helgoland Mar Res 56 (2):95-101.
- Ivankovic D, Pavicic J, Erk M, Filipovic-Marijic V, Raspor B. 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. Mar Pollut Bull 50: 1303-1313.
- Izquierdo JI, Machado G, Ayllon F, d'Amico VL, Bala LO, Vallarino E, Elias R, Garcia-Vazquez E. 2003. Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. Ecotox Environ Safe 55:24-29.
- Jernelov A, Hartung R, Trost PB, Bisque RE. 1972. Environmental mercury contamination. En: Hartung R, Dinman BD (eds): *Environmental Dynamics of Mercury*. Ann Arbor Science Publ. Michigan. 167-201.
- Kalpaxis DL, Theos C, Xaplanteri MA, Dinos GP, Catsiki AV, Leotsinidis M. 2004. Biomonitoring of Gulf of Patras, N. Peloponnesus, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells. Environ Res 94 (2):211-220.
- Kappus. H. 1986. Overview of enzymes involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. Biochem Pharmacol 35: 1-6.
- Khessiba A, Hoarau P, Gnassia B, Aissa P, Romeo M. 2001. Biochemical response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. Arch Environ Cont Toxicol 40: 222-229.
- Kock W, Kramer JM. 1994. Active bio-monitoring (ABM) by translocation of bivalve mollusks. En: Kramer KJM (ed): *Bio-monitoring of Coastal Waters and Estuarines*. Orlando. 51–84.
- Kotelevtsev SV, Stepanova LI, Glaser VM. 1994. Biomonitoring of genotoxicity in coastal waters. En: Kees JMK (ed): *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. Boca Raton. Florida. 227-241.
- Koukouzika N, Dimitriadis VK. 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress. Ecotoxicology 14:449-463.
- Koukouzika N, Dimitriadis VK. 2008. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. Mar Pollut Bull 56:941-949.
- Kruk I. 1998. Environmental Toxicology and Chemistry of Oxygen Species. The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 2. Springer. Berlin.
- L and IS. 1988. Levels of carcinogens in the marine environment. Parts 1 and 2. The Laboratory of Plymouth. Library and Information Services of the Marine Biological Association of the United Kingdom.
- Langston WJ, Bebianno MJ, Burt GR. 1998. Metal handling strategies in molluscs. En: Langston WJ, Bebianno MJ (eds): *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall. Londres. Reino Unido. 219–283.
- Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. 1978. Hepatic cytosolic non-selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and effect on selenium deficiency. J Nutr 108: 981-987.

Laws EA. 1981. Aquatic Pollution. An Introductory Text. John Wiley and Sons (eds). Nueva York. USA.

- Lee RF, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat Res 544:43-64.
- Lemoine S, Bigot Y, Sellos D, Cosson RP, Laulier M. 2000. Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. Mar Biotechnol 2: 195-203.
- Lemoine S, Marc L. 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. Mar Pollut Bull 46: 1450-1455.

Leonard A, Gerber GB. 1989. Zinc toxicity: does it exist?. J Am Coll Toxicol 8:1285-1290.

- León VM, Martínez-Gómez G, García I, Campillo JA, Benedicto J. *en prensa*. Spatial distribution and tempral trends of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Mediterranean coast. Environ Monit Assess. Aceptado para su publicación.
- Lima I, Moreira SM, Osten JR, Soares AMVM, Guilhermino L. 2007. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the Northwestern coast of Portugal. Chemosphere 66: 1230-1242.
- Lipiatou E, Tolosa I, Simo R, Bouloubassi I, Dachs J, Marti S, Sicre A, Bayona JM, Grimalt JO, Saliot A, Albaiges J. 1997. Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea. Deep-Sea Res 44:881-905.
- Livingstone DR, Farrar SV. 1985. Responses of the mixed function oxidase system of some bivalve and gastropod molluscs to exposure to polynuclear aromatic and other hydrocarbons. Mar Environ Res 17: 101-105.
- Livingstone DR. 1988. Responses of microsomal NADPH cytochrome c reductase activity and cytochrome P450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. Mar Ecol Prog Ser 46: 37–43.
- Livingstone DR, Kirchin MA, Wiseman A. 1989. Cytochrome P-450 and oxidative metabolism in molluscs. Xenobiotica 19: 1041-1062.
- Livingstone DR, Garcéa Martínez P, Michel X, Narbonne JF, O'Hara S, Ribera D, Winston G. 1990. Oxyradical production as pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluses. Funct Ecol 4:415-424.
- Livingstone DR. 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. Adv Comp Environ Physiol 7, 45-185.
- Livingstone D, Lips F, Martínez P, Pipe R. 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel (*Mytilus edulis* L.). Mar Biol 112: 265- 276.
- Livingstone DR, Nasci C, Solé M, Da Ros L, O'Hara SCM, Peters LD, Fossato V, Wootton AN, Goldfarb PS. 1997. Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. Aquat Toxicol 38: 205-224.
- Lucas A, Beninger PG. 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. Aquaculture 44:187–200.
- Mackay E, J Overnell, B Dunbar, I Davidson, P Hunziker, J Kagi y J Forthergill. 1990. Polymorphism of cadmium-induced mussel metallothionein. Experientia 46: A36.
- Mackay EA, Overnell J, Dunbar B, Davidson I, Hunziker PE, Kaegi JHR, Fothergill JE. 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. Eur J Biochem 218:183-194.
- Magni P, De Falco G, Falugi C, Franzoni M, Monteverde M, Perrone E, Sgro, M, Bolognesi C. 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). Environ Pollut 142:65-72.
- Malins DC, Ostrander GK. 1991. Perspectives in aquatic toxicology. Annu Rev Pharmacol Toxicol 31: 371-399.
- Manduzio H, Monsinjon T, Rocher B, Leboulenger F, Galap C. 2003. Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquat Toxicol 64: 73-83.
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B. 2004. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoforme of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat Toxicol 70: 83-93.
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. ISJ 2, 91-104.
- Margoshes M, Vallee BL. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc 79: 4813– 4814.

- Martínez-Gómez, C, Roca, MH, García-Agüera, I, Benedicto J. 2007a. Spatial distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Iberian Mediterranean coast. 38th CIESM Congress. 9-13 Abril 2007. Estambul. Turquía. Rapp Comm Int Mer Médit. 38.
- Martínez-Gómez C, Campillo JA, León V, Fernández B, Benedicto J. 2007b. Biomonitoring strategy to assess the effects of chemical pollution along the Iberian Mediterranean Coast: Present state and future development. ICES CM I:11.
- Martínez-Gómez C, Benedicto J, Campillo JA, Moore M. 2008. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. J Environ Monit 10:490-499.
- McCarthy JF, Shugart LR. 1990. Biological Markers of Environmental Contamination. En: McCarthy JF, Shugart LR. (eds.): *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers. Florida. USA. 3-14.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein. J Biol Chem 244: 6049-6055.
- Meister A. 1981. Metabolism and functions of glutathione. TIBS 6:231-234.
- Meister A. 1985. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. Methods Enzymol 113:571–586.
- Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem 263:17205-17208.
- Michel X, Salaüm JP, Galgani F, Narbonne JF. 1994. Benzo(a)pyrene hydroxylase activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*: a potencial marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. Mar Environ Res 38:257-273.
- Michel XR, Beasse C, Narbonne JF. 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus* galloprovincialis. Arch Environ Contam Toxicol 28:215-222.
- Miele M, Bonatti S, Menichini P, Ottaggio L, Abbondandolo A. 1989. The presence of amplified regions affects the stability of chromosomes in drug resistant Chinese hamster cells. Mutat Res 219:171-178.
- Migon C. 2005. Trace metals in the Mediterranean Sea. En: Saliot A. (ed): *The Mediterranean Sea. Handbook* of Environmental Chemistry. Springer. 151-176.
- Mills GC. 1957. Hemoglobin metabolism I. Glutathione peroxidase, an erytrocyte enzyme which protect hemoglobin from oxidative damage. J Biol Chem 229:189–197.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. Biochim Biophys Acta 1619:263-268.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG, Lopes G, Pinho L, Chaves IS, Ferreira-Cravo M., Ventura-Lima J, Bianchini A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. Comp Biochem Physiol C 146:221–234.
- Moore JW, Ramamoorthy S. 1984. Heavy metals in natural waters. Applied Monitoring and Impact Assessment. Springer-Verlag. Berlin. 268 pp.
- Moreira SM, Guilhermino L. 2005. The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese Coast. Environ Monit Assess 105:309-325.
- Mourgaud Y, Martinez E, Geffard A, Andral B, Stanisiere JY, Amiard JC. 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarkers 7:479-490.
- Narbonne JF, Garrigues P, Raoux C, Mathieu A, Lemaire P, Salaun JP, Lafaurie M. 1991. Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring: field studies on the French coast of the Mediterranean Sea. Comp Biochem Physiol C 100:37-42.
- Nasci C, Nesto N, Monteduro RA, Da Ros L. 2002. Field application of biochemical markers and a physiological index in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*: transplantation and biomonitoring studies in the lagoon of Venice (NE Italy). Mar Environ Res 54:811–816.
- Nebert DW, Matthew ALR, Dieter Z, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. 2000. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. Biochem Pharmacol 59:65–85.
- Neff JM. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Applied Science Publ Ltd. Londres. Reino Unido. 262 pp.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6:1-42.
- Nigro M, Falleni A, Del Barga I, Scarcelli V, Lucchesi P, Regoli F, Frenzilli G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. Aquat Toxicol 77:339-347.
- NOAA 1995. International Mussel Watch Project. The Initial Implementation Phase. Final Report. International Mussel Watch Committee. NOAA Office of Ocean Resources Conservation and Assessment. Rockville. USA. 63 pp.
- NRC 1987. Biological markers in environmental health research. Environmental Health Perspectives 74, 3-9. Committee on Biological Markers of the National Research Council.
- O'Brien PJ. 1991. Molecular mechanisms of quinone toxicity. Chem-Biol Interact 80:1-41.
- Oceana 2003. El vertido de hidrocarburos desde buques a los mares y océanos de Europa. La otra cara de las mareas negras. http://eu.oceana.org/es/eu/prensa-e-informes/informes?page=5.
- Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem 239:2370-2378.
- OSE 2010. Accidentes marítimos con vertidos de hidrocarburos. En: Informe sobre Energía y Sostenibilidad en España 2010. Observatorio de Energía y Sostenibilidad en España (OSE). Cap. 17.1.415-416.
- Osman AM, Rotteveel S, Den Besten PJ, van Noort PCM. 2004. In vivo exposure of *Dreissena polymorpha* mussels to the quinones menadione and lawsone: Menadione is more toxic to mussels than lawsone. J Appl Toxicol 24:135-141.
- OSPAR, 2004a. Strategy for a Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). OSPAR Commission, reference number 2004-17-E.
- OSPAR, 2004b. Coordinated Environmental Monitoring Programme (CEMP). OSPAR Commission, reference number 2004-16-E.
- OSPAR Commission 2002. Survey on genotoxicity test methods for the evaluation of waste water within whole effluent assessment. ISBN 1-904426-02-6.
- OSPAR Commission, 2007. Background document on biological effects monitoring techniques. Capítulo 4. Scope for Growth. pp 116-122. ISBN 978-1-905859-72-6. Publication Number: 333/2007.
- Pain DJ. 1995. Lead in the environment. In: Handbook of Ecotoxicology. Hoffman DJ, Rattner EA, Burton GA, Cairns J (eds). Lewis Puplishers. USA. 356-391.
- Palanques A, Díaz JI, Farran M. 1995. Contamination of heavy metals in the suspended and surface sediment of the Gulf of Cadiz (Spain): The role of sources, currents, pathways and sinks. Oceanol Acta 18:469-477.
- Pampanin DM, Camus L, Gomiero A, Marangon I, Volpato E, Nasci C. 2005a. Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). Mar Pollut Bull 50:1548-1557.
- Pampanin DM, Marango I, Volpato E, Campesan G, Nasci C. 2005b. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). Environ Pollut 136 103-107.
- Pampanin DM, Volpato E, Marangon I, Nasci C. 2005c. Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice: survival in air and condition index. Comp Biochem Physiol A 140:41–52.
- Pavicic J, Raspor B, Martincic D. 1993. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. Mar Biol 115:435-444.
- Peakall DB, Shugart LR. 1993. Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. Springer-Verlag. Berlin. Alemania.
- Peters LD, Nasci C, Livingstone DR. 1998. Immunochemical investigations of cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in digestive gland of *Mytilus* sp. Comp Biochem Physiol C 121:361-369.
- Peters LD, Shaw JP, Nott M, O'Hara SCM, Livingstone DR. 1999. Development of cytochrome P450 as a biomarker or organic pollution in *Mytilus* sp.:field studies in U.K ('Sea Empress' oil spill) and the Mediterranean Sea. Biomarkers 4:425-441.
- Petrovic, M., Gonzales, S., Barcelo, D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. Trends Anal Chem 22:685-696.
- Porte C, Solé M, Albaigés J, Livingstone DR. 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. Comp Biochem Physiol C 100:183-186.
- Porte C, Lemaire P, Peters L, Livingstone DR. 1995. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. Mar Environ Res 39:27–31.
- Porte C, Biosca X, Solé M, Albaigés J. 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). Environ Pollut 112:261-268.
- Prakash NT, Rao KS. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. Mol Cell Biochem 146:107-113.
- Prochaska HJ, Talalay P. 1988. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. Cancer Res 48:4776-4782.
- Prohaska JR, Ganther HE. 1977. Glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases purified from rat liver. Biochem Biophys Res Commun 76: 437-441.
- Provini A, Maio E, Galassi S. 1991. Pesticide contamination in some tributaries of the Tyrrhenian Sea. Toxicol Environ Chem 31-32:157-165.

- Quesada C. 1996. Estructura del sector español de la Faja Pirítica: implicaciones para la exploración de yacimientos. Boletín Geológico Minero 107:65-78.
- Raftopoulou EK, Dailianis S, Dimitriadis VK, Kaloyianni M. 2006. Introduction of cAMP and establishment of neutral lipids alterations as pollution biomarkers using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarkers. Sci Total Environ 368:597-614.
- Reglamento 850/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que modifica la Directiva 79/117/CEE.
- 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.
- Richardson BJ, Mak E, Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS. 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? Mar Pollut Bull 57:503-514.
- Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio H, Gallois J, Devier MH, Geffard O, Gricourt L, Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, Andre V, Lebailly P, Cachot J. 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. Aquat Toxicol 79:65-77.
- Rodilla V. 1993. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatintreated CGO cultures. Mutat Res 300:191–281.
- Rodríguez C, Guerrero J, Benedicto J, Jornet A. 1995. Spatial distribution of heavy metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Spanish Mediterranean coast. Rapp Comm Int Mer Médit 34: 145. ISSN: 0373-434X.
- Roesijadi G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat Toxicol 22:81– 114.
- Romeo M, Mourgaud Y, Geffard A, Gnassia-Barelli M, Amiard JC, Budzinski H. 2003. Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions. Environ Toxicol 18:295-305.
- Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. 2000. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. Chem Biol Interact 129:77-97.
- Safe S. 1995. Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2378-tetrachlorodibenzo-pdioxin and related compounds. Pharmacol Ther 67:247–281.
- Safe S. 2001. Molecular Biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. Toxicol Lett 120:1-7.
- Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJ. 1990. Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. J Biol Chem 265:11919–11927.
- Sánchez J, Solé M, Albaigés J. 1993. A comparison of distribution of PCB congeners and other chlorinated compounds in fishes from coastal areas and remote lakes. Int J Environ Anal Chem 50:269–284.
- Sarkar A, Ray D, Shrivastava A, Sarker S. 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology 15:330-340.
- Scarpato A, Romanelli G, Galgani F, Andral B, Amici M, Giordano G, Caixach J, Calvo M, Campillo JA, Benedicto J, Cento A, BenBrahim S, Sammari C, Deudero S, Boulahdid M, Giovanardi F. 2010. Western Mediterranean coastal waters-Monitoring PCBs and pesticides accumulation in *Mytilus* galloprovincialis by active mussel watching: the Mytilos project. J Environ Monit 12:924-935.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. Mutat Res 31:9-15.
- Schuckelt R, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Roveri A, Reumkens J, Strabburger W, Ursini F, Wolf B, Flohé L. 1991. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a seleno-enzyme distinct from the classical glutathione peroxidase as evident from cDNA and amino acid sequencing. Free Radic Res Commun 14:343-361.
- Sericano JL. 2000. The Mussel Watch approach and its applicability to global chemical contamination monitoring programmes. Int J Environ Pollut 13:340-350.
- Serrano-García L, Montero-Montoya R. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. Environ Mol Mutagen 38:38-45.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J 360:1-16.
- Smolders R, Voets J, Bervoets L, Blust R. Wepener V. 2005. Water Encyclopedia: Water quality and resource development. Lehr J, Keeluy J, Lehr J. (eds). Wiley Interscience. Hoboken. 33-37.
- Snyder MJ. 2000. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. Aquat Toxicol 48:529-547.
- Solé M, Porte C, Albaigés J. 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. Aquat Toxicol 30:271-283.

- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, Albaigés J. 1996. Effects of the Aegean Sea oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). Comp Biochem Physiol C 113:257-265.
- Solé M, Peters LD, Magnusson K, Sjolin A, Granmo A, Livingstone DR. 1998. Responses of the cytochrome P450 dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel *Mytilus edulis* L. to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). Biomarkers 3:49-63.
- Soriano JA, Viñas L, Franco MA, González JJ, Ortiz L, Bayona JM, Albaigés J. 2006. Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the Prestige oil spill. Sci Total Environ 370:80-90.
- Soriano JA. 2009. Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido del B/T Prestige. Tesis Doctoral. Universidad de La Coruña.
- Spear PA. 1981. Zinc in the aquatic environment: chemistry, distribution, and toxicology. National Research Council of Canada (NRCC) Publication. 145 pp.
- Stegeman JJ. 1985. Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the musseel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the western North Atlantic. Mar Biol 89:21-30.
- Stegeman JJ, Brouwer M, Richard TDG, Förlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. En Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Jr. Bergman HL (eds): *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers. Chelsea. USA. 235-335.
- Stephenson GA, Solomon KR. 1993. Pesticides and the Environment. Department of Environmental Biology, Universidad de Guelph. Guelph. Ontario. Canada. http://www.fao.org
- Strauss GK, Madel J. 1974. Geology of massive sulphide deposits in the Spanish Portuguese Pyrite Belt. Geologische Rundschau 63:191-211.
- Strobel HW, Hodgson AV, Shen S. 1995. Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. Ortiz de Montellano PR (ed). Plenum. Nueva York. USA. 225 -244.
- Sureda A, Box A, Tejada S, Blanco A, Caixach J, Deudero S. 2011. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). Aquat Toxicol 101:540-549.
- Suter GW. 1993. Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers. Boca Raton. USA. 538 pp.
- Tappel AL. 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. Fed Prod 32:1870-1874.
- Thomas DJ, Styblo M, Lin S. 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol Appl Pharmacol 176:127–44.
- Tolosa I, Readman JW, Fowler SW, Villeneuve JP, Dachs J, Bayona JM, Albaigés J. 1997. PCBs in the western Mediterranean. Temporal trends and mass balance assessment. Deep-Sea Res PT II 44:907-928.
- Torres MA, Testa CP, Gaspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, de Almeida EA, Di Mascio P, Wilhelm D. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. Mar Pollut Bull 44:923-932.
- Tsangaris C, Papathanasiou E, Cotou E. 2007. Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferronickel smelting plant using biomarkers. Ecotoxicol Environ Saf 66:232-243.
- Udroiu I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. Aquat Toxicol 79:201-204.
- UNEP 2005. Fact sheets on marine pollution indicators. Meeting of the MED POL National Coordinators. UNEP(DEC)/MED/WG.264/Inf.14. 11 24-27 Mayo 2005. Barcelona. España.
- UNEP, 1997. Report of the meeting of experts to review the MED POL biomonitoring programme. UNEP(OCA)/MED WG. 132/7. Atenas. Grecia.
- UNEP/RAMOGE 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP. Atenas. Grecia. 88 pp.
- UNEP/WHO 1995. Assessment of the state of pollution in the Mediterranean Sea by carcinogenic, mutagenic and teratogenic substances. MAP Technical Reports Series nº 92. Atenas. Grecia.
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. 1985. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta 839:62–70.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. Environ Toxicol Pharmacol 13:57-149.
- van Geen A, Adkins JF, Boyle EA, Nelson CH, Palanques A. 1997. A 120 yr record of widespread contamination from mining of the Iberian pyrite belt. Geology 25:291-294.
- Venier P, Maron S, Canova S. 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. Mutat Res 390:33-44.
- Venier P, Zampieron C. 2005. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. Environ Int 31:1053-1064.

- Vergani L, Grattarola M, Graselli E, Dondero F, Viarengo A. 2007. Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from *Mytilus galloprovincialis*. Arch Biochem Biophys 465:247-53.
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN. 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. Chemosphere 71:1977-1985.
- Viarengo A, Nott JA. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp Biochem Physiol C 104:355–372.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M, 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comp Biochem Physiol C 97:37-42.
- Viarengo A. Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Am J Physiol Regul Integr Compar Physiol 277:1312-1319.
- Viarengo A, Burlando B, Giordana A, Bolognesi C, Gabrielides GP. 2000a. Networking and expert-system analysis: next frontier in biomonitoring. Mar Environ Res 49:483-486.
- Viarengo A, Burlando B, Ceratto N, Panfoli I. 2000b. Antioxidant role of metallothionein: a comparative overview. Cell Mol Biol 46:407-417.
- Viarengo A, Burlando B, Evangelisti V, Mozzone S, Dondero F. 2001. Sensitivity and specificity of metallothionein as a biomarker for aquatic environment biomonitoring. En: *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*. Elsevier. 29-43.
- Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos MJ, Valavanidis A. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussel *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. Mar Pollut Bull 54:1361-1371.
- Vlahogianni T, Valavanidis A. 2007. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Chem Ecol 23:361-371.
- Wang SH, Hong HS, Wang XH. 2005. Bioenergetic responses in green lipped mussels (*Perna viridis*) as indicators of pollution stress in Xiamen coastal waters, China. Mar Pollut Bull 51:738-743.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall D. 2001. Major classes of pollutants. En Taylor and Francis (eds): *Principles of Ecotoxicology*. Segunda edición. Londres. Reino Unido.
- Weatherley AH, Lake PS, Rogers SC. 1980. Zinc pollution and the ecology of the freshwater environment. En: Nriagu JO (ed): Zinc in the Environment. Part I: Ecological Cycling. John Wiley. Nueva York. USA. 337-417.
- Weiner JG, Krabbenhoft DP, Scheuhammer AM. 2003. Ecotoxicology of mercury. En: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns Jr. J. (eds): *Handbook of Ecotoxicology*. CRC Press. Boca Raton. USA. 409– 463.
- Weisiger RA, Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 248:4793-4796.
- Wenning RJ, Di Giulio RT. 1988. Microsomal enzyme activities, superoxide production, and antioxidant defenses in ribbed mussels (*Geukensia demissa*) and wedge clams (*Rangia cuneata*). Comp Biochem Physiol C 90:21-28.
- Wepener V, Bervoets L, Mubiana V, Blust R. 2008. Metal exposure and biological responses in resident and transplanted blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Scheldt estuary. Mar Pollut Bull 57:624-631.
- WHO 1962. Principles governing consumer safety in relation to pesticide residues. Report of a meeting of a WHO Expert Committee on Pesticide Residues held jointly with the FAO Panel of Experts on the Use of Pesticides in Agriculture. World Health Organization. Technical Report Series nº 240.
- WHO 1974. Health aspects of environmental pollution control: planning and implementation of national programmes. Genova. World Health Organization Technical Report Series nº 554: 3-57.
- WHO 1993a. Environmental Health Criteria nº 140. Polychlorinated biphenyls and terphenyls (second edition). World Health Organization. Genova. 682 pp.
- WHO 1993b. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Environmental Health Criteria nº 155. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. World Health Organization. Genova.
- Widdows J, Bakke T, Bayne BL, Donkin P, Livingston DR, Lowe DM, Moore MN, Evans SV, Moore SL. 1982. Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water-accommodated fraction of North Sea Oil. Mar Biol 67:15-31.
- Widdows, J. 1985. Physiologcal responses to pollutlon. Mar Pollut Bull 16: 129-134.
- Widdows J, Johnson D. 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. Mar Ecol Prog Ser 46:113-121.
- Widdows J, Donkin P. 1992. Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. En Gosling E (ed): *The mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier. Amsterdam. 383-424.

- Widdows J, Donkin P, Brinsley MD, Evans SV, Salkeld PN, Franklin A, Law RJ, Waldock MJ. 1995. Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. Mar Ecol Prog Ser 127:131-148.
- Widdows J, Nasci C, Fossato VU. 1997. Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy. Mar Environ Res 43:69-79.
- Widdows J, Donkin P, Staff FJ, Matthiessen P, Law RJ, Allen YT, Thain JE, Allchin CR, Jones BR. 2002. Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. Mar Environ Res 53:327-356.
- Winston GW, Di Giulio RT. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat Toxicol 19:137-161.
- Wootton AN, Herring C, Spry JA, Wiseman A, Livingstone DR, Goldfarb PS. 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. Mar Environ Res 39:21-26.
- Wootton AN, Goldfarb PS, Lemaire P, O'Hara SCM, Livingstone DR. 1996. Characterization of the presence and seasonal variation of a CYP1A-like enzyme in digestive gland of the common mussel, *Mytilus edulis*. Mar Environ Res 42:297-301.
- Wright DA. Welbourn P. 2002. Environmental Toxicology. Cambridge University Press. Cambridge. Reino Unido.
- Young DR, Jan TK, Hershelman GP. 1980. Cycling of zinc in the nearshore marine environment. En: Nriagu JO (ed): Zinc in the Environment. Part I: Ecological Cycling. John Willey. Nueva York. USA. 297-335.
- Zanette J, Goldstone JV, Bainy ACD, Stegeman JJ. 2009. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. Mar Environ Res 69:S1-3.

CAPÍTULO II

Respuestas antioxidantes en branquias de mejillón (*Mytilus* galloprovincialis) como biomarcadores de estrés ambiental en la costa mediterránea española

RESUMEN:

En este estudio se ha investigado el estrés oxidativo en branquias de mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, de la costa mediterránea española, y su relación con la bioacumulación de los principales tipos de contaminantes. Se determinaron las actividades enzimáticas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST), y DT-diaforasa (DTD), el grado de peroxidación lipídica (LPO), y la concentración de metalotioneínas (MT) en poblaciones de mejillón de 16 lugares afectados por distintos grados de actividad antropogénica. También se analizaron las concentraciones de los principales contaminantes (Hg, Pb, Cd, Cu, Zn y As, PAHs, PCBs y DDTs) en los tejidos blandos de mejillón, el índice de condición (IC), y los parámetros ambientales, temperatura y salinidad, de muestras de agua tomadas en cada lugar.

Los resultados muestran que las enzimas antioxidantes dependientes de glutatión (GST, GPs y GR) presentaron una elevada y coordinada actividad en relación con la acumulación de metales (Hg, Pb y Cd). Las actividades enzimáticas GPs, GR y DTD se correlacionaron positivamente con la temperatura del agua, demostrando la influencia de este parámetro ambiental sobre la respuesta del sistema antioxidante en las branquias de mejillón. La combinación de una alta temperatura del agua y la acumulación de elevadas concentraciones de metales pudieron incrementar la actividad de estas enzimas antioxidantes. Por el contrario, la enzima CAT y, en menor grado, la enzima SOD mostraron un comportamiento diferente al del resto de enzimas estudiadas, más relacionado con la protección contra los radicales libres generados por la exposición a contaminantes orgánicos, y con una elevada actividad fisiológica (reflejada por altos IC). En términos generales, los elevados niveles de enzimas antioxidantes observados en branquias de mejillones que acumularon altas concentraciones de contaminantes orgánicos y/o metálicos en sus tejidos indicaron una situación de estrés oxidativo que, sin embargo, no pareció conducir a un daño oxidativo, como indica la ausencia de señales de LPO, incluso en los mejillones de los lugares más contaminados. Por último, MT y DTD no reflejaron la acumulación de contaminantes y parecieron estar más influenciadas por variables ambientales que por la contaminación.

Aquatic Toxicology 99 (2010) 186-197

ELSEVIER



Aquatic Toxicology



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

Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast

B. Fernández, J.A. Campillo*, C. Martínez-Gómez, J. Benedicto

Instituto Español de Oceanografía, IEO, Centro Oceanográfico de Murcia, C/Varadero 1, 30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 4 December 2009 Received in revised form 12 April 2010 Accepted 18 April 2010

Keywords: Oxidative stress Antioxidant enzymes Lipid peroxidation Gill Mussels Mediterranean Sea

ABSTRACT

Antioxidant response was used to assess the effects of the main pollutants in wild mussels (Mytilus galloprovincialis) along the Mediterranean coast of Spain. Antioxidant enzyme activities - those of catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidases, glutathione reductase, glutathione S-transferase and DTdiaphorase - as well as lipid peroxidation and metallothionein concentrations were measured in gills of mussels from 16 selected sites. Furthermore, concentrations of the main contaminants (Hg, Pb, Cd, Cu, Zn, As, PAH, PCB, and DDT) were quantified in mussel tissue, and environmental parameters were measured in water samples collected at each site. Results showed that the glutathione-dependent antioxidant enzymes offered an increased and coordinated response against metal (Hg, Pb and Cd) contamination. These enzymatic activities correlated positively to temperature, suggesting the influence of this environmental parameter on antioxidant responses in gill tissues. Furthermore, although temperature did not reach stressful levels in the study area, it seemed to add a synergistic effect to that produced by metals to induce antioxidant enzymes in the most metal-polluted sites. Catalase activity appeared to be involved in a different antioxidant pathway, more related to organic pollutant bioaccumulation, offering an efficient protection mechanism against reactive oxygen species generation due both to organic exposure and high physiological activity, reflected by high condition indices. In general terms, increased levels of antioxidant enzymes at some sites suffering from metal and organic pollution indicated a situation of oxidative stress that nevertheless did not appear to be harmful, since lipid peroxidation levels showed no peroxidative damage in gill tissues of mussels collected from even the most heavily polluted sites. On the other hand, metallothionein and DT-diaphorase did not reflect pollutant exposure and seemed to be more influenced by environmental variables than by the pollutants.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coastal and estuarine environments are subjected to several forms of disturbance, amongst which chemical pollution associated with industrial production and high levels of urbanisation are both of major concern. In this context, chemical monitoring programmes have commonly used both marine organisms and sediment as matrices to identify chemical pollutants in these affected environments. Within such monitoring programmes, mussels are the organisms most widely used as sentinels due to their sessile filter feeding character, ability to accumulate and tolerate high concentrations of pollutants, wide geographical distribution, ease of collection and abundance in coastal and estuarine waters (Goldberg, 1986).

However, the concentration of contaminants in tissues alone provides no information on the biological significance and deleterious effects of environmental pollution on biological systems. Given that the ultimate goal of environmental monitoring is to protect biological/ecological systems, it is necessary to study the overall biological effects of exposure to potentially harmful substances in the environment. To achieve this objective, an increasing number of techniques that measure the biological effects of pollutants (biomarkers) have been incorporated into national and international monitoring activities over the last 30 years. These biological-effect methods, which range from responses measured at subcellular level (e.g. metallothionein, oxidative stress and DNAadducts) to whole-organism responses (e.g. scope for growth, condition index or disease occurrence), can indicate links between contaminants and ecological responses and can be used to indicate the presence of harmful substances in the marine environment (Thain et al., 2008).

Reactive oxygen species (ROS) are unstable atoms or molecules which attempt to strip electrons from other molecules in order to achieve greater stability, thereby creating new radical species and causing chain oxidations. The oxidative metabolism of cells is a continuous source of ROS resulting from the univalent reduction of

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 968 17 94 16; fax: +34 968 18 44 41. *E-mail address:* juan.campillo@mu.ieo.es (J.A. Campillo).

⁰¹⁶⁶⁻⁴⁴⁵X/\$ - see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.aquatox.2010.04.013

O₂ (Halliwell and Gutteridge, 1984). In addition, many pollutants (or their metabolites) may exert harmful effects by catalysing ROS production (Winston and Di Giulio, 1991). If the balance between pro-oxidants and antioxidants is broken, oxidative stress can occur and ROS can cause tissue damage, impair cellular functions, alter the physicochemical properties of cell membranes and, finally, disrupt vital functions (Manduzio et al., 2005).

Limitation of the damage produced by ROS within the cell can be carried out initially by sequestration or destruction of the prooxidant agents. For metals, this essentially occurs through the complexation of free metals by metallothioneins (MT), which apart from their primary role in the homeostasis of essential metals and the detoxification of non-essential ones (Amiard et al., 2006), have also been described as performing an antioxidant role as oxyradical scavengers (Viarengo et al., 2000). Thus, together with antioxidant enzymes and antioxidant molecules of a non-enzymatic nature such as reduced glutathione (GSH), which is typically characterized as the 'cellular redox buffer', protein thiols constitute one of the main components of the cellular antioxidant system. In fact, Hansen et al. (2009) have recently reported that protein thiols constitute a redox-active pool in living cells which are likely to be directly involved in the cellular defence against oxidative stress and that are just as important as GSH.

Among antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidases (GPs) act jointly to destroy ROS within the cell. SOD catalyses the destruction of the superoxide anion radical generating hydrogen peroxide, which is subsequently degraded to water and oxygen by CAT. In addition, hydrogen peroxide and other lipid hydroperoxides can also be removed by GPs, which couple their activity with the oxidation of GSH, generating water in the case of hydrogen peroxide and the corresponding alcohol in the case of lipid hydroperoxides (Manduzio et al., 2005). This enzyme is found in two forms, known as seleniumdependent and selenium-independent glutathione peroxidases (SeGP and non-SeGP). The SeGP enzyme contains selenocysteine at the active site and catalyses the reduction of peroxides as well as that of organic hydroperoxides, while the non-SeGP is active only with organic hydroperoxides and is a glutathione transferase (Prohaska, 1980). Glutathione S-transferases (GST) represent a major group of detoxification isoenzymes whose 'natural' substrates range from molecules of foreign origin to by-products of cellular metabolism. GSTs primarily catalyse the conjugation of GSH to various electrophilic compounds, but they can also act as non-SeGPs, as isomerases, or simply as binding proteins sequestering hydrophobic molecules, and can therefore be regarded as playing an antioxidant role (Manduzio et al., 2005; Prohaska, 1980). Although glutathione reductase (GR) does not play a direct role in the elimination of oxygen radicals it can be regarded as an essential antioxidant enzyme since it reduces oxidised glutathione (GSSG) and maintains the GSSG/GSH balance, essential for cellular homeostasis and the operation of other enzymes (Winston and Di Giulio, 1991). DT-diaphorase (DTD) catalyses the reduction of quinones to hydroquinones, which are more easily excreted after conjugation with sulphate groups or glucuronide. This enzyme makes it possible to produce a stable form of quinoline with no intermediate radical and can thus also be regarded as an antioxidant enzyme (Cadenas, 1995)

Among the biomarkers used in environmental monitoring, oxidative stress measured by means of antioxidant responses or lipid peroxidation (LPO) is a promising biological-effect response (ICES, 2007), useful for assessing exposure to and the effects of pollutants in mussels (Box et al., 2007; Cheung et al., 2002; Lionetto et al., 2003; Regoli and Principato, 1995; Regoli, 1998). Nevertheless, oxidative stress biomarkers are also related to changes in physicochemical and environmental factors such as temperature, salinity, food availability and dissolved oxygen levels, as well as

to intrinsic biological cycles such as gonadal development or the reproductive cycle (Widdows, 1978). As these changes may influence normal metabolic activities, including antioxidant responses and ROS generation (Sheehan and Power, 1999), abiotic and biotic factors should be incorporated into the interpretation of biomarkers of oxidative stress.

The purpose of this work was to assess the effects of the main pollutants in wild mussels (Mytilus galloprovincialis) along the Mediterranean coast of Spain. To this end, several biochemical responses of the antioxidant system were assessed in gill tissues: SOD, CAT, SeGP, non-SeGP, GR, GST, DTD enzyme activities, LPO and MT content. In addition, the concentrations of PAH, organochlorine compounds (PCB and DDT) and metals (Hg, Pb, Cd, Cu, Zn and As) were measured in whole soft tissues of mussels to investigate the correlations between oxidative stress responses and pollutant levels. Mussel populations throughout the study area were subjected to different water temperature, salinity and food availability. In fact, temperature and salinity patterns along the Spanish Mediterranean coast are influenced by two main currents, the Atlantic Surface Water Current (ASWC) (temperature: 15–20 °C/salinity: 36-36.5 psu), which enters the Mediterranean Sea through the Straits of Gibraltar, and the Liguro-Provenço-Catalan Current (LPCC) (temperature: 12.5-13°C/salinity: 38 psu), which flows from the Gulf of Lions to the Catalan Sea (de la Serna Ernst et al., 1999; Fusco et al., 2003). In addition, higher nutrient supply in the vicinity of urban sites determines a greater food availability that will be reflected in a higher condition index (CI) for mussels inhabiting these sites, which constitutes a useful indicator of bivalve growth and health (Pérez-Camacho et al., 1995). Taking this into account, environmental (temperature and salinity) and biological (CI) factors were quantified in water samples and mussels from each site in order to investigate the possible effects of these variables on the studied biomarkers.

2. Material and methods

2.1. Sample collection

Mussels (M. galloprovincialis) were collected in May-June 2003 (pre-spawning period) from 16 sites located along the Spanish Mediterranean coast (Fig. 1), referred to in this study as Medas Islands (MED: 42°2.840' N, 3°13.528' E), Barcelona (BAR: 41°20.106' N, 2°10.273' E), Vallcarca (VALL: 41°14.423' N, 1°51.998' E), Tarragona (TAR: 41°5.057′ N, 1°13.262′ E), Columbretes Islands (COL: 39°53.750' N, 0°40.893' E), Valencia (VAL: 39°26.036' N, 0°18.208' W), Cullera (CUL: 39°11.238' N, 0°13.099' W), Portman (POR: 37°34.251' N, 0°52.406' W), Cartagena (CAR: 37°34.425' N, 0°58.015' W), Almuñécar (ALM: 36°43.664' N, 3°41.658' W), La Herradura (HER: 36°43.975' N, 3°46.150' W), Torrox (TOR: 36°43.975' N, 3°46.150' W), Fuengirola (FUE: 36°30.510' N, 4°38.212′ W), Manilva (MAN: 36°18.629′ N, 5°14.876′ W), Algeciras 1-Punta Carnero (AL1: 36°04.776 N, 5°25.520' W) and Algeciras 2-Guadarranque (AL2: $36^\circ 10.902'$ N, $5^\circ 24.564'$ W). They comprise a variety of coastal environments affected by harbour, urban, industrial (Cartagena, Valencia, Tarragona, Vallcarca, Barcelona) and mining (Portman) activities, together with protected marine reserves (Medas Islands, Columbretes Islands or La Herradura). At each sampling site water temperature and salinity were recorded.

Six pooled samples (n=7 gills) from each site were taken for enzymatic and LPO determinations, and a further six for MT measurements. In order to reduce size and sexual maturity effects, mussels with the shell length 3.5–4.2 cm were randomly sampled. Gills were dissected out and immediately stored in liquid nitrogen at -196 °C. For chemical analyses, three pooled samples of 50 mus-

58

B. Fernández et al. / Aquatic Toxicology 99 (2010) 186-197



Fig. 1. Location of the sampling sites and main circulating water currents that influence temperature and salinity patterns in the Iberian Mediterranean coast (adapted from Fusco et al., 2003): LPCC: Liguro-Provenço-Catalan Current in the north, entering the Ligurian Sea, the Gulf of Lions and the Catalan Sea. ASWC: Atlantic Surface Water Current in the south, entering the Strait of Gibraltar and describing a quasipermanent anticyclonic gyre in the Western Alboran Sea (WAG: Western Alboran Gyre).

sels within the size range of 3.0-3.9 cm, (5 for each 0.1 cm increase of shell length) were taken at each site and stored at -20 °C.

Twelve mussels of shell length 4.0 cm per site were used to determine the mean condition index (CI). Soft tissues and valves were dried at constant temperature (70 °C) until a constant dried weight was obtained. CI was calculated as follows: CI = whole soft tissue dry weight/valve dry weight.

2.2. Chemical analysis

Samples were lyophilised and the wet/dry weight ratio of each sample recorded. Powdered samples were obtained using a centrifugal ball mill (Fritsch 06102) with 30, 20 and 10 mm diameter agate balls. Milling time ranged from 10 to 15 min.

2.2.1. Trace metals

Samples were digested in a microwave oven system (ETHOS PRO, Milestone) in Teflon reactors. Metal determinations were made with an atomic absorption spectrophotometer (AAS) (PerkinElmer Model 4110 ZL). Cadmium, lead and arsenic were measured by graphite furnace AAS. Copper and zinc were measured directly in an air-acetylene flame, and mercury was determined by applying the cold vapour technique (FIMS, PerkinElmer). The accuracy of the analytical procedures was tested and controlled using certified material (No. 298R) from the European Community Bureau of Reference (BCR) and through participation in the Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe programme (Quasimeme, 2003).

2.2.2. Organochlorine compounds

After a Soxhlet extraction (8 h) with a mixture (1:1) of npentane: dichloromethane, a clean-up of the sample extract was carried out using column chromatography on 6% deactivated alumina, n-pentane being the eluent. The extracts were separated into two fractions using column chromatography on silica (3% deactivated). The first fraction, which was eluted with isooctane, contained PCBs, p,p'-DDE, p,p'-DDT and o,p'-DDT, whilst the second, eluted with 15% diethyl ether in isooctane, contained p,p'-DDD. Both fractions were concentrated under a nitrogen stream to 1 ml. PCB 155 was added as an internal standard prior to analysis by gas chromatography. Quantitation was performed using 8 external standard calibration mixtures, containing $1\text{--}80\,\mu g\,l^{-1}$ of selected PCB congeners (IUPAC No. 28, 52, 101, 105, 118, 138, 153, 156, and 180), p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT and o,p'-DDT. The concentrated extracts were analysed by gas chromatography using a PerkinElmer Autosystem gas chromatograph equipped with an electron capture detector (ECD). A TRB-5 (Teknokroma, Spain) 5% diphenyldimethyl siloxane capillary column ($60 \text{ m} \times 0.20 \text{ mm}$ i.d. \times 0.4 μ m phase thickness) was used. The chromatographic conditions were as follows: the column temperature program was 90°C (3 min) to 215°C (40 min) at 30°C and 275°C (30 min) at $5 \,^{\circ}$ C min⁻¹; the injector temperature (splitless mode) was $270 \,^{\circ}$ C; the ECD temperature was 365 °C; the carrier gas was helium. Quality assurance of the analyses was primarily secured through parallel analyses of two certified BCR reference materials (CRM-350 and CRM-598), and participation in intercomparison exercises (Quasimeme, 2004).

2.2.3. Polycyclic aromatic hydrocarbons

Quantification of PAH content in mussels sampled in 2003 was not performed for this study. Nevertheless, data for mussels sampled within the same sampling sites in 2004 and 2005 were available. The 13 selected PAHs (phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*e*]pyrene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, benzo[ghi]perylene, dibenz[ah]anthracene and indeno[1,2,3*cd*]pyrene) were separated by means of high performance liquid chromatography (HPLC) using a methanol-water gradient as the mobile phase. Temperature was fixed at 23.5 °C. The system used was a WATERS 2695, with a WATERS PAH column ($25 \text{ cm} \times 0.46 \text{ cm}$, and 5 µm particle size). Identification and quantification were carried out using a WATERS 2475 fluorescence detector with programmable wavelength and multilevel calibration. Intercomparison mussel homogenate samples from intercalibration provided by the National Institute of Standards and Technology/NIST (USA) were used as a control for the analytical standard reference material (SRM) 2977 (Quasimeme, 2006).

Trace metal data were expressed as $\mu g g^{-1}$ dry weight, while concentrations of organic compounds (PAHs, PCBs and DDTs) were expressed as $ng g^{-1}$ dry weight.

2.3. Biochemical analysis

2.3.1. Metallothionein

Gills were homogenised (1:3, w/v) in 50 mM Tris–HCl buffer pH 8.6 containing 0.5 M sucrose, 0.01% β -mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) and 0.006 mM leupeptin. MTs were determined by the spectrophotometric method described in (UNEP/RAMOGE, 1999).

2.3.2. Antioxidant enzyme activities

Gills were homogenised (1:2, w/v) in K-phosphate buffer 100 mM, pH 7.6 containing 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 3 μ g/mL leupeptin. After sequential centrifugations at 600 × g for 15 min, 13,000 × g for 20 min and 40,000 × g for 90 min, the resulting microsomal pellet (microsomal fraction) was separated from the supernatant (cytosolic fraction) and resuspended in approximately 1 ml of microsomal buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.6 containing 20% glycerol, 1 mM DTT and 1 mM EDTA). Cytosolic fractions were used for enzyme determinations and microsomal fractions for LPO analysis. In all cases, results were expressed in relation to the protein concentration of each subcellular fraction determined according to (Lowry et al., 1951). Catalase (CAT)

activity was measured at 240 nm ($\varepsilon = -0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in an assay mixture that contained 50 mM K-phosphate buffer pH 7.0 and 50 mM H₂O₂ (Claiborne, 1985). Glutathione peroxidase (GP) activity was measured at 340 nm ($\varepsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in an assay mixture that contained 50 mM K-phosphate buffer pH 7.0, 3.5 mM GSH, 1 mM sodium azide, 1 unit of GR and 0.12 mM NADPH. Reactions were started by adding H₂O₂, in the case of the SeGP, or cumene hydroperoxide for non-SeGP (Livingstone et al., 1992). Glutathione reductase (GR) activity was measured at 340 mn (ε = -6.22 mM⁻¹ cm⁻¹) in an assay mixture that contained 100 mM K-phosphate buffer pH 7.0, 1 mM GSSG and 0.06 mM NADPH (Ramos-Martínez et al., 1983). Superoxide dismutase (SOD) activity determinations were performed on cytosolic fractions previously passed through Sephadex G-25 columns to remove small molecules able to interfere with SOD enzymatic activity. SOD was determined at 550 nm by measuring the reduction of cytochrome c by O2*- generated by the xanthine oxidase/hypoxanthine system in an assay mixture that contained 43 mM K-phosphate buffer pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 50 μM hypoxanthine, 1.8 mU ml^{-1} xanthine oxidase, 10 µM cytochrome c and different volumes of sample (McCord and Fridovich, 1969). One unit of SOD was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of cytochrome c reduction by 50%. NAD(P)H DT-diaphorase (DTD) activity was measured at $600 \text{ nm} (\varepsilon = 21 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1})$ as the dicumarol-inhibitable portion of NAD(P)H dependent DCPIP reductase activity following the reduction of DCPIP with and without the presence of $100 \,\mu$ M dicumarol in a reaction mixture that contained 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.3 mM NADH and 40 µM DCPIP (Benson et al., 1980).

2.3.3. Lipid peroxidation (LPO)

LPO was quantified as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) at 535 nm estimating the aldehyde (malondialdehide-MDA) formed using a standard of malonaldehide bis-(dimethylacetal) (Buege and Aust, 1978).

2.4. Statistical analysis

Results of chemical (metals, PAH, PCB, DDT), biological (CI) and biochemical (antioxidant enzymes, MT and LPO) parameters were reported as mean \pm S.D. Normality of the distributions and homocedasticity of variances were tested through Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. For Cu, Pb and DDT concentrations data were log transformed to meet homocedasticity of variances. The variation of each parameter between sites was tested by oneway analysis of variance (ANOVA). When significant differences were found (p < 0.05), post hoc pair-wise comparisons between sites were done using the Student-Newman-Keuls (SNK) test to determine which values differed significantly. The existence and strength of relationships between parameters were determined by parametric Pearson bivariate correlation analysis. Two PCA analyses were performed to discriminate sampling sites according to both contaminant levels and biomarker responses: the first one using mean values of metal and organic contaminant data, the second one using mean values of biochemical, biological (CI) and environmental parameters (temperature and salinity). Statistical analyses were performed with the statistical package SPSS 11.0 and the significance level was set at α = 0.05.

3. Results

3.1. Environmental parameters and contaminant levels

Water temperature and salinity at the sampling sites and contaminant body burdens in whole soft tissues of mussel from each station are shown in Table 1. The results from ANOVA and post

emperature (1) am	IPC) ATILITIPS I		עמופו מוזט כטוונמוזוווזמו	ור הסמא התומבוו (ווופי	מוו≖ צומווממום מפעומו	1011) 111 M 11016 2011 (1122	ides of Illussels.				
Sites	Ta	Sal ^b	PCBc	DDT ^c	PAH ^c	Cu ^d	Pbd	Hg ^d	Cd ^d	Zn ^d	As ^d
Medas Islands	17.3	37.38	$15.2\pm0.9^{\rm H}$	$8.8\pm1.2^{\rm E}$	$29.7\pm3.6^{\rm F}$	$6.57\pm0.26^{\rm DE}$	$2.66\pm0.18^{\rm FEG}$	$0.11\pm0.01^{\mathrm{DE}}$	$0.80\pm0.04^{\rm E}$	$131\pm0^{\rm F}$	$82.6\pm3.0^{\text{A}}$
Barcelona	16.6	37.44	$254.1\pm9.8^{ m A}$	$86.6\pm6.4^{\rm A}$	$246.2\pm19.0^{ m A}$	$11.31\pm0.24^{\rm A}$	$9.78\pm0.62^{ m C}$	$0.20\pm0.00^{\rm BCD}$	$0.54\pm0.02^{\rm F}$	$160\pm 6^{\rm F}$	$35.9\pm0.2^{\mathrm{B}}$
Vallcarca	18.5	37.63	$224.7 \pm 13.0^{\mathrm{B}}$	$83.0\pm6.7^{ m A}$	$94.7\pm12.0^{ m D}$	$7.80\pm0.39^{\mathrm{BC}}$	$7.91\pm0.38^{ m D}$	$0.25\pm0.01^{\rm B}$	$0.36\pm0.01^{\rm GH}$	$153\pm21^{\rm F}$	$23.5 \pm 0.5^{\text{CDEF}}$
Tarragona	17.2	37.31	$50.7\pm11.5^{ m F}$	$25.5\pm1.1^{ m B}$	$215.6\pm39.4^{\mathrm{B}}$	$7.53 \pm 0.39^{\rm C}$	$1.95\pm0.12^{\rm EF}$	$0.13\pm0.01^{\mathrm{DE}}$	$0.28\pm0.01^{\rm H}$	91 ± 7^{G}	$28.1\pm14.3^{\rm CD}$
Columbretes I.	19.0	37.17	$10.9\pm1.9^{ m H}$	$8.4\pm0.5^{\rm E}$	$17.8\pm1.4^{\rm F}$	$7.48\pm0.15^{\rm C}$	$2.47\pm0.29^{\rm G}$	$0.19\pm0.03^{\rm BCD}$	$1.44\pm0.20^{\rm B}$	$148\pm18^{\rm F}$	$32.5\pm1.2^{\mathrm{BC}}$
Valencia	20.7	36.77	$113.4 \pm 15.5^{\rm C}$	$23.6\pm2.7^{\mathrm{B}}$	$83.8\pm8.8^{\rm DE}$	$8.23\pm0.21^{\rm B}$	$2.78\pm0.10^{\rm EF}$	$0.13\pm0.01^{\rm DE}$	$0.44\pm0.01^{\rm FG}$	$130\pm9^{ m F}$	$21.2 \pm 3.3^{\text{DEFG}}$
Cullera	20.3	37.02	$30.4 \pm 1.8^{ m G}$	$19.3 \pm 1.4^{ m C}$	$54.5\pm21.9^{\mathrm{EF}}$	$5.98\pm0.16^{\rm F}$	$2.38\pm0.11^{\rm FG}$	$0.10\pm0.00^{\rm E}$	$0.35\pm0.01^{\rm GH}$	$141\pm13^{\rm F}$	$25.3 \pm 0.5^{\text{CDE}}$
Portman	23.6	37.23	$9.3\pm4.4^{\rm H}$	$7.8\pm1.4^{ m E}$	$6.5\pm0.3^{ m F}$	$6.67\pm0.31^{ m DE}$	$35.50\pm3.53^{\mathrm{B}}$	$0.22\pm0.02^{\rm BC}$	$1.67\pm0.06^{\rm A}$	$243 \pm 33^{\mathrm{DE}}$	25.2 ± 0.7^{CDE}
Cartagena	24.3	37.30	$89.9\pm2.3^{ m D}$	$13.7\pm1.1^{ m D}$	65.7	$8.11\pm0.35^{\rm B}$	57.83 ± 3.37^{A}	$0.78\pm0.12^{\rm A}$	$1.58\pm0.09^{\rm A}$	$249 \pm 17^{\text{DE}}$	$23.2 \pm 0.6^{\text{CDEF}}$
Almuñecar	21.5	36.43	$9.5\pm1.0^{ m H}$	$5.6\pm1.2^{ m F}$	$30.7\pm3.8^{ m F}$	$6.58\pm0.02^{\rm DE}$	$2.86\pm0.20^{\rm EF}$	$0.10\pm0.01^{\rm E}$	$0.50\pm0.01^{\rm F}$	$227\pm17^{ m E}$	$16.2\pm0.8^{\rm EFG}$
La Herradura	21.6	36.47	$4.6\pm0.8^{\rm H}$	$5.3\pm0.7^{ m F}$	$24.8\pm14.9^{\rm F}$	$6.23\pm0.14^{\rm EF}$	$1.82\pm0.11^{\rm H}$	$0.12\pm0.01^{\rm DE}$	$1.31\pm0.02^{\rm C}$	$318\pm25^{\mathrm{B}}$	$14.8\pm0.4^{\rm FG}$
Torrox	20.1	36.18	$9.8\pm1.4^{\rm H}$	$9.7\pm1.1^{\rm E}$	$44.7\pm8.9^{ m F}$	$6.84\pm0.21^{\rm D}$	$3.28\pm0.16^{\rm E}$	$0.08\pm0.00^{\rm E}$	$0.71\pm0.04^{\rm E}$	$295\pm4^{ m BC}$	$12.9\pm0.6^{ m G}$
Fuengirola	21.3	36.43	15.9 ± 2.3^{H}	$5.0\pm0.3^{ m F}$	$28.4 \pm \mathbf{12.4^F}$	$6.75\pm0.09^{ m DE}$	$3.07\pm0.20^{\mathrm{EF}}$	$0.12\pm0.00^{\rm DE}$	$0.92\pm0.02^{\rm D}$	$431 \pm 13^{\rm A}$	$19.1\pm0.1^{ m DEFG}$
Manilva	17.1	36.86	$7.0\pm0.1^{ m H}$	$4.8\pm0.4^{\rm F}$	$21.8\pm2.9^{ m F}$	$6.26\pm0.17^{\rm EF}$	$1.90\pm0.01^{\rm H}$	$0.09\pm0.00^{\rm E}$	$0.75\pm0.03^{\mathrm{E}}$	312 ± 19^{BC}	$15.8\pm0.1^{\rm EFG}$
Algeciras 1	17.8	36.73	12.3 ± 1.2^{H}	$5.7\pm0.6^{ m F}$	$22.0\pm10.6^{\rm F}$	$6.56\pm0.18^{\rm DE}$	$2.73\pm0.09^{\rm EF}$	$0.08\pm0.01^{\rm E}$	$0.67\pm0.03^{\mathrm{E}}$	$300\pm24^{\mathrm{BC}}$	$17.8 \pm 1.5^{\rm EFG}$
Algeciras 2	23.9	34.28	$69.8\pm4.3^{\rm E}$	$14.2\pm0.2^{\mathrm{D}}$	$179.4\pm32.6^{\rm C}$	$7.96\pm0.19^{\rm BC}$	$2.67\pm0.06^{\rm EF}$	$0.15\pm0.00^{\mathrm{CDE}}$	$0.38\pm0.02^{\text{GH}}$	$274\pm26^{\mathrm{CD}}$	$13.0\pm0.9^{\rm G}$
AH data correspon	ded to musse	ls sampled at	2004 except for Port	man and Cullera tha	it corresponded to m	uussels sampled at 20	05. Data with the same	superscript indicate	ed that they did not	differ significantl	y at the 95% level

ng g⁻¹ dry weight

dry weight µgg⁻¹ (hoc analysis for pollutant concentrations are also displayed. Water temperature ranged between 16.6 °C and 24.3 °C and followed two different trends: increasing from sites located near the Straits of Gibraltar to middle area sites (Cartagena and Portman), from where it began to decrease towards northern sites. Salinity ranged between 34.28 and 37.63 psu and followed a continuous increasing trend from south-western towards north-eastern sites.

The highest PCB concentrations were found at Barcelona and Vallcarca (254.1 and 224.7 ng g⁻¹ dw, respectively) followed by Tarragona, Valencia, Cullera, Cartagena and Algeciras 2, whose mean values ranged from 30.4 to 113.4 ng g⁻¹ dw, all of these concentrations being significantly higher than at the remaining stations. A similar trend was observed for DDT, with significantly higher levels at Barcelona and Vallcarca (86.6 and 83.0 ngg^{-1} dw, respectively) than at the remaining sites. Also Tarragona, Valencia, Cullera, Cartagena and Algeciras 2 (25.5 to 13.7 ng g⁻¹ dw) displayed significantly higher DDT values than the remaining sites. With regard to PAH, significantly higher values than at the remaining sites were meaured in samples collected near ports, such as Barcelona, Tarragona and Algeciras 2 (from 179.4 to 246.2 ngg^{-1} dw). On the contrary, significantly lower PAH concentrations were found in mussels from Medas Islands, Columbretes Islands, Cullera, Portman, Almuñecar, La Herradura, Torrox, Fuengirola, Manilva and Algeciras 1. Thus, the highest concentrations of organic pollutants were found in mussel populations sampled near the main urban and industrial areas on the Spanish Mediterranean coast.

In relation to metals, mussels from Cartagena and Portman showed significantly higher concentrations of Pb, Cd and Hg than mussels from the other sites, due to the high bioavailability of the metals in the Portman Bay area (SE Spain) as a result of the extractive mining activities performed during the second half of the 20th century (Benedicto et al., 2008). It should be noted that Pb levels detected in mussels from Cartagena and Portman were extremely high (57.8 and $35.5 \,\mu g g^{-1}$ dw, respectively), followed by those found at Barcelona and Vallcarca (9.8 and $7.9 \,\mu g \, g^{-1}$ dw, respectively), which were also significantly higher than the levels found at the remaining sites. Cu displayed relatively constant concentrations with less than a two-fold increase, although its levels were significantly higher at Barcelona, Vallcarca, Tarragona, Columbretes Islands, Valencia, Cartagena and Algeciras 2 (from 11.3 to 7.5 $\mu g\,g^{-1}$ dw) than at the remaining sites. Zn levels revealed two different ranges relating to the geographical location of the sampling sites: from 91 to 160 μ g g⁻¹ in northern sites and from 243 to 318 μ g g⁻¹ in the southern sites. There was a significant difference in Zn levels between the sites in each group. On the contrary, As levels increased from southern (approximately $15\,\mu g\,g^{-1})$ towards northern sites, with the highest As concentration (p < 0.05) found at Medas Islands $(82.6 \,\mu g \, g^{-1} \, dw)$. High As levels were also detected at Barcelona and Columbretes Islands (35.9 and 32.5 $\mu g g^{-1}$ dw, respectively).

3.2. Biochemical and physiological responses

Mean values (\pm SD) of CI and biochemical parameters evaluated, together with ANOVA and post hoc analysis results, are shown in Figs. 2 and 3. All the parameters evaluated revealed significant statistical differences between each other (ANOVA *F*-Test, *p* < 0.05), although some of them, such as MT, DTD or LPO, did not show a strong capacity for discrimination. In fact, significant differences in these responses were only found between Barcelona-Valencia-Portman and Torrox in the case of MT; between Cullera-Fuengirola and Tarragona in the case of DTD; and between Fuengirola and Algeciras 2 in the case of LPO. Significantly higher values of CI were found at Tarragona and Cullera than at the remaining sites (0.15 and 0.14, respectively), and to a lesser extent at Cartagena (0.13). On the other hand, sites such as Medas Islands, Columbretes Islands, Portman, La Herradura and Fuengirola dis-

played CI values lower than 0.08, which were significantly lower than those found at Vallcarca, Tarragona, Valencia, Cullera and Cartagena. Significantly higher GR values were found at Cartagena and Portman (33.6 and 32.5 nmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively) than at other sites, except for La Herradura and Fuengirola (28.3 and 28.0 nmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively), which also presented significantly higher activities than the majority of the remaining sites. Significantly higher GST activities were found at Cartagena and Portman (783 and 728 nmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively) and, to a lesser extent, at Columbretes Islands (545 nmol min⁻¹ mg⁻¹) than at the other sites. Cartagena displayed significantly higher SeGP activity (23.7 nmol min⁻¹ mg⁻¹) than the remaining sites, except for Portman, whose SeGP level (18.3 nmol min⁻¹ mg⁻¹) was significantly higher than those recorded at Medas Islands, Barcelona, Valencia, Cullera, Manilva and Algeciras 1 (from 9.5 to $11.4\,nmol\,min^{-1}\,mg^{-1}$). Similarly, non-SeGP values found at Cartagena and Portman (27.1 and 26.0 nmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively) were significantly higher than those found at Medas Islands, Barcelona, Valencia, Cullera, Torrox, Manilva, Algeciras 1 and Algeciras 2 (from 9.5 to 11.4 nmol min⁻¹ mg⁻¹). SOD values were significantly higher at Tarragona and Cartagena than at the remaining sites (54.6 and 58.7 U min⁻¹ mg⁻¹, respectively), whilst the SOD levels found at Vallcarca, Columbretes Islands, Cullera, La Herradura, Manilva and Algeciras 2 were significantly higher than those for Medas Islands, Barcelona, Valencia, Torrox and Algeciras 1. CAT levels were significantly higher at Valencia and Cartagena (55.1 and 57.5 $\mu mol\,min^{-1}\,mg^{-1},$ respectively) than at Columbretes Islands, Almuñecar, La Herradura, Torrox and Algeciras 1 (from 32.1 to 38.2 $\mu mol\,min^{-1}\,mg^{-1}$).

3.3. Relationship between chemical and biochemical parameters

Results from the correlation analyses are shown in Table 2. With regard to metals, SeGP, non-SeGP, GR and GST displayed positive correlations with Hg, Cd and Pb levels, while SOD and CAT activities correlated positively to Hg content. CAT activity also correlated positively to PAH concentrations. Glutathione-dependent enzymes (SeGP, non-SeGP, GR and GST) showed positive intercorrelation, while SOD correlated to SeGP and non-SeGP. LPO levels were inversely correlated to CAT activity and CI levels. In the case of environmental variables, temperature was significantly correlated to SeGP, non-SeGP, GR and DTD, whilst its correlation with GST came close to statistical significance (r = 0.45, p > 0.05). Salinity levels correlated positively to MT concentrations. Although not shown, correlation analysis showed significant correlations between organic compounds (PAH, PCB, DDT) and Cu, with an extremely strong correlation being found between PCB and DDT (r=0.96, p<0.001). Pb was also closely correlated to Hg (r=0.90, p < 0.001).

3.4. Principal component analysis

PCA1 performed on chemical data (metals, PAH, PCB and DDT) extracted three main factors which explained 84.3% of the total variance. Factor 1 (40.7% of total variance) is characterised by high loadings of PCB, DDT, Cu and PAH (0.95, 0.90, 0.89 and 0.85, respectively); Factor 2 (27.1% of total variance) by high loadings of Pb, Hg and Cd (0.96, 0.91 and 0.78, respectively); and Factor 3 (16.5% of total variance) by a high loading of As (0.92) and a low loading of Zn (-0.76). Thus, Factor 1 and Factor 2 included the most toxic organic and metallic pollutants, respectively. The presence of Cu within Factor 1 of this PCA is related to the covariance of its concentration to organic pollutant levels ($r_{Cu-PCH} = 0.77$, p < 0.001; $r_{Cu-PCB} = 0.84$, p < 0.001; $r_{Cu-DDT} = 0.75$, p < 0.001, data not shown), probably due to the carrying out of port activities at the most organically polluted sites and also to the use of Cu in vessel antifouling



B. Fernández et al. / Aquatic Toxicology 99 (2010) 186-197

Fig. 2. Antioxidant enzyme activities (GR, GST, SeGP, non-SeGP, SOD and CAT) in gills of *M. galloprovincialis* (mean \pm SD; *n*=6) collected from the 16 sampling sites. Bars labelled with the same letter are not statistically different (*p* < 0.05) tested by one-way ANOVA and SNK multiple comparison test.

paints, particularly since the banning of tributyltin (TBT) (Gipperth, 2009).

Variables with a low ability to discriminate between sites such as MT, DTD and LPO were excluded from PCA2, conducted on biochemical (SeGP, non-SeGP, GST, GR, SOD and CAT), biological (CI) and environmental (temperature and salinity) parameters. Three principal factors, which explained 83.2% of the total variance, were extracted. The first factor (43.7% of total variance) is characterised by high loadings of SeGP, GR, non-SeGP, GST and temperature (0.92, 0.89, 0.88, 0.81 and 0.74, respectively) and little contribution of SOD (0.54). Factor 2 (22.0% of total variance) is characterised by high loadings of CI, CAT and SOD (0.88, 0.82 and 0.66, respectively), whilst Factor 3 (17.5% of total variance) is defined by a high loading of salinity (0.97).

Positions assigned by each PCA to each site along the two main factor axes appear in Fig. 4 (Fig. 4A: PCA1: Factor 2 vs Factor 1; Fig. 4B: PCA2: Factor 1 vs Factor 2). In the PCA1 Cartagena and Portman were clearly differentiated from the remaining sites by their location in the positive side of Factor 2, as a result of their

high levels of Pb, Hg and Cd. A second group of sites consisting of Barcelona, Vallcarca, Tarragona, Valencia, Cartagena and Algeciras 2 were located in the positive section of Factor 1, due to their high levels of organic contaminants. On the contrary, a third group of sites with low levels of organic contaminants (Medas Islands, Columbretes Islands, Portman, Almuñecar, La Herradura, Torrox, Fuengirola and Algeciras 1) were located in the negative side of Factor 1.

These groups coincided with those obtained in PCA2, performed with biomarkers. Cartagena and Portman, two sites characterised by their high levels of metals, were clearly differentiated from the remaining sites by their location in the positive side of Factor 2, due to their high levels of glutathione-dependent enzymatic activities and temperature. The sites belonging to the second group obtained from PCA1, with the exception of Barcelona, were grouped in the positive side of the Factor 2. This axis was characterised by high CI, CAT and SOD loadings. On the contrary, a third group of sites (Medas Islands, Columbretes Islands, Portman, Almuñecar, La Herradura, Torrox, Fuengirola and Algeciras 1) were located in the negative

191

B. Fernández et al. / Aquatic Toxicology 99 (2010) 186–197



Fig. 3. Condition Index (CI), metallothionein content (MT), DT-diaphorase (DTD) and lipid peroxidation (LPO) (mean \pm SD; CI: n = 12, rest: n = 6). Bars labelled with the same letter are not statistically different (p < 0.05) tested by one-way ANOVA and SNK multiple comparison test.

Table 2

192

Pearson correlation coefficients among the different biological (CI), biochemical (MT, CAT, SOD, nonGP, SeGP, GR, DTD, GST, LPO), chemical (Hg, Cd, Cu, Zn, Pb, As, PAH, PCB, DDT) and environmental (*T*, Sal) variables tested across sites (*n* = 16).

	IC	MT	CAT	SOD	Non-SeGP	SeGP	GR	DTD	GST	LPO
MT	0.04									
CAT	0.50*	0.03								
SOD	0.44	-0.20	0.47							
Non-SeGP	0.19	0.30	0.25	0.68**						
SeGP	0.07	0.06	0.27	0.62*	0.87***					
GR	-0.21	0.16	0.09	0.36	0.65**	0.80***				
DTD	-0.05	-0.02	0.12	-0.10	-0.07	0.08	0.44			
GST	0.10	0.49	0.12	0.44	0.72**	0.68**	0.57*	0.10		
LPO	- 0.53 *	0.19	- 0.72 **	-0.25	0.12	0.17	0.30	-0.18	0.12	
Hg	0.28	0.23	0.50*	0.57*	0.61*	0.75**	0.51*	0.09	0.74**	-0.15
Cd	-0.46	0.21	-0.20	0.22	0.51*	0.62*	0.70**	0.20	0.77***	0.42
Pb	0.18	0.34	0.37	0.45	0.67**	0.79***	0.69**	0.20	0.86***	-0.03
Cu	0.16	0.35	0.39	-0.14	-0.01	0.06	-0.23	-0.12	0.08	-0.16
Zn	- 0.53 *	-0.41	-0.15	-0.01	-0.01	0.29	0.60*	0.48	-0.15	0.33
As	-0.14	0.24	-0.10	-0.30	-0.25	-0.27	-0.31	-0.37	0.08	0.12
PAH	0.45	0.01	0.50*	0.10	-0.01	-0.02	-0.42	-0.24	-0.22	-0.38
PCB	0.32	0.46	0.47	-0.12	-0.02	-0.06	-0.27	-0.10	-0.04	-0.25
DDT	0.30	0.43	0.29	-0.17	-0.09	-0.18	-0.37	-0.18	-0.11	-0.12
Т	-0.05	0.03	0.26	0.34	0.59*	0.64**	0.71**	0.57*	0.45	-0.22
Sal	0.24	0.54*	-0.10	0.02	0.16	0.03	-0.03	-0.33	0.44	0.36
								*		

Numbers in bold indicate significant correlations. Asteriks indicate the signification of the correlations: *0.05 level, **0.01 level, (2-tailed).

side of Factor 2 due to their low levels of CI, CAT and SOD. This group of sampling sites was similar to the third group obtained in the PCA 1, characterised by low levels of organic pollutants, with the exceptions of Cullera and Manilva.

Only three sites were classified by the PCA based on biomarker response in a different position to that which could have been expected in accordance with their pollutant bioaccumulations: Cullera, Manilva and Barcelona.

Factor 3 axes were not depicted as As and Zn concentrations (PCA1) and salinity levels (PCA2) were not related to any biological response, and mainly offered a geographical classification of the study sites along a decreasing (T, Zn)/increasing (Sal, As) gradient of these variables from south-eastern towards north-western sites.

4. Discussion

This study evaluates oxidative stress in wild mussels from the Spanish Mediterranean coast, where previous data from the chemical monitoring indicated the presence of different pollutants as a possible source of oxidative stress in locations with a high degree of human impact (Benedicto et al., 2003, 2004; Campillo et al., 2003, 2004).

B. Fernández et al. / Aquatic Toxicology 99 (2010) 186-197



Fig. 4. Score plots (PCA) based on mean values of A: chemical (Factor 2 vs Factor 1) and B: biolochemical, biological and environmental variables (Factor 1 vs Factor 2) in the mussel populations studied.

It is known that the exposure of aquatic organisms to metals may increase ROS generation, which can lead to an imbalance in antioxidant defences, enhance oxidative stress and generate LPO, as has been reported in M. galloprovincialis after exposure to sublethal concentrations of Cu, Cd, Pb and Fe (Almeida et al., 2004; Vlahogianni and Valavanidis, 2007). Significantly positive correlations found in this study between glutathione-related enzymatic activities (SeGP, non-SeGP, GR and GST) and metal concentrations (Pb, Hg and Cd) suggest that antioxidant enzymes increase in response to a rise in ROS generation due to a high bioavailability of these metals in the marine environment. In fact, Cartagena and Portman, the most metal-polluted sites, were also characterised by significantly higher levels of GR and GST than the majority of the remaining sites (Fig. 2). These antioxidant responses would therefore seem to constitute a specific adaptation in gills to prevent and/or repair metal-induced damage in cellular components, as no signs of LPO appeared either at Cartagena or at Portman (p > 0.05). The induced antioxidant response recorded at these sites may indicate the existence of metal-induced oxidative stress. This is in agreement with the response found by Martínez-Gómez et al. (2008) in haemocytes of mussels from the same area after applying the lysosomal membrane stability (LMS) test. In that study Cartagena and Portman displayed the lowest LMS (lowest dye retention capacity) in relation to high metal (Pb and Hg) bioaccumulation, indicating the potential of metals to destabilise lysosomal membranes.

GSH plays a central role in detoxifying ROS and also participates in the metabolism and detoxification of endogenous and exogenous substances (Yan et al., 1997). GR enzyme, which catalyses the reduction of oxidised glutathione (GSSG), is therefore essential for the maintenance of the GSH/GSSG ratio and the cellular redox status, protecting cells against oxidative damage (Box et al., 2007). Positive correlations found between GR and Hg, Cd, Pb and Zn concentrations (Table 2) may reflect an increase in the capacity of recycling GSH and protecting against metal toxicity in mussels from areas affected by metal pollution, as Verlecar et al. (2008) have already reported in Perna viridis exposed to Hg. In addition, correlations found between GR and the remaining glutathione-related enzyme activities (SeGP, non-SeGP and GST) may indicate a coordinated enzymatic regulation of these enzymes in gill tissues in order to restore the GSH pool and permit an efficient antioxidant response. On the contrary, GR inhibition in gills by exposure to metals may lead to GSH depletion and a diminished ability to protect cells from oxidative damage (Almeida et al., 2004).

The GST enzyme has been suggested as a useful index for conjugating activities and exposure to organic pollution in mussels (Fitzpatrick and Sheehan, 1993). Although some field studies have reported a good response of GST in mussels exposed to organic compounds (Moreira and Guilhermino, 2005; Rocher et al., 2006), others have detected little or no GST response (Fitzpatrick et al., 1997; De Luca-Abbott et al., 2005). In the present work no significant correlations were found between GST and organic pollutants. However, significant correlations were detected between GST and metal (Hg, Cd and Pb) concentrations, as other studies have also reported for M. galloprovincialis (Canesi et al., 1999; Khessiba et al., 2001; Vidal-Liñán et al., 2010). Although metals are not natural substrata for these enzymes, positive correlation and significantly higher activities found in mussels from Cartagena, Portman and Columbretes Islands (Fig. 3) where the levels of Cd were significantly higher than at the remaining sampling sites (Table 1), suggest that the increased GST activity in gill tissues was a response to the oxidative stress produced by exposure to metals, since GST also presents peroxidase activity. Moreover, the high GST activity in gills may also compensate for the low CAT activity levels found in this organ, as has been suggested by Lima et al. (2007). In a similar way to GST, GPs (SeGP and non-SeGP) also seemed to constitute a response in gills against metal bioaccumulation. Thus, non-SeGP and SeGP values were significantly higher at Cartagena and Portman than at sites where low levels of metals were found, such as Medas Islands, Barcelona, Valencia, Cullera, Manilva and Algeciras 1 (Fig. 2). These results are in accordance with previous studies carried out with P. viridis (Verlecar et al., 2008) and Bathymodiolus azoricus (Bebianno et al., 2005), which also demonstrated higher GP activity levels in mussels as a response to heavy metal exposure.

The SOD enzyme constitutes a primary defence against oxygen toxicity by catalysing the conversion of superoxide anion to oxygen and hydrogen peroxide, which can be sequentially removed by CAT or by the GSH-dependent pathway through GPs (Manduzio et al., 2005). The positive correlation detected between SOD and GPs indicates that GPs are an important pathway of hydrogen peroxide degradation and that the coordinated action of both enzymes acts against the oxidative attack induced by this compound. Other field studies have demonstrated a similar relationship in gills of B. azoricus, where SOD and GPs were the main antioxidant mechanisms (Bebianno et al., 2005), or in M. galloprovincialis from the Adriatic Sea, where a high level of SOD activity was accompanied by elevated GP and GR enzymatic activities (Borkovic et al., 2005). In addition, the positive correlation found in this work between SOD and Hg levels may indicate that its response is linked to metal bioaccumulation. Nevertheless, the appearance of significantly higher SOD levels (p < 0.05) than at other sites in Tarragona and Cartagena, where high levels of organic contaminants were detected (particularly PAH content at Tarragona), also suggests that this enzyme is involved in the protection against organic pollution.

In contrast to the response of the GSH-dependent enzymes, CAT was positively correlated to PAH and almost to PCB (r=0.47, p=0.06). Indeed, PCBs and PAHs are known to generate ROS after undergoing metabolisation processes (Livingstone, 2001). These results suggests that CAT reflects the spatial bioavailability of organic contaminants. Nevertheless, of those sites characterised by high PCB and PAH levels, only Valencia and Cartagena showed significantly higher CAT levels than the sites with low levels of organic pollution (Columbretes Islands, Almuñecar, La Herradura, Torrox and Algeciras 1). Our results agree with other field studies that have demonstrated significant correlations between PAH and PCB accumulation and CAT activity in mussels (Cheung et al., 2001; De Luca-Abbott et al., 2005) and an increase in CAT in *M. edulis* and *P. viridis* exposed to PAHs and PCBs under laboratory conditions (Krishnakumar et al., 1997; Richardson et al., 2008).

In this study PCA analyses were performed to obtain a global vision of the results according to the mean values of pollutant levels and biomarker responses. The two PCA analyses performed on biochemical and chemical values, respectively, produced similar groupings of the sites included in this study, i.e. the sites with the highest concentrations of organic pollutants were characterised by having the highest CAT, SOD and CI levels, whilst those sites showing the greatest accumulations of Cd, Hg and Pb were grouped along the PCA axis defined by the response of antioxidant enzymes dependent on GSH and temperature. These results may indicate that the PCA performed using the biochemical responses and biotic and environmental factors (PCA2) enables sites to be classified in line with pollution-mediated ROS formation. However, the multivariate analysis based on biochemical responses failed to classify mussels from Barcelona in the group of sites with high CAT, SOD and CI, as might have been expected given its high levels of PAH, PCB and DDT. In fact, SOD and CAT levels at this site were not significantly different from those at sites with low organic pollutant levels, such as Medas Islands, Torrox or Algeciras 1.

The response of antioxidant enzymes such as CAT in a gradient of pollution has been reported to display a bell-shaped profile, which increases until it reaches higher levels of cellular stress, when protein synthesis is overwhelmed by catabolism and enzyme inhibition prevails. In such conditions, these parameters are no longer useful to describe contaminant-induced stress and may show values comparable to or even lower than controls (Dagnino et al., 2007: Winston and Di Giulio, 1991). This enzymatic behaviour could explain the lack of increase in CAT and SOD activities at Barcelona in comparison with the other organically polluted sites. In agreement with these results, previous field studies have described an absence of antioxidant enzymatic response in chronically polluted populations of mussels (Regoli, 1998; Lionetto et al. 2003). In contrast, Cullera and Manilva showed the existence of oxidative stress despite their grouping with low organically polluted sites by PCA1 (Fig. 4). We could hypothesise that mussels may have been exposed to some other substances, not included within the scope of this study, capable of generating oxidative stress, in particular at Cullera, where agricultural activities take place on an intensive scale (Cupul-Magaña et al., 2006).

In the PCA analysis arsenic concentrations were not related to any of the biomarkers of oxidative stress. In fact, at Islas Medas, the site which displayed significantly higher levels of As than all the others, LPO, GR, GP, GST, SOD and CAT levels were significantly lower than those found at the majority of sampling sites. High arsenic levels detected in mussels from northern sites seem to be due to natural sources of this metal from stream sediments in the eastern Pyrenees and stream waters in south-west France, near the border with Spain (De Vos and Tarvainen, 2006). It is known that arsenic in seawater predominantly occurs as the inorganic forms arsenate and arsenite (Francesconi and Edmonds, 1993), which are more toxic than organic forms to living organisms due to their high affinity for the sulfhydryl groups, lipoic acid and enzymes (Aposhian and Aposhian, 2006) and may inhibit the activities of enzymes such as GR and GPs, increase the production of ROS and induce lipid peroxidation (Flora, 1999; Wang et al., 1997). Nevertheless, the fact that marine animals such as mussels mainly bioaccumulate this metal in the non-toxic forms of organoarsenic compounds, particularly arsenobetaine (Neff, 1997), may explain the absence of either oxidative stress or peroxidative damage in mussels from Medas Islands.

Cl is a parameter that is strongly related to the bioavailability of food resources. The fact that significantly higher values for Cl than at the majority of stations were found in sites close to urban (Tarragona, Cullera, Cartagena and Valencia) and agricultural (Cullera) areas was probably due to the large amounts of waterborne nutrients available as a result of the human activities carried out in these places. In addition, the slight but significant relationship detected between Cl and CAT (r = 0.50, p = 0.047), reflected in their inclusion within the Factor 2 axis of PCA2 (Fig. 4B), suggests an enhanced cellular ROS generation due to a high level of physiological activity and oxygen consumption in mussels from areas with a high supply of nutrients in water, where CAT seems to develop a protection mechanism.

MTs play an important role in the detoxification of metals, and also as ROS scavengers (Viarengo et al. 2000). Although several studies with mussels have demonstrated positive correlations between MT measured in gills and metal content (Bebianno and Serafim, 1998; Dragun et al., 2004), our results showed little difference in gill MT levels between sites and no relationship between them and metal concentrations, and are thus apparently unable to indicate oxidative stress or exposure to metals in this tissue. This may be related to the fact that, in contrast to gill tissue, there are higher MT concentrations in digestive gland than in gills and that the digestive gland is the main organ for MT induction and accumulation in mussels (Amiard et al., 1998). In addition, the slight but significant correlation detected between MT and salinity levels may indicate that its response is more related to this environmental factor than to pollutant exposure. Similar results were found for DTD, whose levels showed no significant difference between sites and were unrelated to either organic or metallic pollution, but slightly related to temperature.

In view of the fact that mussels, due to their sessile condition and filter feeding habits, are particularly sensitive to changes in environmental variables such as temperature and salinity, we sought to determine whether the variability in the biochemical responses evaluated was influenced by temperature and salinity.

Salinity is an environmental factor whose fluctuation between different regions has been suggested to be able to influence the capacity of mussels to handle oxidative stress (Prevodnik et al., 2007) and also to alter biochemical responses under hyposaline stress in *M. galloprovincialis* (Hamer et al., 2008). Nevertheless, the range of salinity variation detected in our study area seems to be insufficient to elicit any disturbance in the biochemical responses evaluated.

Concerning temperature, several significant positive correlations were noticed with antioxidant enzymes (non-SeGP, SeGP, GR and DTD) (Table 2). In addition, the first axis of PCA2 relates most of the antioxidant enzymes evaluated to temperature (Fig. 4B). Mussel physiology and metabolism are known to increase with temperature (from approximately 5 to 20-24 °C) until reaching a temperature where they become constant (24 °C), decrease (27 °C) and finally cease (35 °C) (Anestis et al., 2007; Rajagopal et al., 2005). In fact, once temperature exceeds the limit of upper thermal tolerance, which in the case of *M. galloprovincialis* has been established at 29–31 °C (Massé and Parache, 1984; Riva and Masse, 1983), References

a progressive decrease in whole-organism aerobic scope due to a mismatch between oxygen supply and demand will end in a transition to anaerobic metabolism (Pörtner, 2002). The relationships found in the present work between antioxidant enzymatic activities and water temperature suggested a temperature-related response of antioxidant enzymes. Although temperatures recorded in this study could not be regarded as constitutive of thermal stress, differences of more than 7 °C in water temperature between sites may stimulate an increase in respiration, metabolic rate and tissue oxygen consumption, and thus a higher level of ROS generation. This could be expected at Cartagena (24.3 $^{\circ}$ C), Algeciras 2 (23.9 $^{\circ}$ C) and Portman (23.6 °C). To counteract this additional generation of ROS antioxidant defences will be activated (Kong et al., 2008), although if the thermal stress is excessive, antioxidant enzymes could be depleted and become unable to prevent LPO (Abele et al., 2002). Thus, the oxidative stress detected at Cartagena and Portman may reflect a synergistic effect of both metal exposure and temperature, as has previously been reported in mussels (Verlecar et al., 2007) and oysters (Lanning et al., 2006) exposed to a combination of high temperatures and metals. In addition, it has to be taken into account that the relationship detected between water temperature and antioxidant responses in gills is probably related to the fact that gill epythelium is in direct contact with water, and hence highly sensitive to its fluctuations. Indeed, gills are more susceptible to changes in environmental parameters and more prone to oxidative stress than other tissues, this also implying that antioxidant mechanisms have to be more rapid and efficient in this tissue than in others (Regoli and Principato, 1995).

The distribution of contaminants in mussel organs is known to vary as a result of differences in the surfaces in contact with contaminants, the differing affinities of pollutants to binding sites and the different rates of accumulation and excretion of pollutants between tissues (Yap et al., 2008). In this context, gills are the first place of contact of potential contaminants (Almeida et al., 2005; Doyotte et al., 1997; Regoli and Principato, 1995). In fact, it has been reported in mussels that metals such as Cu, Hg, Cd and Pb accumulate more rapidly and to a greater extent in gills than in tissues such as mantle, muscle or digestive gland (Canesi et al., 1999; Dragun et al., 2004; Marigómez et al., 2002), while digestive gland and mantle tissues accumulate higher levels of polyunsaturated fatty acids and organic pollutants than gills (Almeida et al., 2003; Canova et al., 1998). Although we have no data regarding the specific bioaccumulation of pollutants in gills, the responses of GR, GPs and GST in this tissue towards whole soft tissue bioaccumulation of metals suggest that they are the first line of defence against oxygen radicals in gills and may reflect an adaptation to exposure to high levels of metals. On the contrary, CAT and SOD responses in gill tissues appear to bear a relationship to the oxidative stress caused by organic pollutants. Thus, we can conclude that the use of a battery of oxidative stress biomarkers enables the impact of the main chemical contaminants along the Spanish Mediterranean coast to be established. In addition, some of the biochemical responses studied may be affected by environmental and physiological factors, indicating that these parameters should be integrated in monitoring studies and marine environmental quality assessment for the correct application and interpretation of the biomarkers studied.

Acknowledgements

The authors wish to thank the technical personnel from the Centro Oceanográfico de Murcia for their assistance. This study was funded by the Spanish Institute of Oceanography (IEO) through the project BIOMEJIMED III and a pre-doctoral fellowship for research personnel formation granted to Beatriz Fernández Galindo (2000–2004).

- Abele, D., Heise, K., Portner, H.O., Puntarulo, S., 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. J. Exp. Biol. 205, 1831–1841.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Loureiro, A.P.M., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2003. DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 270–275.
- Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bainy, A.C.D., de Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. Mar. Pollut. Bull. 49, 386–392.
- Almeida, E.A., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., Gomes, O.F., Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 318, 21–30.
- Amiard, J.C., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., 1998. Metallothioneins in mussels Mytilus edulis as a biomarker of metallic pollution: variability between sites, season and organs. J. Rech. Oceanogr. 23, 25–30.
- Amiard, 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.
- Anestis, A., Lazou, A., Portner, H.O., Michaelidis, B., 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. Am. J. Physiol. 293, R911–R921.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M., 2006. Arsenic toxicology: five questions. Chem. Res. Toxicol. 19, 1–15.
- Bebianno, M.J., Serafim, M.A., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Sci. Total Environ. 214, 123–131.
- Bebianno, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Aquat. Toxicol. 75, 354–373.
- Benedicto, J., Rodríguez, C., Martínez-Gómez, C., Guerrero, J., Jornet, A., 2003. Distribución espacial y tendencias temporales de los niveles de metales traza en el litoral de Andalucía utilizando mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819, como organismo indicador: 1991–2003. Boletín del Instituto Español de Oceanografía 19, 1–4.
- Benedicto, J., Rodríguez, C., Martínez-Gómez, C., Guerrero, J., Jornet, A., 2004. Temporal trends of trace metals in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Iberian coast (north-western Mediterranean), 1991–2002. Rapp. Comm. Int Mer. Medit., 37. ISSN: 0373-434-X.
- Benedicto, J., Martínez-Gómez, C., Guerrero, J., Jornet, A., 2008. Metal contamination in Portman bay (Murcia, SE Spain) 15 years after the cessation of mining activities. Cienc. Mar. 34, 389–398.
- Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P., 1980. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcenogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 5216–5220.
- Borkovic, S.S., Saponjic, J.S., Pavlovic, S.Z., Blagojevic, D.P., Milosevic, S.M., Kovacevic, T.B., Radojicic, R.M., Spasic, M.B., Zikic, R.V., Saicic, Z.S., 2005. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea. Comp. Biochem. Physiol. C 141, 366–374.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol. C 146, 531–539.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleicher, S., Parker, L. (Eds.), Methods in Enzymology, vol. 52. Academic Press, New York, pp. 302–310.
- Cadenas, E., 1995. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. Biochem. Pharmacol. 49, 127–140.
 Campillo, J., Benedicto, J., Fernández, B., Martínez-Gómez, C., 2003. Distribution of organochlorine compounds in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the
- Berlan Mediterranean coast. 5th Iberlan and 2nd Ibero-American Congress on Environmental Contamination and Toxicology (CICTA), Porto (Portugal), 22–24 September 2003 (Abstract book, p. 85).
- Campillo, J., Franco, M., Martínez, F., Benedicto, J., 2004. Comparison of organic contaminant levels in mussels from the Mediterranean coast of Spain (Western Mediterranean) collected in 1993 and 2001. 37th CIESM Congress, Barcelona (Spain), 7–11 June 2004. Rapp. Comm. Int. Mer Medit., 37: 177. ISSN: 0373-434X.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. Aquat. Toxicol. 46, 67–76.
- Canova, S., Degan, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., Voltan, R., Venier, P., 1998. Tissue dose. DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. Mutat. Res. 399, 17–30.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat. Toxicol. 52, 189–203.
- 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.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), Handbook of Methods for Oxygen. Radical Research. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 283–284. Cupul-Magaña, L.A., Mosso-Aranda, C., Sierra, J.P., Marti, E., Ferman-Almada, J.L.,
- Cupul-Magaña, L.A., Mosso-Aranda, C., Sierra, J.P., Marti, E., Ferman-Almada, J.L., Rodilla, M., González del Río, J., Sánchez-Arcilla, A., 2006. Characterization and

B. Fernández et al. / Aquatic Toxicology 99 (2010) 186-197

distribution patterns of surficial sediments of Cullera Bay, Spain. Cienc. Mar. 32, 617 - 629

- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of and expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. Biomarkers 12, 155-172.
- de la Serna Ernst, J.M., Srour, A., Roja Garay, M.P., 1999. Study on the biology and fishing of tuna and tuna like species in the Spanish and Moroccan coasts of the Mediterranean Sea and the area under the influence of the strait of Gibraltar. FAO-COPEMED "Gibraltar 98" Final Report.
- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (Perna viridis) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 51, 694–707.
- De Vos, W., Tarvainen, T., 2006. Arsenic. In: Salminen, R. (Ed.), Geochemical Atlas of Europe. Part 2. Interpretation of Geochemical Maps, Additional Tables, Figures, Maps, and Related Publications., Geological Survey of Finland, Espoo. http://www.gtk.fi/publ/foregsatlas/.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vasseur, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve Unio tumidus. Aquat. Toxicol. 39, 93–110.
- Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B., Ivankovic, D., Pavicic, J., 2004. Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels Mytilus galloprovincialis Lmk. Environ. Int. 30, 1019-1025.
- Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., 1993. Separation of multiple forms of glutathione S-transferase from the blue mussel, *Mytilus edulis*. Xenobiotica 23, 851–861.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of Mytilus edulis (L.), as potential organic pollution biomarkers. Biomarkers 2, 51-56.
- Flora, S.J., 1999. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 26, 865-869.
- Francesconi, K.A., Edmonds, I.S., 1993, Arsenic in the sea, In: Ansell, A.D., Gibson, R.N., Barnes, M. (Eds.), Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, vol. 31, pp. 111–151.
- Fusco, G., Manzella, G.M.R., Cruzado, A., Gacic, M., Gasparini, G.P., Kovacevic, V., Millot, C., Tziavos, C., Velasquez, Z.R., Walne, A., Zervakis, V., Zodiatis, G., 2003. Variability of mesoscale features in the Mediterranean Sea from XBT data analysis. Ann. Geophys. 21, 21-32.
- Gipperth, L., 2009. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: direct and indirect effects. J. Environ. Manage. 90, 86-95
- Goldberg, E., 1986. The mussel watch concept. Environ. Monit. Assess. 7, 91-103. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition met-

als and disease. Biochem. J. 219, 1–14. Hamer, B., Jaksic, Z., Pavicic-Hamer, D., Perik, L., Medakovic, D., Ivankovic, D., Pavi-

- cic, J., Zilberberg, C., Schröred, H.C., Müller, W.E.G., Smodlaka, N., Batel, R., 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels Mytilus galloprovincialis on biological parameters used for pollution assessment. Aquat. Toxicol. 89, 137-151.
- Hansen, R.E., Roth, D., Winther, J.R., 2009. Quantifying the global cellular thioldisulfide status. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 422-427
- ICES, 2007. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants
- (WCBEC), Alessandria, Italy, 19–23 March 2007. Rep. CM 2007/MHC:03. Khessiba, A., Hoarau, P., Gnassia, B., Aissa, P., Romeo, M., 2001. Biochemical response of the mussel Mytilus galloprovincialis from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 222-229.
- Kong, X.H., Wang, G.Z., Li, S.J., 2008. Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab Scylla serrata (Crustacea, Decapoda). Mar. Biol. 154. 269-276.
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Varanasi, U., 1997. Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs. Comp. Biochem. Physiol. C 118, 11–18.
- Lanning, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters. Crassostrea virginica: pollution reduces temperature tolerance in oysters. Aquat. Toxicol. 79, 278-287.
- Lima, I., Moreira, S.M., Osten, J.R., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2007. Biochemical responses of the marine mussel Mytilus galloprovincialis to petrochemical environmental contamination along the North-western coast of Portugal. Chemosphere 66, 1230-1242.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello. M.F., Marinosci. L., Schettino. T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in Mytilus galloprovincialis and Mullus barbatus in an Italian coastal marine area. Mar. Pollut. Bull. 46, 324–330.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42, 656-666
- Livingstone, D.R., Lips, F., Garcia, M.P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel Mytilus edulis. Mar. Biol. 112, 265-276. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement
- with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275. Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. ISJ 2, 91-104.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., Giamberini, L., 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microsc, Res. Tech. 56, 358-392.

- Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., Campillo, J.A., Moore, M., 2008. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. J. Environ. Monit. 10, 490-499.
- Massé, H., Parache, A., 1984. Évolution de la tolérance thermique de Mytilus galloprovincialis Lamarck en fonction des températures saisonnières: comparaison de la sensibilité thermique d'individus provenant de populations différentes. Haliotis 14, 111-118.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.
- Moreira, S.M., Guilhermino, L., 2005. The use of Mytilus galloprovincialis acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese Coast. Environ. Monit. Assess. 105, 309-325.
- Neff, J.M., 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. Environ. Toxicol. Chem. 16, 917-927.
- Pérez-Camacho, A., Labarta, U., Beiras, R., 1995. Growth of mussels (Mytilus edulis galloprovincialis) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. Aquaculture 138, 349-362.
- Pörtner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comp. Biochem. Physiol. A 132, 739-761.
- Prevodnik, A., Gardeström, J., Lilja, K., Elfwing, T., McDonagh, B., Petrovic, N., Tedengren, M., Sheehan, D., Bollner, T., 2007. Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. Aquat. Toxicol. 82, 63–71.
- Prohaska, J.R., 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione Stransferases. Biochim. Biophys. Acta 611, 87–98. Quasimeme II, 2003. QUASIMEME Laboratory Performance Studies. Round 34, Exer-
- cise 586. Sample OTM060BT.
- Quasimeme II, 2004. QUASIMEME Laboratory Performance Studies. Round 36 and 38, Exercises 603 and 636, Samples QOR078BT, QOR078BT, QOR078BT and OOR078BT
- Quasimeme II, 2006. QUASIMEME Laboratory Performance Studies. Round 44, Exercise 705, Samples QPH041BT and QPH042BT; Round 46, exercise 728, Samples QPH043BT and QPH044BT.
- Rajagopal, S., Van der Gaag, M., Van de Velde, G., Jenner, H.A., 2005. Upper temperature tolerances of exotic brackish-water mussel. Mytilopsis leueophaeata (Conrad): an experimental study. Mar. Environ. Res. 60, 512-530.
- Ramos-Martínez, J.I., Rodríguez-Bartolomé, T., Vázquez-Pernas, R., 1983. Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of Mytilus edulis L. Comp. Biochem. Physiol. B 75, 689-692.
- Regoli, F., 1998. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 34, 48-63.
- 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.
- Richardson, B.J., Mak, E., Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (Perna viridis): do mussels "integrate" biomarker responses? Mar. Pollut. Bull. 57, 503-514.
- Riva, A., Masse, H., 1983. Etude ecophysiologique de quelques mollusques bivalves. Bases biologiques de l'Aquaculture. Act Colloques. Montpellier 1, 45-62.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., Andre, V., Lebailly, P., Cachot, J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. Aquat. Toxicol. 79, 65-77.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. C 123, 193 - 199
- Thain, I.E., Vethaak, A.D., Hvlland, K., 2008, Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. ICES J. Mar. Sci. 65, 1508-1514.
- UNEP/RAMOGE, 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. Edited by UNEP. Athens, pp. 1–88. Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007. Biochemical markers of oxidative
- stress in Perna viridis exposed to mercury and temperature. Chem.-Biol. Interact. 167, 219-226.
- Verlecar, X.N., Iena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of Perna viridis (L.), on mercury exposures. Chemosphere 71, 1977-1985.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothionein: a comparative overview. Cell. Mol. Biol. 46, 407-417.
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Campillo, J.A., Beiras, R., 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). Chemosphere 78, 265-272
- Vlahogianni, T.H., Valavanidis, A., 2007. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels Mytilus galloprovincialis. Chem. Ecol. 23, 361-371
- Wang, T.S., Shu, Y.F., Liu, Y.C., Jan, K.Y., Huang, H., 1997. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenic. Toxicology 121, 229-237.
- Widdows, J., 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of Mytilus edulis. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 58, 109-124.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137–161.
Yan, T., Teo, L.H., Sin, Y.M., 1997. Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 845–850.

Yap, C.K., Hatta, Y., Edward, F.B., Tan, S.G., 2008. Distribution of heavy metal con-centrations (Cd, Cu, Ni, Fe and Zn) in the different soft tissues and shells of wild mussels *Perna viridis* collected from Bagan Tiang and Kuala Kedah. Malays. Appl. Biol. 37, 1–10.

RECAPITULACIÓN:

En este Capítulo se han determinado las actividades enzimáticas DT-diaforasa (DTD), glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP), glutatión reductasa (GR), la concentración de metalotioneínas (MT), y la peroxidación lipídica (LPO) en branquias de mejillón procedente de 16 localizaciones de la costa mediterránea española. Se ha investigado la relación de estos biomarcadores con la acumulación de contaminantes (Hg, Cd, Pb, Zn, Cu, As, HAPs, PCBs y DDTs), el índice de condición (IC), y dos variables ambientales, la temperatura y la salinidad del agua. También se ha estudiado la respuesta integrada de estos biomarcadores y su capacidad para reflejar la contaminación ambiental a través de dos análisis de componentes principales (ACP): el primero se aplicó a los biomarcadores con mayor capacidad de discriminación (GPs, GST, GR, SOD, CAT), el índice de condición (IC), la temperatura, y la salinidad, mientras que el segundo ACP se aplicó a las concentraciones medias de contaminantes en los tejidos de mejillones de cada localización.

Los resultados de este Capítulo mostraron que las enzimas dependientes del glutatión (GPs, GR y GST) se correlacionaron con la acumulación de metales Pb, Hg y Cd en los tejidos de mejillón, lo que sugiere un aumento de la actividad antioxidante en branquias en respuesta a una mayor generación de radicales libres ocasionada por la mayor biodisponibilidad de metales en el medio marino. Los mayores niveles de estas actividades enzimáticas se detectaron en mejillones de Cartagena y Portmán, que también acumularon las mayores concentraciones de estos metales pesados en sus tejidos, en comparación con los del resto de estaciones. Estos resultados sugieren una respuesta coordinada y eficiente de estas enzimas antioxidantes frente a la toxicidad generada por la bioacumulación de metales pesados, ya que no se observaron signos de daño oxidativo (LPO) en estas poblaciones de mejillón. Además, la correlación positiva de las actividades enzimáticas GPs, GR y DTD con la temperatura del agua sugiere la capacidad de este parámetro ambiental para regular estos sistemas antioxidantes en branquias de mejillón. Así, la elevada temperatura del agua observada en Cartagena, Algeciras 2 y Portmán pudo suponer un incremento adicional al producido por los contaminantes en la generación de radicales libres en estos organismos. Por otro lado, las actividades enzimáticas SOD y CAT se correlacionaron entre sí y mostraron elevados niveles en mejillones con altas concentraciones de compuestos orgánicos (Tarragona, Valencia y Cartagena), lo que indica una acción coordinada frente al estrés oxidativo generado por esta clase de contaminantes. Las respuestas de las MT y la enzima DTD mostraron poca capacidad de discriminación de las poblaciones de mejillón estudiadas y ninguna relación con la acumulación de contaminantes metálicos u orgánicos, y parecen estar más relacionadas con los factores ambientales, salinidad (MT) y temperatura (DTD).

Los dos ACPs aplicados sobre los biomarcadores y la acumulación de contaminantes ofrecieron una ordenación de las poblaciones de mejillón estudiadas similar. Los mejillones de Cartagena y Portmán se diferenciaron del resto de poblaciones en ambos ACPs debido a sus altos niveles de enzimas antioxidantes (GST, GPs, GR y SOD) y temperatura del agua, y por su elevada bioacumulación de metales Pb, Hg y Cd. Por otro lado, los mejillones de Barcelona, Vallcarca, Tarragona, Valencia, Cartagena y Algeciras 2 fueron clasificados en un mismo grupo en ambos ACPs debido a sus elevados niveles de CAT, SOD e IC (a excepción de Barcelona, donde estas respuestas presentaron medios o bajos niveles), y su elevada acumulación de contaminantes orgánicos. La inclusión del IC junto con las actividades enzimáticas CAT y SOD en el mismo eje del ACP aplicado sobre los biomarcadores sugiere que estas enzimas actuaron como mecanismo de protección no sólo frente a la toxicidad de los compuestos orgánicos, sino también frente al aumento en la generación de EROs ocasionado por una mayor actividad fisiológica y, por tanto, un mayor consumo de oxígeno. Esto parece estar relacionado con una mayor disponibilidad de nutrientes en el medio marino para esas poblaciones de mejillón. Por el contrario, ambos ACPs clasificaron en un mismo grupo a los mejillones que presentaron bajos niveles de CAT, SOD e IC (a excepción de Cullera y Manilva), y que se caracterizaron por una baja acumulación de contaminantes en sus tejidos.

En términos generales, y con la excepción de algunas poblaciones de mejillón como las de Barcelona, Cullera, y Manilva, la aplicación de esta batería de biomarcadores en branquias permitió establecer una discriminación en función de los efectos biológicos observados bastante similar a la obtenida en función del grado de acumulación de los contaminantes analizados. Estos resultados demuestran la utilidad y capacidad de los biomarcadores estudiados en branquias como herramienta para evaluar la calidad ambiental de modo integrado a la monitorización química. Además, la aplicación e interpretación de estos biomarcadores ha de tener en cuenta la influencia sobre su respuesta de factores ambientales y biológicos.

CAPÍTULO III

Evaluación de los mecanismos de detoxificación de compuestos químicos y enzimas antioxidantes en glándula digestiva de mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, de la costa mediterránea

RESUMEN:

En este trabajo se evalúan los efectos biológicos que los principales tipos de contaminantes (metales -Hg, Cd, Pb, Zn, Cu-, As, HAPs, PCBs y DDTs) tienen en la glándula digestiva de mejillón silvestre (Mytilus galloprovincialis) procedente de la costa mediterránea española. Para ello se han determinado las actividades enzimáticas benzo[a]pireno hidroxilasa (BPH), DT-diaforasa (DTD), glutatión S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GP), glutatión reductasa (GR), las metalotioneínas (MT), y la peroxidación lipídica (LPO) en organismos procedentes de 17 localizaciones distintas. Los resultados de este estudio mostraron elevados niveles de LPO en la glándula digestiva de mejillones con altas concentraciones de compuestos orgánicos y arsénico en sus tejidos. Los niveles de BPH se correlacionaron con la concentración de contaminantes orgánicos en los tejidos de mejillón, aunque el rango de variación de ésta respuesta fue bajo en relación con el elevado gradiente de acumulación de estos compuestos. Se detectaron elevados niveles de BPH, junto con bajas actividades de las enzimas DTD y GST, en mejillones que acumularon elevados niveles de contaminantes orgánicos en sus tejidos. Esto indica que el daño oxidativo observado en estos organismos, reflejado por sus elevados niveles de LPO, podría tener su origen en un desequilibrio entre las fase I y II del proceso de detoxificación. Por otro lado, los elevados niveles de MT y CAT detectados en mejillones que acumularon elevadas concentraciones de Cd en sus tejidos reflejaron una respuesta coordinada frente a la toxicidad de este metal. En este trabajo también se discute la aplicación de estos biomarcadores en la evaluación de la calidad del medio marino.

Chemosphere 87 (2012) 1235-1245



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemosphere

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

Assessment of the mechanisms of detoxification of chemical compounds and antioxidant enzymes in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Mediterranean coastal sites

Beatriz Fernández, Juan Antonio Campillo*, Concepción Martínez-Gómez, José Benedicto

Spanish Institute of Oceanography (IEO), Marine Environment and Environmental Protection Area, Oceanographic Centre of Murcia, Varadero 1, 30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history: Received 11 July 2011 Received in revised form 24 December 2011 Accepted 15 January 2012 Available online 14 February 2012

Keywords: Biomarkers Antioxidant enzymes Mussel Digestive gland Mediterranean Sea

ABSTRACT

In this study the effects of the main marine pollutants (metals, PAHs, PCBs and DDTs) were assessed in native mussels from the Mediterranean coast of Spain. For this purpose several biomarkers such as benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH), DT-diaphorase (DTD), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidases (GPs), glutathione reductase (GR), metallothionein (MT) and lipid peroxidation (LPO) were measured in the digestive gland. Results showed increased LPO levels in mussels which accumulated high loads of organic compounds and arsenic in their tissues. BPH levels correlated to the concentrations of organic compounds in mussel tissues, though the range of BPH response was low in relation to the high gradient of accumulation of organic pollutants. Increased BPH levels, concomitant to low DTD and GST activities, were detected in mussels which presented high levels of organic pollutants in their tissues. This suggests that signs of LPO present in these organisms are related to the imbalance between phase I and phase II biotransformation processes. Furthermore, the increased levels of MT and CAT detected in mussels which showed high levels of Cd in their tissues appear to reflect a coordinated response which protects against the toxicity of this metal. The application of these biomarkers in environmental assessment is discussed.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anthropogenic activities are the main source for chemical compounds such as heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated pesticides (DDTs) in coastal waters. The measurement of the concentrations of these substances in ambient water as well as their bioaccumulation in sentinel species has been performed within the framework of chemical monitoring programs. Within these programs mussels have been the most widely used organisms due to their special features such as sessile character, filter feeding habits, wide geographical distribution and high capacity to accumulate xenobiotics in their tissues (Goldberg, 1975). The use of biomarkers has been adopted by various international monitoring programs (WHO, 1993; UNEP, 1997; OSPAR, 2004) in order to identify exposure to chemicals, monitor spatial and temporal changes in contaminant levels, provide early warning of environmental deterioration and indicate the occurrence of adverse environmental consequences (Wu et al., 2005). Among adverse consequences of chemical exposure for aquatic organisms is the increase on cellular levels of free radicals, especially of reactive

oxygen species (ROS). Metals and organic compounds can directly generate ROS due to their direct oxidative potential and by the straightforward activation of the processes that lead to their synthesis, or can indirectly generate ROS by acting on enzymes and cellular scavengers or due to poorly coupled biotransformation processes (Livingstone, 2001). When ROS production exceeds antioxidant defenses cells experience oxidative stress, which may lead to oxidative damage to bio-molecules such as DNA, proteins, lipids and others (Manduzio et al., 2005). The increase in lipid peroxidation (LPO) levels has proved to be a relevant index of chemical injury induced by toxic compounds in mussels (Solé et al., 1996; Cossu et al., 2000; Cheung et al., 2004).

The mechanism of detoxification of endogenous and exogenous organic compounds in invertebrates involves a suite of enzymes mainly enclosed in phase I (or functional reactions) and phase II (or conjugative reactions) of biotransformation (Livingstone, 1991). The assessment of oxidative phase I reactions catalyzed by the cytochrome P450 system in mussels has been proposed as a sensitive biomarker to detect the presence of organic compounds in the marine environment (Peters and Livingstone, 1998). The phase I enzyme benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH) plays a key role in the detoxification of hydrocarbons, pesticides and other xenobiotic compounds. BPH increase in mussels in relation to

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 968 18 05; fax: +34 968 18 44 41. *E-mail address:* juan.campillo@mu.ieo.es (J.A. Campillo).

^{0045-6535/\$ -} see front matter @ 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.024

B. Fernández et al. / Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

exposure to organic pollutants has been reported in laboratory and field studies (e.g. Peters et al., 1999; Akcha et al., 2000; Pisoni et al., 2004; Banni et al., 2010). Quinones are the main type of metabolites generated during phase I metabolization of hydrocarbons in mussels (Michel et al., 1994, 1995). These metabolites can be even more toxic than their parental compound due to their ability to auto-oxidate, link to nucleophilic compounds or inhibit cellular functions (Bolton et al., 2000). The enzyme DT-diaphorase (DTD) catalyzes the two-electron reduction of many guinones and their derivatives into less reactive hydroquinones, thus preventing redox cycling and quinone-dependent production of ROS (Cadenas, 1995). Several studies have reported DTD increase in mussels in relation to exposure to hydrocarbons (Livingstone et al., 1990; Porte et al., 1991; Solé et al., 1994, 1995; Osman et al., 2004). Glutathione S-transferases (GSTs) are phase II biotransformation enzymes that enable the excretion of organic compounds by the enhancement of their polarity throughout their conjugation with glutathione (Fitzpatrick et al., 1995a,b). GST has been satisfactorily used as an indicator of increased phase II biotransformation reactions in mussels (Gowland et al., 2002; Moreira and Guilhermino, 2005; Rocher et al., 2006; Richardson et al., 2008).

Superoxide dismutase (SOD) catalyzes the dismutation of superoxide anion radicals to hydrogen peroxide and molecular oxygen. Hydrogen peroxide is dismutated to water and oxygen by catalase (CAT), which can also act as a peroxidase by catalyzing the detoxification of substrates such alcohols and phenols. Glutathione peroxidases (GPs) reduce hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in association with glutathione oxidation. In connection with these enzymes, glutathione reductase (GR) recycles reduced glutathione from its oxidized form, which is essential for the maintenance of cellular homeostasis and the scavenging of nucleophilic compounds (Manduzio et al., 2005). The assessment of these antioxidant enzymes in mussels has been shown to be a suitable tool for the monitoring of environmental pollutants (Regoli and Principato, 1995; Cheung et al., 2002; Lionetto et al., 2003; Box et al., 2007). Metallothioneins (MTs) in mussels have been reported to be involved in heavy metal homeostasis and over-expressed in organisms experiencing high metal concentrations in their environment (Viarengo and Nott, 1993). MTs have also been reported to be part of the antioxidant defense system of the cells through the scavenging of ROS (Viarengo et al., 1999, 2000).

The present study was performed in the framework of a mussel chemical monitoring network established along the Mediterranean coast of Spain by the Spanish Institute of Oceanography (IEO) (Martínez-Gómez et al., 2007). In this work we have measured phase I and phase II biotransformation enzymes (BPH, DTD and GST), antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPs, GR), MT and LPO in the digestive gland of wild mussels collected at various sites along this coast. We investigated these biochemical responses and their relationships to the accumulation of priority pollutants currently analyzed within this network. The objective of this study was to identify the effects of pollutants on these responses and validate their application as biomarkers in the assessment of marine environmental quality.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and concentrations of chemical compounds

Mussels – *Mytilus galloprovincialis* (3.5–4.2 cm in length) were collected from 17 sites located along the Mediterranean coast of Spain (Fig. 1) in May–June 2003: Cadaqués (CAD), Medas Islands (MED), Barcelona (BAR), Vallcarca (VALL), Tarragona (TAR), Columbretes Islands (COL), Valencia (VAL), Cullera (CUL), Portman (POR), Cartagena (CAR), Almuñécar (ALM), La Herradura (HER), Torrox



Fig. 1. Location of the studied sites.

(TOR), Fuengirola (FUE), Manilva (MAN), Algeciras 1-Punta Carnero (AL1) and Algeciras 2-Guadarranque (AL2). They ranged from pristine sites, such as marine reserves (Columbretes Islands and Medas Islands), to highly pollute sites located near big cities (Algeciras 2, Cartagena, Valencia, Tarragona, Barcelona). It should be noticed that Algeciras 2 was located within the industrialized area of Algeciras Bay, whereas Algeciras 1 was located in the western extreme of this bay, far from the influence of industrial and urban activities. Data of the concentration of chemical compounds (metals, PAHs, PCBs and DDTs) in whole soft tissues of mussels from these sites were obtained from the IEO network and have been previously published in Fernández et al. (2011). Nevertheless, they are reproduced in this work in Table 1 to facilitate comprehension of the results. PCBs refer to the sum of nine individual congeners (congeners CB28, CB52, CB101, CB105, CB118, CB138, CB153, CB156 and CB180), DDTs to the sum of DDT and its metabolites (p,p'-DDD and p,p'-DDE), and PAHs to the sum of 13 hydrocarbons (phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene, benzo[e]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[g,h,i]perylene, dibenzo[a,h]anthracene and indeno[1,2,3c,d]pyrene).

2.2. Obtaining sub-cellular fractions

After sampling, mussels were sent in refrigerated boxes to the laboratory, where they arrived in less than 24 h. Immediately after their arrival, digestive glands were dissected out and stored in liquid nitrogen at -196 °C. Samples were composed of the digestive glands of seven mussels. Six samples were collected for the measurement of enzymatic activities (BPH, DTD, GST, CAT, SOD, GPs and GR) and LPO and another six samples were composed for MT determinations. Samples for enzymatic activities and LPO were homogenized in 1:4 (w/v) K-phosphate buffer 100 mM, pH 7.6 containing 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 3 $\mu g \; m L^{-1}$ leupeptin. The homogenate was subsequently centrifuged at 600g for 15 min, 13,000g for 20 min and 40,000g for 100 min at 4 °C. The resulting supernatant (cytosolic fraction) was removed and the pellet (microsomal fraction) was resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.6 containing 20% glycerol, 1 mM DTT and 1 mM EDTA. Microsomal fractions were used for the measurement of BPH and LPO, and cytosolic fractions were used for the determination of the remaining enzymes. For MT determinations samples were homogenized in 1:3 (w/v) 20 mM Tris-HCl pH 8.6 containing

B. Fernández et al. / Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

Contaminant concentrations (mean \pm SD) in whole soft tissues of mussels	
---	--

Sites	PCB ^a	DDT ^a	PAH ^a	Cu ^b	Pb ^b	Hg ^b	Cd ^b	Zn ^b	As ^b	PI ^c
Cadaqués	20 ± 1	12 ± 1.2	42 ± 8	6.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	0.10 ± 0.01	0.6 ± 0.0	103 ± 4	63 ± 4.7	26 (2)
Medas I	15 ± 1	9 ± 1	30 ± 4	6.6 ± 0.3	2.7 ± 0.2	0.11 ± 0.01	0.8 ± 0.0	131 ± 0	83 ± 3	30 (2)
Barcelona	254 ± 10	87 ± 6	246 ± 19	11.3 ± 0.2	9.8 ± 0.6	0.20 ± 0.00	0.5 ± 0.0	160 ± 6	36 ± 0	76 (3)
Vallcarca	225 ± 13	83 ± 7	95 ± 12	7.8 ± 0.4	7.9 ± 0.4	0.25 ± 0.01	0.4 ± 0.0	153 ± 21	23 ± 0	56 (3)
Tarragona	51 ± 1	25 ± 1	216 ± 39	7.5 ± 0.4	1.9 ± 0.1	0.13 ± 0.01	0.3 ± 0.0	91 ± 7	28 ± 14	41 (3)
Columbretes I	11 ± 2	8 ± 0	18 ± 1	7.5 ± 0.1	2.5 ± 0.3	0.19 ± 0.03	1.4 ± 0.2	148 ± 18	32 ± 1	33 (2)
Valencia	113 ± 15	24 ± 3	84 ± 9	8.2 ± 0.2	2.8 ± 0.1	0.13 ± 0.01	0.4 ± 0.0	130 ± 9	21 ± 3	45 (3)
Cullera	30 ± 2	19 ± 1	55 ± 22	6.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1	0.10 ± 0.00	0.3 ± 0.0	141 ± 13	25 ± 0	25 (2)
Portman	9 ± 4	8 ± 1	6 ± 0	6.7 ± 0.3	35.5 ± 3.5	0.22 ± 0.02	1.7 ± 0.1	243 ± 33	25 ± 1	33 (2)
Cartagena	90 ± 2	14 ± 1	66	8.1 ± 0.3	57.8 ± 3.4	0.78 ± 0.12	1.6 ± 0.1	249 ± 17	23 ± 1	65 (3)
Almuñecar	9 ± 1	6 ± 1	31 ± 4	6.6 ± 0.0	2.9 ± 0.2	0.10 ± 0.01	0.5 ± 0.0	227 ± 17	16 ± 1	16(1)
La Herradura	5 ± 1	5 ± 1	25 ± 15	6.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.12 ± 0.01	1.3 ± 0.0	318 ± 25	15 ± 0	8(1)
Torrox	10 ± 1	10 ± 1	45 ± 9	6.8 ± 0.2	3.3 ± 0.2	0.08 ± 0.00	0.7 ± 0.0	295 ± 4	13 ± 1	19(1)
Fuengirola	16 ± 2	5 ± 0	28 ± 12	6.7 ± 0.1	3.1 ± 0.2	0.12 ± 0.00	0.9 ± 0.0	431 ± 13	19 ± 0	23 (2)
Manilva	7 ± 0	5 ± 0	22 ± 3	6.3 ± 0.2	1.9 ± 0.0	0.09 ± 0.00	0.7 ± 0.0	312 ± 19	16 ± 0	6(1)
Algeciras 1	12 ± 1	6 ± 0	22 ± 11	6.6 ± 0.2	2.7 ± 0.1	0.08 ± 0.01	0.7 ± 0.0	300 ± 24	18 ± 1	12(1)
Algeciras 2	70 ± 4	14 ± 0	179 ± 33	8.0 ± 0.2	2.7 ± 0.1	0.15 ± 0.00	0.4 ± 0.0	274 ± 26	13 ± 1	34 (3)

Data reproduced from Fernández et al. (2011).

^a ng g⁻¹ dry weight. ^b μ g g⁻¹ dry weight.

^c Pollution index calculated according to Shin and Lam (2001). Between brackets is showed the classification of sites regarding their PI: (1): low polluted, (2): medium polluted, (3): high polluted.

0.5 M sucrose. The homogenate was centrifuged at 30,000g for 20 min at 4 °C and the resulting supernatant was used for MT determinations. DTD, GST, SOD, CAT, GPs, GR and LPO were expressed in relation to protein concentration determined according to Lowry et al. (1951).

2.3. Biochemical determinations

BPH was assessed following Dehnen et al. (1973). Microsomal fractions were incubated for 10 min at 25 °C in a shaking waterbath under yellow light with 50 mM triethanolamine-HCl pH 7.5 containing 0.74 mM NADPH and 60 µM BaP. The reaction was stopped by adding cold acetone and the mixture was then centrifuged at 3,000g for 10 min. The resultant supernatant was mixed (1:3.3, v/v) with 8% triethylamine and centrifuged at 3,000g for 10 min. The fluorescence of supernatants was measured at an excitation wavelength of 467 nm and an emission wavelength of 525 nm against a solution of 3-hydroxy BaP (1–10 pmol mL⁻¹) in 8% triethylamine. BPH was expressed as pmol of 3-hydroxyBaP oxidized per min and per nmol of cytochrome P450. Cytochrome P450 content was quantified from sodium-dithionite differentiate spectra at 450 nm in carbon monoxide-oxidized and carbon monoxidereduced microsomal samples using a molar extinction coefficient of 91 mM⁻¹cm⁻¹ (Omura and Sato, 1964). MT concentration was determined following UNEP/RAMOGE (1999) and expressed as µg MT gram⁻¹ wet tissue. Enzymatic activities were measured as described in Fernández et al. (2010) following Claiborne (1985) for CAT, Livingstone et al. (1992) for Se-dependent GP (SeGP) and Se-independent GP (nonSeGP), Ramos-Martínez et al. (1983) for GR, McCord and Fridovich (1969) for SOD, Benson et al. (1980) for DTD and Habig et al. (1974) for GST. Enzymatic activities were expressed as nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ with the exception of CAT, which was expressed as μ mol min⁻¹ mg protein⁻¹, and SOD, which was expressed as U min⁻¹ mg protein⁻¹. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the rate of cytochrome c reduction. LPO was quantified according to Buege and Aust (1978) on microsomal fractions mixed with 15% trichloroacetic acid solution containing 0.375% thiobarbituric acid. The mixture was incubated for 20 min in a water bath at 80 °C, chilled by immersing it in cold water and centrifuged at 2,000g for 10 min. The aldehyde (malondialdehyde-MDA) formed was estimated at 535 nm using a standard of malonaldehyde bis-(dimethylacetal) and LPO was expressed as nmol of MDA mg protein⁻¹.

2.4. Statistical analysis

Data were tested for normality and homogeneity of variances using Kolmogorov-Smirnoff and Levene's tests, respectively. When necessary, variables were transformed to achieve equality of variances. Significant differences of biochemical responses studied between sites were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc pair-wise comparisons using the SNK test. Parametric correlations (Pearson's test, two-tailed) were performed between biochemical responses and contaminant concentration mean data. These analyses were carried out using SPSS (version 11). To facilitate the interpretation of the results, non-parametric multivariate analysis was performed using PRIMER (version 6). A Euclidean distance similarity matrix was created using transformed data (log (x + 1)) of the mean values of biochemical responses selected. Classification was performed on this matrix using multidimensional scaling (MDA) as well as hierarchical agglomerative clustering. ANOSIM analysis was used to test the similarity between clusters obtained. In addition, the sites studied were classified regarding the accumulation of chemical compounds measured in mussel tissues (PAHs, PCBs, DDTs, Hg, Cd, Pb, Cu and As; Zn was excluded) applying the methodology developed by Shin and Lam (2001) to calculate a marine pollution index (PI). This method uses principal component analysis (PCA) to identify the most important parameters. Then, the PI is calculated regarding the value of these parameters at each site and the weight attributed to them on the basis of the proportion of the eigen values obtained from the PCA. The PI calculated following this method can range between 0 (clean) and 100 (severely polluted). However, to simplify our results we classified studied sites into three PI categories: (1) low-polluted, (2) medium-polluted and (3) high-polluted. Procedure followed to calculate PI in this work is showed in Table S1 and Table S2 (supplementary data).

3. Results

3.1. Environmental parameters and pollutant bioaccumulation

Concentrations of contaminants measured in soft tissues of mussels and the PIs calculated for each site are presented in Table 1. Regarding organic compounds, the highest PCB and DDT levels were found at Barcelona and Vallcarca, followed by Tarragona, Valencia, Cartagena and Algeciras 2, and the highest concentrations



B. Fernández et al. / Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

Fig. 2. Mean data (±SD) of benzo[a]pyrene hydroxylase (BPH), DT-diaphorase (DTD), glutathione-S transferase (GST) and metallothionein (MT). Bars labeled with the same superscript did not differ significantly at the 95% level (ANOVA F-test; SNK multiple comparison test).

of PAHs were measured at Barcelona, Tarragona and Algeciras 2, followed by Vallcarca and Valencia. Besides, the highest levels of Cu were found in mussels from Barcelona, Valencia and Cartagena. Accordingly, the PI classified these sites as high-polluted ones. Regarding the remaining metals, the highest levels of Pb, Cd and Hg were found in organisms from Cartagena and Portman, the origin of this pollution was the dumping in Portman Bay of waste mine products from extractive mining activities (Benedicto et al., 2008). High levels of Pb were also found in mussels from Barcelona and Vallcarca, of Hg in organisms from Vallcarca, Barcelona and Columbretes Islands and of Cd in mussels from Columbretes Islands and La Herradura, Lower levels of Zn were detected in mussels collected at northern sites, from Cadaqués to Cullera, than in those collected at southern sites, from Portman to Algeciras 2. The contrary occurred with As, whose concentrations were lower in mussels collected at southern sites than in those collected at northern sites. According to the PI Cadaqués, Medas Islands, Columbretes Islands, Cullera, Portman and Fuengirola were considered medium-polluted sites. At these sites the principal chemicals accumulated in mussel tissues were metals, with the exception of Cullera, where relatively high levels of organic pollutants were found. On the other hand, the lowest levels of organic and metallic compounds were measured in mussels from locations such as Almuñecar, La Herradura, Torrox, Manilva and Algeciras 1, which were already classified by the PI as low-polluted sites.

3.2. Biomarker responses

Mean values of BPH, DTD, GST and MT are shown in Fig. 2. Significantly higher BPH levels were detected in mussels from Barcelona than in those from La Herradura and Portman. DTD activity was significantly higher in mussels from Almuñecar than in those from Cadaqués, Tarragona and Cullera. Mean DTD levels were also significantly higher in organisms from Algeciras 2 and Torrox than in those collected at Tarragona and Cullera. Significantly higher GST levels were found in mussels from Cadaqués, Columbretes Islands, Medas Islands and Algeciras 2 than in mussels from Vallcarca, Tarragona, Cullera and Manilva. The MT level found in mussels from Portman was significantly higher than those recorded in mussels from the remaining mussel populations studied. High MT concentrations were also found in organisms from Manilva, Columbretes Islands and La Herradura, these MT levels being significantly higher than those recorded in mussels from Valuencia.

Mean values of antioxidant enzymes (SOD, CAT, SeGP, nonSeGP, GR) and LPO are displayed in Fig. 3. SOD was significantly higher in mussels from La Herradura than in organisms from the remaining mussel populations studied. In addition, SOD activity found in mussels from Almuñecar was significantly higher than SOD levels measured in mussels from Tarragona, Columbretes Islands, Valencia, Cullera, Cartagena, Torrox and Manilva. Significantly higher CAT activity was found in mussels from Columbretes Islands than in those from the remaining sites, with the exception of Portman. In addition, CAT levels in mussels from Algeciras 1 and Almuñecar were significantly higher than those recorded in organisms from Medas Islands and Vallcarca. SeGP and nonSeGP activities followed a similar comportment between sites. SeGP was significantly higher in mussels from Vallcarca than in those from the remaining sites. Also SeGP was significantly higher in mussels from Algeciras 1 than in those from Cadaqués, Columbretes Islands, Cullera, Portman, Fuengirola, Manilva y Algeciras 2. NonSeGP was significantly higher in mussels from Vallcarca and Almuñecar than in mussels from Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Columbretes Islands, Cullera, Manilva and Algeciras 2-Guadarrangue. NonSeGP was also significantly higher in organisms from Tarragona and Algeciras 1 than in those from Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Cullera and Manilva. Regarding GR, significantly higher levels were detected in mussels from Algeciras 1 than in those from the remaining sites, except for Medas Islands, Barcelona, Manilva and



120 150 100 CAT (µmol/min/mg) SOD (U/min/mg) 80 100 60 40 50 20 0 n CUL POR ALM HER FUE FUE AL1 AL1 VALL CUL POR ALM HER FUE AL1 AL2 BAR TAR BAR MAN CAD /ALL б CAD MED COL VAL VAL 20 20 SeGP (nmol/min/mg) abc nonSeGP (nmol/min/mg) 15 abc abc ahcd abo 15 10 10 5 5 0 0 CAR-ALM-HER-CAD MED BAR /ALL TAR VAL CUL. FUE AL2 COL AL1 BAR MED TAR CUL PQR CAR ALM ЩЩ ΕŪΕ MAN AL1 AL2 CAD /ALL S VAL TOR 30 5 ab 25 ab bc LPO (nmolMDA/mg) GR (nmol/min/mg) bcdbcd 20 3 15 2 10 5 0 BAR VALL TAR COL COL POR CAR ALM HER CAD BAR VALL TAR COL TOR FUE MAN CAR CAD MED AL1 AL2 VAL CL POR ALM ЩЩ **T**OR ΗË MAN AL1 AL2

Fig. 3. Mean data (±SD) of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase Se-dependent and Se-independent (SeGP and nonSeGP), glutathione reductase (GR) and lipid peroxidation (LPO). Bars labeled with the same superscript did not differ significantly at the 95% level (ANOVA F-test; SNK multiple comparison test).

Algeciras 2. The lowest GR levels were detected in mussels from Tarragona, Portman and Cartagena. Significantly higher mean LPO levels were found in mussels from Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Vallcarca and Tarragona than in those from the remaining sites. The LPO level in mussels from Columbretes Islands was also significantly higher than in mussels from Valencia, Portman, Cartagena, Almuñecar, La Herradura, Fuengirola, Manilva, Algeciras 1 and Algeciras 2, whilst the LPO level in mussels from Cullera was also significantly higher than in organisms collected at Portman and La Herradura.

3.3. Correlation analysis between biomarkers and chemical data

Results from Pearson's correlation analyses are shown in Table 2. MT and CAT levels correlated with each other. Both parameters were also positively correlated to Cd concentrations. GR correlated negatively to Pb levels. Both forms of GPs correlated with each other and SeGP positively correlated to the levels of PCBs and DDTs. LPO correlated positively to the levels of PCBs, DDTs and

As, and negatively to Zn and DTDs concentrations. BPH was positively correlated to the levels of LPO, PCBs, DDTs, PAHs and Cu.

3.4. Multivariate analysis

For multidimensional scaling (MDS) and cluster analyses the mean values of the biochemical responses that showed significant correlations with contaminant concentrations and/or offered more relevant toxicological information were used (i.e. phase I and phase II enzymes (BPH, DTD and GST), CAT, MT and LPO). Cluster analysis overlaid on the MDS plot (Fig. 4) showed that the sites studied could be grouped into two main groups, which were significantly different as indicated by ANOSIM analysis (global *R* value = 0.697, p = 0.001). Each of these groups was made up of several main sub-clusters. Fig. 4 also shows the superimposition of sites on the MDS plot according to their PI. All the sites classified as low-polluted (La Herradura, Almuñecar, Algeciras 1, Torrox and Mani-Iva) together with two medium-polluted (Portman and Fuengirola) and three high-polluted sites (Algeciras 2, Valencia and Cartagena)

B. Fernández et al./Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

able 2
Pearson correlation coefficients among the different biochemical and chemical variables tested across sites (n = 17).

	BPH	GST	DTD	MT	SOD	CAT	NonSeGP	SeGP	GR	LPO
GST	0.16									
DTD	-0.27	0.22								
MT	-0.38	-0.03	0.12							
SOD	-0.19	0.20	0.35	0.24						
CAT	-0.17	0.20	0.23	0.61**	0.14					
NonSeGP	-0.29	-0.44	0.14	-0.13	0.19	0.12				
SeGP	-0.15	-0.29	-0.05	-0.23	0.14	-0.25	0.79***			
GR	0.19	0.16	0.36	-0.10	0.11	-0.07	-0.25	-0.14		
LPO	0.50*	0.20	-0.53^{*}	-0.27	-0.17	-0.35	-0.14	0.31	0.00	
PAH	0.76***	-0.05	-0.16	-0.32	0.01	-0.27	0.04	0.14	0.06	0.42
PCB	0.53*	-0.11	-0.15	-0.11	-0.02	-0.35	0.17	0.51*	0.12	0.48^{*}
DDT	0.53*	-0.16	-0.25	-0.05	0.01	-0.30	0.18	0.56*	0.10	0.63**
Hg	-0.08	0.08	-0.12	0.11	-0.13	-0.10	0.06	0.14	-0.44	-0.05
Cd	-0.50^{*}	0.29	0.00	0.65**	0.13	0.54*	-0.12	-0.27	-0.35	-0.36
Pb	-0.22	0.01	-0.11	0.36	-0.15	0.06	0.02	0.03	-0.51^{*}	-0.21
Cu	0.70**	0.14	-0.01	-0.06	-0.02	-0.06	0.01	0.16	0.15	0.34
Zn	-0.46	-0.21	0.47	0.34	0.39	0.24	0.09	-0.21	0.26	-0.72^{**}
As	0.21	0.59*	-0.34	-0.20	-0.13	-0.30	-0.48^*	-0.12	0.06	0.67**

* Correlations are significant at 0.05 level (2-tailed).

** Correlations are significant at 0.01 level (2-tailed).

**** Correlations are significant at 0.001 level (2-tailed).



Fig. 4. Multidimensional scaling analysis with superimposition of cluster subgroups and classification of sites according to their pollution index (PI).

were located in cluster one. Cluster two comprises three highpolluted sites (Barcelona, Tarragona and Vallcarca) and four medium-polluted sites (Cadaqués, Medas Islands, Columbretes Islands and Cullera). Fig. 5 shows the superimposition of biomarker responses on the MDS plot. Overall, mussels characterized by low LPO levels and relatively high BPH, DTD, CAT and MT levels were located in cluster one, whereas mussel populations with higher LPO levels and lower BPH, DTD, CAT and MT levels were located in cluster two. Portman and Columbretes Islands were integrated in cluster one and two, respectively, although they showed fewer similarities to the remaining sites comprising each of these clusters.

4. Discussion

LPO can be considered an index of oxidative damage to lipids produced by toxic compounds. Results from this study showed that mussels collected at Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Vallcarca and Tarragona presented significantly higher LPO levels than those collected at the remaining sites studied. Mussels from Columbretes Islands and Cullera also showed evidences of LPO, though to a lesser extent (Fig. 3). At Barcelona, Vallcarca and Tarragona high levels of LPO coincided with the highest accumulations of PAHs, PCBs and DDTs in mussel tissues (Table 1). The source of these compounds is the intense harbor, industrial and urban activities

carried out in these areas. At Cullera, although the levels of organic pollutants recorded were lower than at the three aforementioned sites, their concentrations (especially of PCBs and DDTs) were higher than in the majority of the remaining mussel populations studied. The origin of these pollutants, which may enter the sea through the nearby mouth of the Jucar River, may be the intensive agricultural activities performed in this area (Cupul-Magaña et al., 2006). Thus, increased LPO levels detected in mussels from these four sites seem to be related to the accumulation of organic pollutants, as also indicated by the positive correlations detected between LPO and concentrations of PCBs and DDTs (Table 2). Similarly to our results, signs of LPO have been reported in mussels subjected to exposure to contaminated waters (Cossu et al., 1997, 2000; Pampanin et al., 2005a), industrial effluents (Faria et al., 2010) or oil spills (Solé et al., 1996; Porte et al., 2000; Bocquene et al., 2004; Sureda et al., 2011).

The general pathway of toxicity induced by organic chemicals in aquatic organisms essentially relies on the production of ROS due to redox cycling biotransformation reactions catalyzed by cytochrome P450 (Livingstone, 2001). Although certain components of the cytochrome P450 system in mussel have been proposed as biomarkers of exposure to organic pollutants, some controversial results have been revealed in various studies. Whereas some of these works have reported increased levels of cytochrome P450 components (Porte et al., 1991, 2000, 2001a; Michel et al., 1993; Peters et al., 1999; Akcha et al., 2000; Pisoni et al., 2004; Bebianno et al., 2007; Banni et al., 2010; Sureda et al., 2011), other studies have detected weak, transient or no response of this system after exposure to organic pollutants (Suteau et al., 1988; Michel et al., 1994; Okay et al., 2000). Discrepancies over the use of cytochrome P450 in mussels may be accounted for by its lower expression in comparison to other marine organisms and the complexity of its response. For instance, while some pollutants contained in anthropogenic effluents can induce cytochrome P450, other compounds can inhibit its response, as has been reported for tributyltin (TBT) from antifouling paints (Morcillo and Porte, 1997; Morcillo et al., 1998).

In this study the highest BPH level was found in mussels from Barcelona (Fig. 2), which accumulated the highest levels of organic compounds in their tissues (Table 1). Although not significantly different, high BPH levels were also detected in mussels from Tarragona, Cullera, Algeciras 2 and Valencia, that also accumulated high levels of organic compounds in their tissues. In addition, BPH





Fig. 5. Multidimensional scaling analysis with bubble plots superimposed.

levels positively correlated to the concentration of PCBs, DDTs and, especially, PAHs (Table 2). This suggests that this specific form of cytochrome P450 was increased in mussels from organic polluted sites, in agreement with previous studies carried out on the mussel M. galloprovincialis (Solé et al., 1998, 2000; Porte et al., 2001b) and the starfish Asterias rubens (den Besten et al., 1993). However, BPH showed a low capacity to discriminate between sites (only two significant differences were found) and a low rate of response (2.2-fold) in relation to the high gradient of accumulation of organic compounds detected between sites (18, 33 and 36-fold for DDTs, PAHs and PCBs, respectively). In a similar way, Porte et al. (2001b) reported high levels of BPH in mussels from several locations along the Galician coast (NW Spain) but at a low rate in comparison with the different degrees of PAH accumulation detected among sites. In spite of the low rate of BPH response detected between sites in this study, high BPH levels detected may have an important toxicological meaning. The oxidation of PAHs by BPH in mussels may increase the cellular concentration of metabolites such as quinones, phenols and diols (Michel et al., 1994, 1995), which are able to interact with various macromolecules and provoke cellular damage (Bolton et al., 2000). For instance, Mitchelmore et al. (1998) reported that DNA strand breakage in Mytilus edulis exposed to BaP occurred via the production of BaP quinones. Therefore, high BPH activity found in mussels from Barcelona could imply a high rate of generation of phase I metabolites. In addition, the low

DTD and GST levels detected in these mussels (Fig. 2) may provoke and reflect the imbalance between phase I and phase II biotransformation reactions, which may lead to the accumulation of these metabolites and, therefore, to oxidative damage, as suggested by several authors (Stegeman, 1985; Cadenas, 1995). Similarly to Barcelona, high levels of LPO detected in mussels from Vallcarca, Tarragona and Cullera may be related to the direct action of organic compounds and/or to the accumulation of toxic metabolites, as no increased levels of DTD and GST were detected in these organisms. The lack of response or even reductions in the levels of DTD and GST in mussels subjected to organic pollution have been reported in several studies (Livingstone et al., 1990; Fitzpatrick et al., 1997; Akcha et al., 2000; Cheung et al., 2001; Robillard et al., 2003; Bocquene et al., 2004; Dafre et al., 2004; Luca-Abbott et al., 2005; Osman et al., 2007; Cravo et al., 2009). Furthermore, significantly lower levels of CAT detected in mussels from Vallcarca and Medas Islands, of SOD and GR in organisms from Tarragona and of SOD in mussels from Cullera (Fig. 3) may also reflect the overwhelming of antioxidant defenses or their inability to remove ROS and thus to protect against LPO. Indeed, low levels of antioxidant enzymes in mussels have been interpreted as a sign of susceptibility to oxidative stress (Regoli and Principato, 1995; Cossu et al., 1997, 2000; Canesi et al., 1999; Frenzilli et al., 2004; Pampanin et al., 2005a; Osman et al., 2007; Vlahogianni and Valavanidis, 2007). The contrary occurred in mussels from

Algeciras 2, where no signs of LPO were found in spite of the high levels of organic contaminants accumulated (Table 1), mainly hydrocarbons from a nearby petrochemical plant. In these organisms, the coordinated increased levels of DTD, GST, GR and BPH (Figs. 2 and 3) may help to protect from oxidative damage. The induction of antioxidant enzymes in relation to an absence of oxidative damage has been regarded as an adaptation to overcome oxidative stress (Torres et al., 2002; Cheung et al., 2004; Rocher et al., 2006; Box et al., 2007; Richardson et al., 2008) and various studies have reported an increased response of DTD (Porte et al., 1991; Solé et al., 1995), GST (Moreira and Guilhermino, 2005; Rocher et al., 2006; Sureda et al., 2011) and GR (Porte et al., 2001b; Cheung et al., 2004; Dafre et al., 2004; Box et al., 2007; Richardson et al., 2008) in relation to exposure to organic pollutants.

In this work high levels of LPO have been found in mussels where the highest concentrations of As were found (Cadaqués, Medas Islands, Barcelona and Columbretes Islands). Besides, As and LPO were positively correlated (Table 2). These results suggest that As may be involved in the lipid oxidative damage detected in these organisms. As is a common element in the aquatic environment, originating either from anthropogenic sources (e.g. Ascontaminated drainage from the land) and natural processes (e.g. upwelling of As-rich deep ocean water) (Neff, 1997). The presence of As-rich stream sediments in the eastern Pyrenees and of As-rich waters in the south-west of France (De Vos and Tarvainen, 2006) seems to be responsible for the high levels of As detected in this study at northern sites. Inorganic As is the major form of this compound in sea water and sediments, while non-toxic organoarsenic compounds such as arsenobetaine, arsenocholine and arsenosugars generally predominate in the tissues of marine organisms (Francesconi and Edmonds, 1998; Fattorini et al., 2004, 2006). However, low amounts of As can be accumulated as the toxic inorganic form of arsenite (As III) and arsenate (As V) as it was reported for M. edulis by Gailer et al. (1995). The toxicity of As is mainly related to its affinity for the sulfhydryl groups of biomolecules (Aposhian and Aposhian, 2006), having been reported that As can generate ROS, deplete GSH levels, oxidize proteins, inhibit antioxidant enzymes, peroxidize lipids and damage DNA (Wang et al., 1997; Kitchin, 2001; Shi et al., 2004). The fact that in this study the highest GST were found in mussels from Cadaqués and Medas Islands (together with Algeciras 2) (Fig. 2), which highly accumulated As in their tissues (Table 1), and that As and GST correlated positively (Table 2) suggests that GST increased in relation to the accumulation of As. Although GSTs primarily catalyze the conjugation of glutathione to organic electrophilic compounds and metals are not natural substrata for them, several studies have reported GST increases in mussels exposed to metals (Canesi et al., 1999: Khessiba et al., 2001) or collected from metal-polluted sites (Torres et al., 2002; Won et al., 2005; Fernández et al., 2010; Vidal-Liñán et al., 2010). In fact, GSTs can also be regarded as antioxidant enzymes due to their role as nonSeGPs, isomerases, or sequestering hydrophobic molecules (Prohaska, 1980; Manduzio et al., 2005). However, the increased GST levels detected in mussels which accumulated high levels of As in their tissues did not prevent LPO. The competition between GST and As for reduced glutathione (GSH) may lead to the depletion of the intracellular concentration of GSH and may be involved in the oxidative damage detected. Indeed, it has been reported that GSH levels can be depleted by As (i) by the binding of arsenite to GSH, (ii) by the oxidation of GSH by As-induced oxygen radicals and (iii) by the oxidation of GSH by arsenate (Thomas et al., 2001).

It is known that heavy metals are able to promote the intracellular formation of ROS and to induce LPO in mussels (Almeida et al., 2004; Verlecar et al., 2007, 2008; Vlahogianni and Valavanidis, 2007). One of the main cellular mechanisms for detoxifying and preventing metal toxicity is the sequestration of metal cations by MTs (Viarengo and Nott, 1993). Our results showed significantly higher MT levels in mussels from Portman than in mussels from the remaining sites. In addition, significantly higher MT concentrations were found in mussels collected at Manilva, Columbretes Islands and La Herradura than in those collected at Valencia (and Tarragona in the case of Manilva) (Fig. 2). This coincided with the highest accumulation of Cd at Portman (and also remarkably high levels of Pb and Hg) and also high Cd levels in mussels from Columbretes Islands and La Herradura (Table 1). This, together with the positive correlation detected between MT and Cd concentrations (Table 2), may reflect the specific MT induction in the digestive gland of mussels in relation to the accumulation of Cd. In fact, Cd has been reported to induce MT in the digestive gland of Mytilus sp. in both laboratory (Bebianno and Langston, 1991, 1992; Pavicic et al., 1993) and field (Couillard et al., 1993; Geffard et al., 2005; Ivankovic et al., 2005; Pampanin et al., 2005b) studies. In addition, the increased levels of CAT (Fig. 3) detected at Columbretes Islands and Portman and the positive correlation detected between CAT and Cd levels (Table 2) may also reflect the specific response of CAT to the accumulation of Cd, in consonance with studies that have reported CAT induction in mussels exposed to metals (Almeida et al., 2004) or transplanted to polluted sites (Da Ros et al., 2000; De Luca-Abbott et al., 2005). CAT induction has been regarded as an adaptive behavior to an unsafe environment and an important early indicator of oxidative stress (Cossu et al., 1997). Increased levels of MT and CAT detected in mussels from Portman and Columbretes Islands and of MT and SOD detected in mussels from La Herradura may indicate the coordinated action of these responses to avoid the toxic effects of Cd. In fact, MT has been regarded not only as a specific response to metal toxicity but also as an antioxidant defense as an oxyrradical scavenger that may functionally substitute antioxidant enzymes and/or help them to protect cells from oxidative stress (Viarengo et al., 1999, 2000).

The significantly higher accumulation of Zn found in mussels from south-western sites compared to those from northern ones (Table 1) may be partially explained by the metal enrichment of Mediterranean waters during their exchange through the strait of Gibraltar with Atlantic waters (Palanques et al., 1995; van Geen et al., 1997; Elbaz-Poulichet et al., 2001). Although Zn excess can produce cyto-toxicity, tissue damage and imbalance in antioxidant systems (Geret and Bebianno, 2004; Franco et al., 2006), higher Zn levels recorded in mussels from southern sites seemed not to reach toxic levels as no signs of LPO were detected in these organisms (Fig. 3). For this reason Zn was excluded from the calculation of the PI. On the contrary, the inverse correlation detected between LPO and Zn levels (Table 2) may reflect a protective role of this metal. In fact, Zn provides essential structural and catalytic functions for a wide variety of proteins, is crucial in the regulation of gene expression and is able to stabilize membranes and prevent ROS formation by protecting sulfhydryl groups against oxidation and by displacing redox metal ions from site-specific loci (Stohs and Bagchi, 1995).

In order to obtain a better interpretation of the results, multivariate analyses (MDS and clustering) on mean data of the biomarkers that offered more relevant toxicological information were performed. In addition, the classification of studied sites according to their PI was superimposed on the MDS ordination plot to assess the information offered by biomarkers in relation to the degree of accumulation of pollutants in mussel tissues (Fig. 4). This figure shows that the ordination of mussel populations regarding their biochemical responses did not clearly group them according to their degree of pollution. Thus, although all sites classified as lowpolluted (La Herradura, Almuñecar, Algeciras 1, Torrox and Manilva) were located in cluster one, this group also included two mediumpolluted (Fuengirola and, with less similarity, Portman) and three high-polluted (Cartagena, Algeciras 2 and Valencia) sites. As is
B. Fernández et al. / Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

shown in the bubble plots represented in Fig. 5, these sites were characterized by low LPO levels and relatively high DTD, GST, CAT and MT levels. Increased levels of these biochemical responses seemed to prevent oxidative damage in these mussel populations. On the other hand, cluster two comprises three high-polluted sites (Barcelona, Tarragona and Vallcarca) and four medium-polluted sites (Cullera, Cadaqués, Medas Islands and Columbretes Islands) and seems to offer a more accurate grouping of studied sites according to their degree of pollution than does cluster one. These mussel populations were characterized by higher LPO levels, relatively higher BPH, and lower DTD, CAT and MT levels. Within this group GST offered a different response with low GST levels at Cullera, Tarragona and Vallcarca, which were grouped into a different sub-cluster, and high GST levels recorded at the other four sites. Oxidative damage detected in these mussel populations seemed to be related to the toxic potential of organic pollutants and/or of As. The imbalance between phase I and phase II enzymatic activities and the depleted levels of antioxidant enzymes and MT recorded in these mussel populations may reflect the impairment of antioxidant defenses due to pollutant exposure. Indeed, it is known that many stress responses may decline with time after induction (i.e., adaptation), even if the level of stress remains constant.

5. Conclusion

The majority of the biochemical responses obtained in each mussel population studied may be explained by the type and degree of accumulation of pollutants detected in these organisms. However, the integrated response offered by these biomarkers showed a limited capacity to discriminate sites according to their degree of pollution. This may be due to the inherent variability and rather unpredictable behavior of antioxidant responses in field conditions, where environmental and biological parameters may influence the response of these biomarkers. In addition, the fact that each mussel population was exposed to different and complex mixtures of pollutants may elicit a different pattern of response in the variables studied. Thus, although these biomarkers can help in the assessment of the marine environment, their complex response may limit their applicability in field studies.

Acknowledgments

The authors wish to thank the technical personnel from the Centro Oceanográfico de Murcia for their assistance. This study was funded by the Spanish Institute of Oceanography (IEO) through the project BIOMEJIMED III and a pre-doctoral fellowship for research personnel training.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.024.

References

- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 49, 269–287.
- Almeida, E.A., Miyamoto, S., Bainy, A.C.D., de Medeiros, M.H.G., Di Mascio, P., 2004. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. Mar. Pollut. Bull. 49, 386–392.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M., 2006. Arsenic toxicology: five questions. Chem. Res. Toxicol. 19, 1–15.
- Banni, M., Negri, A., Dagnino, A., Jebali, J., Ameur, S., Boussetta, H., 2010. Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. Ecotox. Environ. Safe. 73, 842–848.

- Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1991. Metallothionein induction in Mytilus edulis exposed to cadmium. Mar. Biol. 108, 91–96.
- Bebianno, M.J., Langston, W.J., 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Phys. C. 103, 79–85.
- Bebianno, M.J., Lopes, B., Guerra, L., Hoarau, P., Ferreira, A.M., 2007. Glutathione Stranferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. Environ. Int. 33, 550–558.
- Benedicto, J., Martínez-Gómez, C., Guerrero, J., Jornet, A., 2008. Metal contamination in Portman bay (Murcia, SE Spain) 15 years after the cessation of mining activities. Cienc. Mar. 34, 389–398.
- Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P., 1980. Increase of NAD(P)H: quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 5216–5220.
- Bocquene, G., Chantereau, S., Clerendeau, C., Beausir, E., Menard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Leszkowicz, A.P., Narbonne, J.F., 2004. Biological effects of the "Erika" oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). Aquat. Living. Resour. 17, 309–316.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. Chem. Res. Toxicol. 13, 135–160.
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp. Biochem. Phys. C. 146, 531–539.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. In: Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 302–310.
 Cadenas, E., 1995. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in
- Cadenas, E., 1995. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinone metabolism. Biochem. Pharmacol. 49, 127–140.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. Aquat. Toxicol. 46, 67–76.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2001. Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat. Toxicol. 52, 189–203.
- 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.
- Cheung, C.C.C., Siu, W.H.L., Richardson, B., Luca-Abbott, S.B., Lam, P.K.S., 2004. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Environ. Pollut. 128, 393–403.
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 1997. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol. Environ. Saf. 28, 122–131.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P., 2000. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 106– 121.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. Limnol. Oceanogr. 38, 299–313.
- Cravo, A., Lopes, B., Serafim, A., Company, R., Barreira, L., Gomes, T., Bebianno, M.J., 2009. A multibiomarker approach in*Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. J. Environ. Monit. 11, 1673–1686.
- Cupul-Magaña, L.A., Mosso-Aranda, C., Sierra, J.P., Marti, E., Ferman-Almada, J.L., Rodilla, M., González del Río, J., Sánchez-Arcilla, A., 2006. Characterization and distribution patterns of surficial sediments of Cullera Bay. Spain. Cienc. Mar. 32, 617–629.
- Da Ros, L., Nasci, C., Marigómez, I., Soto, M., 2000. Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus* galloprovincialis, in Venice Lagoon. Italy. Mar. Environ. Res. 50, 417–423.
- Dafre, A.L., Medeiros, I.D., Muller, I.C., Ventura, E.C., Dias Bainy, A.C., 2004. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. Chem-Biol. Interact. 149, 97–105.
- De Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 51, 694–707.
- De Vos, W., Tarvainen, T. 2006. Geochemical atlas of Europe. Part 2: Interpretation of geochemical maps, additional tables, figures, maps and related publications. FOREGS atlas. Geological Survey of Finland, Espoo, Findland, pp.690. http://www.gtk.fi/publ/foregsatlas/.
- Dehnen, W., Tomingas, R., Roos, J., 1973. A modified method for the assay of benzo[a]pyrene hydroxylase. Anal. Biochem. 53, 373–383.
- den Besten, P.J., Lemaire, P., Livingstone, D.R., Woodin, B., Stegeman, J.J., Herwig, H.J., Seinen, W., 1993. Time-course and dose-response of the apparent induction of the cytochrome P450 monooxygenase system of pyloric caeca microsomes of the female sea star Asterias rubens L. by benzo[a]pyrene and polychlorinated biphenyls. Aquat. Toxicol. 26, 23–40.
- Elbaz-Poulichet, F., Morley, N.H., Beckers, J.M., Nomerange, P., 2001. Metal fluxes through the Strait of Gibraltar: the influence of the Tinto and Odiel rivers (SW Spain). Mar. Chem. 73, 193–213.

1244

B. Fernández et al. / Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

- 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.
- Fattorini, D., Alonso-Hernández, C.M., Díaz-Asencio, M., Muñoz-Caravaca, A., Pannacciulli, F.G., Tangherlini, M., Regoli, F., 2004. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: importance in monitoring studies. Mar. Environ. Res. 58, 845-850.
- Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., 2006. Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. Chem. Ecol. 22, 405-414
- Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J., 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (Mytilus galloprovincialis) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquat. Toxicol. 99. 186-197.
- Fernández, B., Campillo, I.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, I., 2011, Micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels (Mytilus galloprovincialis) as biomarkers of cyto-genotoxic pollution in Mediterranean waters. Environ. Mol. Mutagen. 52, 479-491.
- Fitzpatrick, P.J., Krag, T.O.B., Hojrup, P., Sheehan, D., 1995a. Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, Mytilus edulis. Biochemi. J. 305, 145-150.
- Fitzpatrick, P.J., Sheehan, D., Livingstone, D.R., 1995b. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. Mar. Environ. Res. 39, 241–244.
- Fitzpatrick, P.J., O'Halloran, J., Sheehan, D., Walsh, A.R., 1997. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digesive gland of Mytilus edulis (L.), as a potential organic pollution biomarkers. Biomarkers 2, 51-56.
- Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., 1998. Arsenic species in marine samples. Croat. Chem. Acta. 71, 343-359.
- Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel Perna perna exposed to zinc. Chem. Biol. Interact. 160, 232-240.
- Frenzilli, G., Bocchetti, R., Pagliarecci, M., Nigro, M., Annarumma, D., Scarcelli, V., Fattorini, D., Regoli, F., 2004. Time-course evaluation of ROS-mediated toxicity in mussels, Mytilus galloprovincialis, during a field translocation experiment. Mar. Environ. Res. 58, 609-613.
- Gailer, J., Francesconi, K.A., Edmonds, J.S., Irgolic, K.J., 1995. Metabolism of arsenic compounds by the blue mussel Mytilus edulis after accumulation from seawater spiked with arsenic compounds. Appl. Organomet. Chem. 9, 341-355.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, Mytilus edulis? Ecotox. Environ. Safe. 61, 209-220.
- Geret, F., Bebianno, M.J., 2004. Does zinc produce reactive oxygen species in Ruditapes decussatus? Ecotox. Environ. Safe. 457, 399–409.
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch-A first step in global marine monitoring. Mar. Pollut. Bull. 6, 111-114.
- Gowland, B.T.G., McIntosh, A.D., Davies, I.M., Moffat, C.F., Webster, L., 2002. Implications from a field study regarding the relationship between polycyclic aromatic hydrocarbons and glutathione S-transferase activity in mussels. Mar. Environ. Res. 54, 231-235.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutation S-trasferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 240, 7130–7139. Ivankovic, D., Pavicic, J., Erk, M., Filipovic-Marijic, V., Raspor, B., 2005. Evaluation of
- the Mytilus galloprovincialis Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability. Mar. Pollut. Bull. 50, 1303-1313.
- Khessiba, A., Hoarau, P., Gnassia, B., Aissa, P., Romeo, M., 2001. Biochemical response of the mussel Mytilus galloprovincialis from Bizerta (Tunisia) to chemical pollutant exposure. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 222-229.
- Kitchin, K.T., 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis; modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. Toxicol. Appl. Pharmacol. 172, 249–261.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in Mytilus galloprovincialis and Mullus barbatus in an Italian coastal marine area. Mar. Pollut. Bull. 46, 324-330.
- Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. Adv. Comp. Environ. Physiol. 7, 46-118.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42, 656-666.
- Livingstone, D.R., García, M., Michel, X., Narbonne, J.F., O'Hara, S., Ribera, D., Winston, G.W., 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L, and other molluscs. Funct. Ecol. 4, 415-424.
- Livingstone, D.R., Lips, F., García, M.P., Pipe, R.K., 1992. Antioxidant enzymes in the
- digestive gland of the common mussel Mytilus edulis. Mar. Biol. 112, 265–276. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Luca-Abbott, S.B., Richardson, B.J., McClellan, K.E., Zheng, G.J., Martin, M., Lam, P.K.S., 2005. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (Perna viridis) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar. Pollut. Bull. 51, 694–707.

- Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2005. The point about oxidative stress in molluscs. I.S.J. 2, 91–104. Martínez-Gómez, C., Campillo, J.A., León, V., Fernández, B., Benedicto, J., 2007.
- Biomonitoring strategy to assess the effects of chemical pollution along the Iberian Mediterranean Coast: Present state and future development. ICES.CM I:11
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for
- erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049–6055. Michel, X.R., Suteau, P., Robertson, L.W., Narbonne, J.F., 1993. Effects of benzo[a]pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'hexachlorobiphenyl on the xenobiotics metabolizing enzymes in the mussel (Mytilus galloprovincialis). Aquat. Toxicol. 27, 335–344. Michel, X.R., Salaün, J.P., Galgani, F., Narbonne, J.F., 1994. Benzo[a]pyrene
- hydroxylase activity in the marine mussel Mytilus galloprovincialis: a potential marker of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbon-type compounds. Mar. Environ. Res. 38, 257-273.
- Michel, X.R., Beasse, C., Narbonne, J.F., 1995. In vivo metabolism of benzo[a]pyrene in the mussel Mytilus galloprovincialis. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28, 215-222
- Mitchelmore, C.L., Birmelin, C., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., 1998. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (Mytilus edulis L.) digestive gland cells. Aquat. Toxicol. 41, 193-212.
- Morcillo, Y., Porte, C., 1997. Interaction of tributyl- and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. Aquat. Toxicol. 38, 35-46.
- Morcillo, Y., Ronis, M.J.J., Porte, C., 1998. Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam Ruditapes decussata. Aquat. Toxicol. 42, 1-13.
- Moreira, S.M., Guilhermino, L., 2005. The use of Mytilus galloprovincialis acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese Coast. Environ. Monit. Assess. 105, 309-325.
- Neff, J.M., 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. Environ. Toxicol. Chem. 16, 917-927.
- Okay, O.S., Donkin, P., Peters, L.D., Livingstone, D.R., 2000. The role of algae (Isochrysis galbana) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel Mytilus edulis. Environ. Pollut. 110, 103-113.
- Omura, T., Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. J. Biol. Chem. 239, 2370-2378.
- Osman, A.M., Rotteveel, S., Den Besten, P.J., van Noort, P.C.M., 2004. In vivo exposure of Dreissena polymorpha mussels to the quinones menadione and lawsone: menadione is more toxic to mussels than lawsone. J. Appl. Toxicol. 24, 135-141.
- Osman, A.M., Van den Heuvel, H., van Noort, P.C.M., 2007. Differential responses of biomarkers in tissues of a freshwater mussel, Dreissen polymorpha, to the exposure of sediment extracts with different levels of contamination. J. Appl. Toxicol. 27, 51–59.
- OSPAR, 2004. Strategy for a Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). OSPAR Commission Reference number 17-E.
- Palanques, A., Díaz, J.I., Farran, M., 1995. Contamination of heavy metals in the suspended and surface sediment of the Gulf of Cadiz (Spain): the role of sources, currents, pathways and sinks. Oceanol. Acta. 18, 469-477.
- Pampanin, D.M., Camus, L., Gomiero, A., Marangon, I., Volpato, E., Nasci, C., 2005a. Susceptibility to oxidative stress of mussels (Mytilus galloprovincialis) in the Venice Lagoon (Italy). Mar. Pollut. Bull. 50, 1548-1557
- Pampanin, D.M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G., Nasci, C., 2005b. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus*) galloprovincialis) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). Environ. Pollut. 136, 103-107.
- Pavicic, J., Raspor, B., Martincic, D., 1993. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. Mar. Biol. 115, 435-444.
- Peters, L.D., Livingstone, D.R., 1998. Induction of molluscan cytochrome P450 monooxygenase system as a biomarker of organic pollution in environmental monitoring. In: Garrigues, P., Barth, H., Walker, C.H., Narbonne, J.F. (Eds.), Biomarkers in Marine Organisms. A Practical Approach. Elsevier Science, pp. 1-22
- Peters, L.D., Shaw, J.P., Nott, M., O'Hara, S.C.M., Livingstone, D.R., 1999. Development of cytochrome P450 as a biomarker or organic pollution in Mytilus sp.:field studies in UK ('Sea Empress' oil spill) and the Mediterranean Sea. Biomarkers 4, 425-441
- Pisoni, M., Cogotzi, L., Frigeri, A., Corsi, I., Bonacci, S., Iacocca, A., Lancini, L., Mastrototaro, F., Focardi, S., Svelto, M., 2004. DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in Mytilus galloprovincialis from different areas in Taranto coastal waters (Italy). Environ. Res 96 163-175
- Porte, C., Solé, M., Albaigés, J., Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of Mytilus sp. to organic pollution. Comp. Biochem. Phys. C. 100, 183-186.
- Porte, C., Biosca, X., Solé, M., Albaigés, J., 2000. The Aegean Sea oil spill in the Galicia coast (NW Spain). III. The assessment of long term sublethal effects on mussels. Biomarkers 5, 436-446.
- Porte, C., Solé, M., Borghi, V., Martínez, M., Chamorro, M., Torreblanca, A., Ortiz, M., Orbea, A., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2001a. Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel Mytilus galloprovincialis from the Spanish Mediterranean coast. Biomarkers 6, 335-350.

B. Fernández et al. / Chemosphere 87 (2012) 1235-1245

- Porte, C., Biosca, X., Solé, M., Albaigés, J., 2001b. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). Environ. Pollut. 12, 261–268.
- Prohaska, J.R., 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione Stransferases. Biochim. Biophys. Acta Rev. Bioenerg. 611, 87–98.
 Ramos-Martínez, J.I., Rodríguez-Bartolomé, T., Vázquez-Pernas, R., 1983.
- Ramos-Martínez, J.I., Rodríguez-Bartolomé, T., Vázquez-Pernas, R., 1983. Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Phys. B. 75, 689–692.
- 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.
- Richardson, B.J., Mak, E., Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): do mussels "integrate" biomarker responses? Mar. Pollut. Bull. 57, 503–514. Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. Comp. Biochem. Phys. C. 135, 49–59.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., Andre, V., Lebailly, P., Cachot, J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. Aquat. Toxicol. 79, 65–77.
- the Seine River. Aquat. Toxicol. 79, 65–77. Shi, H., Shi, X., Liu, K., 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. Mol. Cell. Biochem. 255, 67–78.
- Shin, P.K.S., Lam, W.K.C., 2001. Development of a marine sediment pollution index. Environ. Pollut. 113, 281–291.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J., 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. Aquat. Toxicol. 30, 271–283.
- Solé, M., Porte, C., Albaigés, J., 1995. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. Sci. Total. Environ. 159, 147–153.
 Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R.,
- Solé, M., Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., Livingstone, D.R., Albaigés, J., 1996. Effects of the Aegean Sea oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis L.*). Comp. Biochem. Phys. C. 113, 257–265.
- Solé, M., Peters, L.D., Magnusson, K., Sjolin, A., Granmo, A., Livingstone, D.R., 1998. Responses of the cytochrome P450 dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel *Mytilus edulis* L. to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea). Biomarkers 3, 49–63.
- Solé, M., Nasci, C., Livingstone, D.R., 2000. Study of the biological impact of organic contaminants on mussels (*Mytilus galloprovincialis L.*) from the Venice Lagoon, Italy: responses of CYP1A-immunopositive protein and benzo[a]pyrene hydroxylase activity. Biomarkers 5, 129–141.
- Stegeman, J.J., 1985. Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the western North Atlantic. Mar. Biol. 89, 21–30.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med. 18, 321–336.
- Sureda, A., Box, A., Tejada, S., Blanco, A., Caixach, J., Deudero, S., 2011. Biochemical responses of *Mytilus galloprovincialis* as biomarkers of acute environmental

pollution caused by the Don Pedro oil spill (Eivissa Island, Spain). Aquat. Toxicol. 101, 540-549.

- Suteau, P., Daubeze, M., Migaud, M.L., Narbonne, J.F., 1988. PAH-metabolizing enzymes in whole mussels as biochemical tests for chemical pollution monitoring. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 45–49.
- Thomas, D.J., Styblo, M., Lin, S., 2001. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. Toxicol. Appl. Pharmacol. 176, 127–144.
- Torres, M.A., Testa, C.P., Gaspari, C., Masutti, M.B., Panitz, C.M.N., Curi-Pedrosa, R., de Almeida, E.A., Di Mascio, P., Wilhelm, D., 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island. Brazil. Mar. Pollut. Bull. 44, 923–932.
- UNEP, 1997. The MED POL Biomonitoring Programme Concerning the Effects of Pollutants on Marine Organisms Along the Mediterranean Coasts. UNEP(OCA)/ MED WG. 132/3. Athens.15 pp.
- UNEP/RAMOGE, 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. Edited by UNEP. Athens. pp. 1–88. van Geen, A., Adkins, J.F., Boyle, E.A., Nelson, C.H., Palanques, A., 1997. A 120 yr
- van Geen, A., Adkins, J.F., Boyle, E.A., Nelson, C.H., Palanques, A., 1997. A 120 yr record of widespread contamination from mining of the Iberian pyrite belt. Geology 25, 291–294.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. Chem-Biol. Interact. 67, 219–226.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. Chemosphere 71, 1977–1985.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C. 104, 355–372.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J., 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus* galloprovincialis. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol. 277, 1312–1319.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothionein: a comparative overview. Cell. Mol. Biol. 46, 407–417. Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Campillo, J.A., Beiras, R., 2010. Integrated use of antioxidant
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Campillo, J.A., Beiras, R., 2010. Integrated use of antioxidant enzymes in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, for monitoring pollution in highly productive coastal areas of Galicia (NW Spain). Chemosphere 78, 265–272.
- Vlahogianni, T.H., Valavanidis, A., 2007. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Chem. Ecol. 23, 361–371.
- Wang, T.S., Shu, Y.F., Liu, Y.C., Jan, K.Y., Huang, H., 1997. Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenic. Toxicology 121, 229–237.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155. World Health Organization. Geneva.
- Won, S., Novillo, A., Custodia, N., Rie, M.T., Fitzgerald, K., Osada, M., Callard, A.P., 2005. The freshwater mussel (*Elliptio complanata*) as a sentinel species: vitellogenin and steroid receptors. Integr. Comp. Biol. 45, 72–80.
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. Mar. Pollut. Bull. 51, 623–634.

RECAPITULACIÓN:

En este Capítulo se han investigado los mecanismos de detoxificación de fase I y fase II a través de la determinación de las actividades enzimáticas benzo[a]pireno hidroxilasa- BPH, DTdiaforasa- DTD, y glutatión S-transferasa- GST, las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa-SOD, catalasa- CAT, glutatión peroxidasa- GP, y glutatión reductasa -GR, la concentración de metalotioneínas –MT, y la peroxidación lipídica – LPO, en glándula digestiva de mejillón procedente de 17 localizaciones de la costa mediterránea española. Se ha estudiado el comportamiento de estos biomarcadores y su relación con la acumulación de contaminantes (metales -Hg, Cd, Pb, Cu, Zn-, As, HAPs, PCBs y DDTs) en los tejidos de mejillón. Se ha investigado la respuesta integrada de los biomarcadores que ofrecieron una información toxicológica más relevante aplicando técnicas estadísticas de análisis multivariante (escalamiento multidimensional- MDS, y análisis clúster). Además, se ha analizado la capacidad de esta respuesta integrada para reflejar el grado de contaminación ambiental, simplificado a través del Índice de Contaminación (IC).

Los resultados de este Capítulo muestran que los niveles de BPH en glándula digestiva se correlacionaron con la concentración de contaminantes orgánicos en los tejidos de mejillón, aunque el rango de variación de ésta respuesta fue bajo en relación con el elevado gradiente de acumulación de estos compuestos observado. Las poblaciones de mejillón de Barcelona, Vallcarca, Tarragona y Cullera presentaron elevados niveles de daño oxidativo (LPO) en glándula digestiva. En estos organismos también se observa un desequilibrio de los sistemas de biotransformación de fase I y fase II, reflejado por elevados niveles de BPH y bajos niveles de DTD y GST, lo que parece estar ligado con la exposición y acumulación de compuestos orgánicos. También se detectaron elevados niveles de LPO en mejillones de Cadaqués e Islas Medas. En estos dos casos las señales de daño oxidativo observadas parecen estar relacionadas con la toxicidad del As, cuya concentración fue significativamente superior en estos organismos que en el resto de poblaciones de mejillón estudiadas. En general, el hecho de que los mejillones que presentaron evidencias de peroxidación lipídica (LPO) presentaran también bajos niveles de enzimas antioxidantes (CAT, SOG y GR) parece reflejar el agotamiento de estas defensas y/o su incapacidad para proteger del daño oxidativo. Por el contrario, los mejillones de Algeciras 2 mostraron bajos niveles de LPO a pesar de acumular elevadas concentraciones de compuestos orgánicos en sus tejidos (especialmente HAPs). Esto se relaciona con los elevados niveles de enzimas de fase I y II (BPH, DTD, GST), y GR observados en estos mejillones, que parecen constituir una eficiente defensa celular. Por otro lado, el elevado nivel de MT y CAT observado en mejillones que acumularon altas concentraciones de Cd en sus tejidos sugieren una eficiente protección de estas respuestas frente a la toxicidad del Cd. Por el contrario, los mejillones que mostraron mayores concentraciones de Zn en sus tejidos exhibieron bajos niveles de LPO y niveles medios de los biomarcadores estudiados, lo que refleja la ausencia de daño oxidativo en la glándula digestiva de estos mejillones.

La ordenación y agrupación de las poblaciones de mejillón estudiadas según la respuesta integrada de los biomarcadores no fue muy consistente con la distribución espacial de contaminantes observada. Los mejillones que acumularon menos contaminantes en sus tejidos (La Herradura, Almuñecar, Algeciras 1, Torrox y Manilva) se agruparon con mejillones que acumularon altas y medias concentraciones de contaminantes (Fuengirola, Portman, Cartagena, Algeciras 2 y Valencia) debido a sus bajos niveles de LPO y relativamente altos niveles de DTD, GST, CAT y MT. Por otro lado, la clasificación en un mismo grupo de los mejillones de Barcelona, Tarragona, Vallcarca, Cullera, Cadaqués, Islas Medas e Islas Columbretes fue más consistente con la mayor acumulación de contaminantes que presentaron en sus tejidos. En estos organismos las evidencias de daño oxidativo (altos niveles de LPO) se relacionaron con el desequilibrio en las enzimas de fase I y II y/o bajos niveles de enzimas antioxidantes y MT, que reflejarían la incapacidad y/o agotamiento de estos mecanismos de defensa celulares.

En general, los resultados muestran que la respuesta de los biomarcadores estudiados en glándula digestiva de mejillón está relacionada con el tipo y nivel de acumulación de contaminantes. No obstante, el estudio integrado de esta respuesta muestra que su utilidad para diagnosticar el impacto de los contaminantes en el medio marino es limitada, si consideramos a los compuestos analizados como los únicos causantes de los efectos biológicos observados. Estos efectos biológicos observados pueden estar relacionados con la exposición a otro tipo de contaminantes, con efectos sinérgicos o antagónicos en las respuestas estudiadas, así como con la influencia de parámetros biológicos y ambientales, no controlables en estas condiciones de campo.

CAPÍTULO IV

Especificidad tisular de la respuesta de biomarcadores en mejillón: glándula digestiva *vs* branquias. Uso integrado para la valoración de la calidad ambiental

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>

Los biomarcadores son medidas cuantificables a nivel molecular, bioquímico o celular que ofrecen la posibilidad de identificar la exposición y/o efectos de los contaminantes químicos sobre los organismos (Bayne *et al.* 1985; McCarthy y Shugart, 1990; Sarkar *et al.* 2006). En el medio marino los biomarcadores pueden actuar como una respuesta que integra y evalúa el deterioro ambiental, y sus consecuencias adversas para los organismos (Wu *et al.* 2005). Por ello, muchos biomarcadores han sido aplicados en algunos de los principales programas de monitorización de la contaminación ambiental nacionales e internaciones, mientras que otros se encuentran bajo revisión para su futura integración (NRC 1987; WHO 1993; UNEP 1997; OSPAR 2004; ICES 2008). El mejillón es una de las especies más utilizada en el seguimiento y evaluación de la calidad del medio marino, especialmente tras la implementación del Proyecto de Vigilancia con Mejillón - *Internacional Mussel Watch Project-* (Goldberg 1975; NOAA 1995). Esto se debe a su carácter sésil y filtrador, amplia distribución geográfica, y alta tolerancia al estrés ambiental, que le permiten acumular en sus tejidos los contaminantes presentes en el medio marino en concentraciones superiores a las de este medio, pero que las reflejan con bastante aproximación (Widdows y Donkin, 1992).

La naturaleza físico-química de cada contaminante es uno de los principales factores que determina sus flujos de entrada y salida a los ecosistemas, su distribución en la columna de agua, sedimento y biota, así como su comportamiento e impacto tóxico sobre la biota y los ecosistemas (Malins y Ostrander, 1991). El mejillón es capaz de captar los contaminantes directamente de la columna de agua, y por ingestión de partículas suspendidas y del sedimento (Yap et al. 2008). Los contaminantes que se encuentran en forma disuelta suelen ser absorbidos por superficies externas del cuerpo, como las branquias, mientras que los que se presentan en forma particulada suelen ser ingeridos adheridos al alimento. Por ejemplo, los metales pueden ser absorbidos en órganos como las branquias, glándula digestiva o la superficie del manto por difusión de iones o complejos, transporte mediado, y/o endocitosis y pinocitosis. La importancia relativa de cada uno de estos mecanismos depende fundamentalmente de la forma (especiación) del metal en el medio acuático (Roesijadi y Robinson, 1994). En cada tejido los contaminantes pueden ser acumulados a largo plazo, metabolizados, o excretados al medio externo a través del tegumento, excrementos, producción de biso, a través de la valva, o por emisión de gametos durante el desove (Cossa 1989). No obstante, durante su estancia en los distintos compartimentos celulares y tejidos de mejillón los contaminantes pueden generar efectos tóxicos. Los mecanismos de defensa celulares del mejillón frente a la toxicidad de estos contaminantes varían según el órgano o tejido considerado (Regoli y Principato 1995; Manduzio et al. 2004; Bebianno et al. 2005; Company et al. 2006; 2008; Box et al. 2007; Verlecar et al. 2008; Sáenz et al. 2010).

En los Capítulos II y III de esta Tesis se ha estudiado la respuesta de diversos biomarcadores en branquias y glándula digestiva de mejillón de la costa mediterránea española, y su relación con la acumulación de los principales contaminantes químicos presentes en el medio marino (metales pesados -Pb, Cd, Hg, Cu, Zn- y As, hidrocarburos aromáticos policíclicos -HAPs-, bifenilos policlorados -PCBs-, y pesticidas organoclorados -DDTs-). Entre los biomarcadores estudiados se incluyen enzimas implicadas en la biotransformación de compuestos orgánicos como la benzo(a)pireno hidroxilasa (BPH), DT-diaforasa (DTD) y glutatión S-transferasa (GST); enzimas relacionadas con la eliminación de radicales del oxígeno como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasas (GPs) y glutatión reductasa (GR); proteínas envueltas en la detoxificación de metales pesados como las metalotioneínas (MT), y un índice general de daño oxidativo, la peroxidación de las membranas lipídicas (LPO). En general, en las branquias se ha observado un incremento las actividades enzimáticas dependientes de glutatión (GR, GPs y GST) en relación con la acumulación de metales Hg, Cd y Pb, mientras que organismos con elevados niveles de compuestos orgánicos en sus tejidos han mostrado los mayores niveles de las actividades enzimáticas CAT y SOD. Estas respuestas en branquias parecen ejercer un papel protector contra la toxicidad de los radicales libres y el daño oxidativo. Por otro lado, en glándula digestiva se han observado evidencias de daño oxidativo (LPO) en mejillones que acumularon elevadas concentraciones de compuestos orgánicos en sus tejidos. Esto se ha relacionado con el desequilibrio detectado entre los componentes de las fases I y II del proceso de detoxificación (elevada BPH y bajos niveles de DTD y GST), y bajos niveles de varias enzimas antioxidantes. Las evidencias de daño oxidativo observadas en la glándula digestiva de mejillones de Cadaqués, Islas Medas, Barcelona e Islas Columbretes parecen estar relacionados con una elevada acumulación de As, mientras que los elevados niveles de MT y CAT detectados en glándula digestiva de los mejillones de Portmán, Islas Columbretes y La Herradura parecen constituir una respuesta defensiva a la acumulación de Cd en sus tejidos.

Estos estudios previos demuestran que existe un comportamiento de los biomarcadores estudiados que depende del grado de acumulación de contaminantes, y que es específico de cada tejido. En este contexto, los objetivos de este Capítulo son i) realizar un análisis estadístico comparativo de la respuesta de estos biomarcadores en branquias y glándula digestiva, y ii) estudiar mediante técnicas de análisis estadístico multivariante la respuesta integrada de estos biomarcadores en cada tejido y en ambos tejidos de forma conjunta para evaluar su capacidad para identificar el grado de contaminación del medio marino.

2. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>

2.1 <u>Análisis estadístico</u>

En los análisis estadísticos aplicados en este estudio se han utilizado los datos de DTD, GST, SOD, CAT, SeGP, nonSeGP, GR, MT y LPO medidos en branquias y glándula digestiva de mejillón procedente de 16 lugares de la costa mediterránea española (Figura 1). Se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas utilizando las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y Levene, respectivamente. Los datos se transformaron para alcanzar la normalidad y la homogeneidad de varianzas cuando fue necesario. No obstante, cuando los datos no cumplieron estas condiciones, se utilizaron test estadísticos no paramétricos. Para detectar la existencia de diferencias significativas en los biomarcadores entre branquias y glándula digestiva se aplicó el test de chi-cuadrado y/o la U de Mann Withney. Para estudiar la relación entre los biomarcadores evaluados, la acumulación de contaminantes químicos, y las variables ambientales, temperatura y salinidad, se utilizaron correlaciones de Pearson (dos colas). Estos análisis fueron aplicados utilizando el paquete estadístico SPSS 11.0. El nivel de significación estadística fue 0.05.





La evaluación integrada de los biomarcadores se hizo aplicando dos técnicas de análisis multivariante: el escalamiento multidimensional (MDS) y el análisis de clúster jerárquico aglomerativo. Ambos análisis se aplicaron a i) los biomarcadores evaluados en branquias, ii) los biomarcadores evaluados en glándula digestiva, y iii) los biomarcadores evaluados en ambos tejidos a la vez (18 variables). Estas técnicas investigaron la estructura del conjunto de variables y estaciones utilizando como punto de partida una matriz de similaridades construida a partir de los

datos estandarizados, y utilizando la distancia Euclidea. El resultado de cada MDS es una representación gráfica de las similitudes observadas entre cada par de estaciones, de modo que estas se posicionan en pocas dimensiones ajustándose lo máximo posible a las similitudes o distancias originales. El stress es una medida de la adecuación de la representación a las similitudes originales. Se considera que la bondad del ajuste es pobre si el stress es 0,2, regular si el stress es 0,1, buena si el stress es 0,05 y excelente si el stress es 0,025 (Linares 2001). El análisis de clúster jerárquico aglomerativo agrupa las estaciones en un número de clústeres en función de la similitud entre las variables que las caracterizan. Este análisis comienza con cada estación individualmente, y va haciendo grupos de mayor a menor similitud, uniéndolos finalmente en un único clúster. El método de unión usado fue el de la distancia mínima o "vecino más próximo". Para evaluar la significación estadística de las disimilitudes entre los distintos clústeres obtenidos se ha aplicado el test estadístico ANOSIM (equivalente a un ANOVA). Para analizar la contribución de cada variable al agrupamiento de estaciones se ha aplicado el test estadístico SIMPER.

Para evaluar la capacidad de los biomarcadores estudiados para reflejar la contaminación ambiental, a las representaciones obtenidas de los MDS y clústeres se ha superpuesto una clasificación de las poblaciones de mejillón estudiadas en función de la acumulación de contaminantes. Para ello, se ha aplicado el índice de contaminación (IC) desarrollado por Shim y Lam (2001) a los datos de concentraciones medias de Hg, Cd, Pb, Cu, As, HAPs, PCBs y DDTs en cada población de mejillón estudiada. Se aplicó la fórmula aritmética IC= $(\sum QiWi)^2/100$, donde Wi es el peso atribuido a cada contaminante i, y Qi es la acumulación de cada contaminante i en cada estación. Para calcular el peso atribuido a cada contaminante i (Wi, Tabla 1) se utiliza un Análisis de Componentes Principales (ACP) que identifica las variables más importantes y asigna distintos pesos a cada una de ellas en función de los autovalores asignados a cada componente principal extraído, y a la carga relativa asignada a cada variable dentro de cada componente principal. El ACP extrajo 3 componentes principales y se seleccionaron las variables cuya carga fue superior a 0,7, que fueron todas las incluidas inicialmente en el cálculo del IC.

El ratio de acumulación de cada contaminante (Qi, Tabla 2) varía de 0 (menor acumulación posible) a 100 (mayor acumulación posible), y se calcula basándose en el percentil del conjunto de datos de cada variable. Para cada uno de los contaminantes se asigna un 0 si la concentración de contaminante está por debajo del límite de detección analítico, 10 si el valor de acumulación del contaminante cae en el intervalo comprendido entre 0 y el percentil y 10, y 20 o 30 si el valor de acumulación del contaminante cae en el intervalo comprendido entre los valores del percentil 10 y 20 o 20 y 30, y así sucesivamente. El IC obtenido en cada estación (Tabla 2) puede oscilar entre 0 y 100, y refleja el grado de contaminación. No obstante, para simplificar la interpretación de los resultados, el rango de variación del IC (máximo – mínimo) se dividió aritméticamente en cuatro intervalos idénticos, y a cada estación se le asignó un IC del 1 al 4 en orden creciente de acumulación de contaminantes.

Componente	% Varianza	Autovalor	Autovalor relativo	Variable (i)	Carga	Carga Relativa	Wi
1	44.3	3.54	0.51	РСВ	0.959	0.264	0.134
				DDT	0.918	0.253	0.128
				Cu	0.907	0.250	0.126
				PAH	0.850	0.234	0.118
				Total	3.633		
2	30.6	2.45	0.35	Pb	0.957	0.360	0.126
				Hg	0.908	0.342	0.119
				Cd	0.793	0.298	0.104
				Total	2.658		
3	12.6	1.01	0.14	As	0.993	1.000	0.144
Total	87.5	7.00	1.00				

Tabla 1: Pesos (W) asignados a cada variable (i) por el ACP.

<u>**Tabla 2**</u>: Acumulación (Q) de cada contaminante (i) en las poblaciones de mejillón estudiadas e Índice de Contaminación (IC= $\sum QiWi)^2/100$).

Variable (i)	HAP		PCB		DDT		Hg		Cd		Pb		Cu		As		
Estación	Qi	QiWi	IC														
Cadaqués	50	5.9	60	8.0	60	7.7	30	3.6	50	5.2	30	3.8	30	3.8	90	12.9	26 (2)
Medas	40	4.7	50	6.7	50	6.4	40	4.8	70	7.3	40	5.0	40	5.1	100	14.4	30 (2)
Barcelona	100	11.8	100	13.4	100	12.8	80	9.6	40	4.2	90	11.3	100	12.6	80	11.5	76 (4)
Vallcarca	80	9.5	90	12.0	90	11.5	90	10.8	20	2.1	80	10.1	80	10.1	60	8.6	56 (3)
Tarragona	90	10.7	70	9.4	90	11.5	70	8.4	10	1.0	20	2.5	70	8.9	80	11.5	41 (3)
Columbretes	20	2.4	40	5.3	40	5.1	80	9.6	90	9.4	40	5.0	70	8.9	80	11.5	33 (2)
Valencia	80	9.5	90	12.0	80	10.2	60	7.2	30	3.1	60	7.6	90	11.4	40	5.7	45 (3)
Cullera	70	8.3	70	9.4	80	10.2	40	4.8	20	2.1	30	3.8	10	1.3	70	10.1	25 (2)
Portman	10	1.2	20	2.7	40	5.1	90	10.8	100	10.4	90	11.3	50	6.3	70	10.1	33 (2)
Cartagena	70	8.3	80	10.7	70	9.0	100	11.9	90	9.4	100	12.6	90	11.4	50	7.2	65 (4)
Almuñecar	50	5.9	30	4.0	30	3.8	30	3.6	40	4.2	70	8.8	40	5.1	30	4.3	16(1)
Herradura	30	3.6	10	1.3	20	2.6	50	6.0	80	8.3	10	1.3	20	2.5	20	2.9	8(1)
Torrox	60	7.1	30	4.0	50	6.4	10	1.2	60	6.3	80	10.1	60	7.6	10	1.4	19 (1)
Fuengirola	40	4.7	50	6.7	20	2.6	50	6.0	70	7.3	70	8.8	50	6.3	40	5.7	23 (1)
Manilva	20	2.4	20	2.7	10	1.3	20	2.4	70	7.3	20	2.5	20	2.5	30	4.3	6 (1)
Algeciras 1	30	3.6	40	5.3	30	3.8	20	2.4	50	5.2	50	6.3	30	3.8	30	4.3	12(1)
Algeciras 2	80	9.5	80	10.7	70	9.0	70	8.4	30	3.1	50	6.3	80	10.1	10	1.4	34 (2)

Entre paréntesis IC asignado tras dividir el rango de variación del IC obtenido entre estaciones en cuatro intervalos iguales. IC 1: $6 \le IC \le 23,5 \le IC \le 1$; IC 3: $41 \le IC \le 58,5 \le IC \le 76$

3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>

3.1. Especificidad tisular de los biomarcadores estudiados

Considerando el conjunto de datos obtenidos en las diferentes estaciones estudiadas, en glándula digestiva se observaron niveles significativamente superiores de MT, DTD, SOD y CAT a los de observados en branquias; las actividades de las enzimas nonSeGP, SeGP, GR y GST fueron significativamente superiores en branquias que en glándula digestiva; y no se detectaron diferencias significativas entre tejidos en los valores de LPO (Tabla 3). Aunque los niveles de MT, DTD, SOD, CAT, GPs, GR y GST fueron diferentes dependiendo del tejido, el número de estaciones con diferencias significativas entre los valores medios de cada biomarcador en glándula digestiva y branquias fue variable, como puede observarse en la Tabla 4. La relación entre los biomarcadores y la acumulación de contaminantes en los tejidos blandos de mejillón fue también distinta en cada tejido (Tabla 5). En las branquias las actividades enzimáticas SOD, CAT, GST, GPs, GR y CAT mostraron correlaciones positivas con la concentración de Hg, Cd y Pb; la GR con Zn, y la CAT con los HAPs. En glándula digestiva la CAT y las MT se correlacionaron positivamente con Cd; la SeGP y LPO se correlacionaron positivamente con los PCBs y DDTs; la GR se correlacionó negativamente con Pb, y la LPO se correlacionó negativamente con Zn y la temperatura, y positivamente con As y la salinidad.

VARIABLE	TEJIDO	Ν	MEDIA	SIG.
МТ	Glándula	105	149*	
IVI I	Branquias	102	28	0.000
DTD	Glándula	102	14.6*	
DID	Branquias	102	12.3	0.000
COT	Glándula	102	101	
651	Branquias	102	371*	0.000
SOD	Glándula	102	46*	
200	Branquias	102	40	0.031
CAT	Glándula	102	89*	
CAI	Branquias	102	44	0.000
n an SaCD	Glándula	102	12.2	
nonsegp	Branquias	102	MEDIA SIG. 149* 28 0.000 14.6* 12.3 0.000 101 371* 0.000 46* 40 0.03 89* 44 0.000 12.2 19.5* 0.000 13.9* 0.000 18.3 20.4* 0.013 2.22 2.42 0.155 0.000	0.000
S.CD	Glándula	102	9.6	
SegP	Branquias	102	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	0.000
CD	Glándula	102	18.3	
UK	Branquias	102	20.4*	0.013
LDO	Glándula	102	2.22	
LFU	Branquias	102	2.42	0.159

<u>Tabla 3</u>: Valores medios de los biomarcadores medidos en glándula digestiva y branquias

*indica valor significativamente superior (p<0.05, T-student o U-Mann Withney)

	ΓŪ	D^{I}	GST	- -	SO	D^2	CA	\mathbf{T}^{3}	nonSe	GP ¹	Set	JP ¹	Ū	R¹	Μ	\mathbf{T}^4	LP	05
	BR	GL	BR	GL	BR	GL	BR	GL	BR	GL	BR	GL	BR	GL	BR	GL	BR	ΒL
I Medas	9.0∓0.6	$14.7 \pm 1.4^{*}$	$306\pm30*$	120 ± 20	$30{\pm}1$	$48\pm8^*$	40±3 6	57±12*	$14.7\pm 2.0*$	9.1 ± 2.3	10.2 ± 0.6	9.0±2.5	15.0±1.3	20.2±3.2*	39±2	$139\pm42*$	2.07 ± 0.08	$4.07\pm0.71*$
Barcelona	12.3 ± 1.7	14.0 ± 3.9	$334\pm 33*$	109 ± 24	30 ± 2	57±17*	44±2 9	€1±22	$15.6\pm 1.2^{*}$	10.0 ± 4.0	12.1 ± 1.2	9.7±2.9	$15.4{\pm}1.7$	$21.2\pm 3.8*$	44±3	$158\pm 17*$	2.08 ± 0.16	$3.95\pm0.66*$
Vallcarca	10.4 ± 0.5	$13.3\pm 2.0*$	$298\pm 23*$	83±13	42±3	45±19	48±3 6	55±14*	20.9 ± 1.3	17.0 ± 3.4	12.8 ± 0.7	$15.6\pm 3.1*$	16.2 ± 0.5	18.3 ± 2.1	44 ± 4	$149\pm 20^{*}$	1.97 ± 0.12	$4.24\pm0.86^{*}$
Tarragona	$8.1{\pm}1.5$	10.5 ± 1.8	$347\pm30*$	85±15	55±2*	38±12	49±4 8	$31\pm16^{*}$	$24.2\pm 2.2*$	15.7 ± 2.0	$16.2\pm 1.5*$	10.6 ± 2.5	14.3 ± 1.2	14.1 ± 2.9	34±2	$121\pm 28*$	$2.04{\pm}0.20$	$3.64{\pm}1.05{*}$
I Columbretes	10.5 ± 1.2	14.1 ± 3.2	$545\pm 18*$	122 ± 22	$43\pm 2^{*}$	34±7	32±3 1	137±12*	$20.0\pm 2.0*$	10.6 ± 3.1	$13.0\pm 1.3*$	7.5±1.8	14.0 ± 0.6	$17.7 \pm 0.9 *$	38 ± 2	$166\pm 26^{*}$	2.17 ± 0.23	2.97 ± 1.43
Valencia	13.0 ± 1.5	15.1 ± 1.6	$344\pm15*$	$93{\pm}10$	34 ± 1	30±7	55±3 7	73±16*	$18.7\pm 1.4*$	14.3 ± 1.7	$11.4{\pm}1.4$	10.3 ± 4.0	16.6 ± 1.0	18.5 ± 2.6	44 ± 1	$117\pm 29*$	1.71 ± 0.14	1.19 ± 0.17
Cullera	$15.8\pm 1.1^{*}$	11.5 ± 2.4	356±33*	80±6	$44\pm1^*$	35±8	44±4 7	79±13*	$16.0\pm 1.3*$	10.3 ± 4.1	9.5 ± 0.8	8.8 ± 3.2	16.0 ± 2.1	15.8 ± 1.6	36±5	$137\pm32*$	$1.71{\pm}0.13$	$2.69{\pm}1.70{*}$
Portman	13.5 ± 1.3	13.6 ± 4.0	728±23*	96±11	40 ± 1	42 ± 10	40±2 1	123±27*	$26.0\pm1.0*$	11.9 ± 2.4	$18.3\pm 1.1^{*}$	$8.3 {\pm} 0.8$	$32.5\pm1.5*$	14.6 ± 3.5	48 ± 4	$202\pm40*$	$2.25\pm0.08*$	$0.95{\pm}0.15$
Cartagena	13.2 ± 1.1	14.1 ± 3.7	783±28*	105 ± 12	$59\pm 3*$	38±8	57±5 7	*6777	27.1±2.5*	12.4 ± 3.2	$23.7\pm 2.0*$	10.0 ± 2.9	$33.6{\pm}1.8{*}$	14.1 ± 2.1	$39{\pm}4$	$146\pm 20^{*}$	$1.80 \pm 0.17 *$	1.46 ± 0.52
Almuñecar	10.8 ± 1.0	$19.2 \pm 4.4^{*}$	$325\pm 12*$	103 ± 13	40 ± 2	$64\pm 14^{*}$	33±2 1	106±18*	$21.6\pm 1.4*$	16.1 ± 2.8	$14.9\pm 1.1^{*}$	10.7 ± 1.8	$24.0\pm1.5*$	17.2 ± 3.5	40 ± 2	$155 \pm 37*$	$2.21 \pm 0.12^{*}$	1.21 ± 0.20
Herradura	13.6 ± 2.1	15.3 ± 1.9	$345 \pm 36^{*}$	107 ± 17	43 ± 2	$91{\pm}18{*}$	38±4 9)8±13*	$22.0\pm1.6*$	14.0 ± 2.3	$15.9\pm 1.8^{*}$	10.6 ± 1.9	$28.3\pm 2.1*$	17.4 ± 2.5	38 ± 2	$162\pm 24*$	$2.21 \pm 0.13*$	1.12 ± 0.21
Torrox	12.5 ± 0.5	$17.9\pm 2.4*$	$211\pm 25*$	95±14	32±2	37±15	35±3 9	€1±17	16.1 ± 1.6	13.5 ± 2.7	$13.8 \pm 1.1^{*}$	10.4 ± 1.9	17.8 ± 2.4	18.1 ± 2.3	27±3	$143\pm 24*$	$1.98 \pm 0.16^{*}$	1.66 ± 0.23
Fuengirola	14.7 ± 1.3	14.6 ± 2.4	$263\pm 25*$	94±13	40 ± 2	$55\pm 13^{*}$	44±3 8	$39\pm10^{*}$	$19.5 \pm 1.1 *$	12.6±3.2	$16,3\pm 0.9*$	$8.1{\pm}2.0$	$28.0\pm 2.9*$	19.0 ± 2.4	33±3	$143\pm 23*$	$2.28\pm0.09*$	1.28 ± 0.20
Manilva	11.1 ± 0.6	$14.1\pm 2.5*$	257±24*	79±11	47 ± 1	37±13	47±3 7	$77\pm10^{*}$	$15.7\pm 1.1*$	7.6±2.7	$11.4 \pm 0.7 *$	6.3 ± 2.8	20.9 ± 2.2	21.3 ± 3.2	32±6	$170\pm 25*$	$1.91 \pm 0.07 *$	$1.30 {\pm} 0.10$
Algeciras 1	12.4 ± 1.5	14.9 ± 2.3	$296\pm 28*$	95±10	33 ± 2	43±7*	34±3 1	107±21*	15.6 ± 1.2	15.7±1.7	11.0 ± 1.2	11.2 ± 2.6	17.9 ± 2.9	23.4 ± 1.9	39 ± 2	$138{\pm}18{*}$	$2.22\pm0.13*$	1.35 ± 0.56
Algeciras 2	13.3 ± 1.1	$18.4\pm4.4*$	$203\pm14*$	112 ± 12	44 ± 2	51±9	54±4 8	87±18*	$18.6 \pm 1.5 *$	9.4 ± 3.0	$13.7\pm 1.3*$	7.0±2.7	17.7 ± 1.6	21.7 ± 3.8	31 ± 3	$141\pm17*$	$1.53\pm0.12*$	1.25 ± 0.26
¹ nmol min nivel p<0.0	⁻¹ mg prot ⁻¹ ; 5 (T-studen	² U min ⁻¹ m _i t o U-Mann	g prot ⁻¹ ; ³ μι (Withney).	nol min ⁻¹	mg prot	t ⁻¹ ; ⁴ µg g ⁻	l; ⁵ nmo	I mg prot	1; * indica c	que los valc	ores medios	son signific	ativamente	diferentes ei	n branqu	iias y gláne	dula digestiv	a al

Tabla 4: Valores medios (± desviación estandar) de DTD, GST, SOD, CAT, nonSeGP, SeGp, GR, MT y LPO en branquias y glándula digestiva.

					BRANQU	JIAS					
	Hg	Cd	Pb	Cu	Zn	As	HAPs	PCBs	DDTs	Temp	Sal
DTD	0.09	0.20	0.20	-0.12	0.48	-0.37	-0.24	-0.10	-0.18	0.57*	-0.33
GST	0.74**	0.77***	0.86***	0.08	-0.15	0.08	-0.22	-0.04	-0.11	0.45	0.44
SOD	0.57*	0.22	0.45	-0.14	-0.01	-0.30	0.10	-0.12	-0.17	0.34	0.02
CAT	0.50*	-0.20	0.37	0.39	-0.15	-0.10	0.50*	0.47	0.29	0.26	-0.10
nonSeGP	0.61*	0.51*	0.67**	-0.01	-0.01	-0.25	-0.01	-0.02	-0.09	0.59*	0.16
SeGP	0.75**	0.62*	0.79***	0.06	0.29	-0.27	-0.02	-0.06	-0.18	0.64**	0.03
GR	0.51	0.70**	0.69**	-0.23	0.60*	-0.31	-0.42	-0.27	-0.37	0.71**	-0.03
MT	0.23	0.21	0.34	0.35	-0.41	0.24	0.01	0.46	0.43	0.03	0.54*
LPO	-0.15	0.42	-0.03	-0.16	0.33	0.12	-0.38	-0.25	-0.12	-0.22	0.36
				GLÁI	NDULA D	IGESTIV	'A				
	Hg	Cd	Pb	Cu	Zn	As	HAPs	PCBs	DDTs	Temp	Sal
DTD	-0.15	-0.03	-0.14	-0.05	0.43	-0.26	-0.18	-0.18	-0.28	0.39	-0.69**
GST	0.16	0.41	0.08	0.27	-0.06	0.45	0.00	-0.06	-0.13	0.17	-0.19
SOD	-0.15	0.12	-0.16	-0.04	0.38	-0.08	0.00	-0.03	0.00	0.16	-0.23
CAT	-0.13	0.54*	0.04	-0.10	0.18	-0.22	-0.31	-0.39	-0.34	0.19	-0.08
nonSeGP	0.01	-0.19	-0.03	-0.07	-0.05	-0.34	-0.01	0.13	0.16	0.04	0.15
SeGP	0.13	-0.29	0.02	0.14	-0.27	-0.06	0.12	0.50*	0.55*	-0.17	0.37
GR	-0.44	-0.35	-0.51*	0.16	0.28	0.06	0.06	0.12	0.10	-0.41	-0.36
MT	0.09	0.65**	0.34	-0.11	0.28	-0.08	-0.37	-0.16	-0.08	0.21	0.14
LPO	-0.02	-0.34	-0.19	0.39	-0.70**	0.64**	0.46	0.54*	0.67**	-0.66**	0.54*

<u>**Tabla 5**</u>: Coeficientes de correlación los biomarcadores estudiados en glándula digestiva y branquias, la concentración de contaminantes en tejidos blandos de mejillón, temperatura y salinidad.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Glándula: n=17. Branquias: n=16.

Diversos estudios con mejillón han observado que las enzimas antioxidantes y otros biomarcadores presentan un diferente comportamiento en glándula digestiva y branquias (Regoli y Principato, 1995; Bebianno *et al.* 2005; Company *et al.* 2006, 2008). Concretamente, resultados similares a los nuestros han sido encontrados por Box *et al.* (2007), que observaron mayores actividades CAT y SOD en glándula digestiva que en branquias de *M. galloprovincialis*; Sáenz *et al.* (2010), que detectaron mayor actividad CAT en glándula digestiva que en branquias, y mayor GST y GR en branquias que en glándula digestiva de *Perna perna*; Manduzio *et al.* (2004), que observaron mayores niveles de GST, GP y GR en branquias que en glándula digestiva que en branquias de *M. edulis*; y Verlecar *et al.* (2008), que detectaron mayores niveles de SOD en glándula digestiva que en branquias de *Perna viridis.* Las razones que explican estos distintos niveles de actividades enzimáticas en mejillón son difíciles de establecer pero parecen estar relacionadas con la estructura, función y composición de cada tejido, que en conjunto regulan su capacidad para acumular contaminantes y, por lo tanto, la capacidad de los contaminantes para generar toxicidad en cada uno de ellos.

Los contaminantes hidrofóbicos tienden a acumularse en mayor grado en los tejidos con un mayor contenido en lípidos. Este es el caso de la glándula digestiva y el manto de mejillón (Farrington 1991; Ribera *et al.* 1991; Widdows y Donkin, 1992; Livingstone y Pipe 1992; Phillips 1993; Canova *et al.* 1998; Almeida *et al.* 2003). El contenido en lípidos de la glándula digestiva de

mejillón es aproximadamente un 7%, mientras que en otros tejidos oscila entre el 3 y el 5% (De Zwaan y Mathieu, 1992; Meador et al. 1995). De hecho, Bebianno et al. (2007) observaron que la acumulación de PCBs en glándula digestiva de M. galloprovincialis fue 3 veces mayor que en las branquias, mientras que Canova et al. (1998) y Akcha et al. (1999) mostraron que la glándula digestiva fue el principal tejido donde se acumuló el benzo[a]pireno en mejillón tras una exposición en laboratorio. La acumulación específica de compuestos orgánicos en la glándula digestiva explicaría el elevado nivel de LPO detectado en la glándula digestiva de mejillones que presentaron elevadas concentraciones de compuestos orgánicos en sus tejidos, en contraste con la ausencia de evidencias de LPO observada en branquias. Del mismo modo, las señales de LPO observadas en la glándula digestiva de mejillones que acumularon elevados niveles de As en sus tejidos sugirieren que este compuesto se acumuló en mayor grado en la glándula digestiva, donde ejerció su toxicidad. Aunque el As inorgánico predomina en agua marina y sedimentos, los organismos marinos suelen acumularlo en formas orgánicas no tóxicas como arsenobetaina, arsenocolina y arsenoazúcares (Francesconi y Edmonds, 1998; Fattorini et al. 2004, 2006). Sin embargo, el mejillón también puede acumular en bajo porcentaje As inorgánico de elevada toxicidad (arsenito (As III) y arsenato (As V)) (Gailer et al. 1995). Entre los efectos deletéreos de los compuestos de As (p.e. generación de EROs, reducción de GSH, inhibición de enzimas y daño al ADN) se incluye la peroxidación de lípidos (Sharma y Sohn, 2009). La correlación positiva observada entre los niveles de LPO en glándula digestiva y las concentraciones de PCBs, DDTs (y casi de HAPs) y As en los tejidos blandos de mejillón (Tabla 5) apoyan el hecho de que estos compuestos están implicados en el daño oxidativo observado en este tejido.

Los mejillones son capaces de regular la concentración corporal de metales esenciales presentes en el medio acuático en un amplio rango de concentraciones. Por el contrario, no son capaces de regular los niveles de metales no esenciales, cuya acumulación está casi universalmente determinada por el grado de exposición al que están sometidos, debido a que los metales no esenciales no son eliminados o su tasa de excreción es muy baja (Amiard *et al.* 1987; Lakshmanan y Nambisan, 1989; Bleeker *et al.* 1992; Langston *et al.* 1998). Los principales factores que determinan la acumulación de metales en los tejidos de mejillón son la existencia de contacto directo entre el tejido y el medio acuático, el estado fisiológico del organismo, la biodisponibilidad (especiación química) del metal, y sus mecanismos de excreción (Luoma 1983). Si los metales están disueltos éstos se acumulan principalmente en tejidos como branquias y manto, mientras que si la entrada de metales se produce a través del alimento, éstos se suelen compartimentalizar en tejidos y orgánulos de almacenamiento de tipo glandular como la glándula digestiva o los lisosomas, respectivamente (Amiard 1987; Viarengo y Nott, 1993). En este sentido, las branquias constituyen la principal conexión entre el mejillón y el medio acuático (Landrum *et al.* 1996; Rajalaksmi y Mohandas, 2005) actuando como la principal vía de entrada de los iones metálicos disueltos (Regoli y Principato,

1995; Doyotte *et al.* 1997; Almeida *et al.* 2005; Lorenzo *et al.* 2005), donde estos se acumulan activamente (George y Coombs, 1977; Nolan *et al.* 1984; Balogh y Salanki, 1987).

Varios estudios con mejillón han demostrado que metales no esenciales como Hg, Cd y Pb se acumulan más rápidamente y en mayor grado en branquias que en tejidos como manto, músculo o glándula digestiva (Roesijadi y Fellingham, 1987; Canesi et al. 1999; Raspor et al. 1999; Serra et al. 1999; Marigómez et al. 2002; Domouhtsidou et al. 2004; Dragun et al. 2004; Geffard et al. 2004; Shi y Wang, 2004). Por ejemplo, tras exponer al mejillón Bathymodiolus azoricus a Hg disuelto la mayor acumulación de este metal se produjo en las branquias (75% del contenido corporal), seguido del manto (13%), glándula digestiva (7%), biso (3%) y pie (2%) (Kádár et al. 2005). La correlación positiva detectada entre varias de las enzimas antioxidantes estudiadas (SOD, CAT, SeGP, nonSeGP, GR y GST) en branquias y la acumulación de Hg, Cd y Pb (Tabla 5) podría relacionarse con la acumulación preferencial de estos metales en las branquias, donde el incremento de estas actividades enzimáticas reflejaría una adaptación frente a su toxicidad. Se sabe que las branquias de los bivalvos tienen un papel fundamental en el metabolismo de los metales no esenciales, y que constituyen un lugar activo para su excreción, por encima de la glándula digestiva (Cossu et al. 1997; Geret et al. 2002). Esto parece estar relacionado con el contacto directo de las branquias con el medio acuático externo, que las hace más susceptibles al estrés oxidativo provocado por este tipo de contaminantes, y a las fluctuaciones en los parámetros físico-químicos del agua, que son capaces de influir sobre los sistemas de defensa antioxidante en mejillón (Viarengo et al. 1991; Kirchin et al. 1992; Power y Sheehan, 1996; Filho et al. 2001; Lau et al. 2004; Manduzio et al. 2004; Petrovic et al. 2004; Khessiba et al. 2005; Bocchetti y Regoli 2006; Prevodnik et al. 2007; Verlecar et al. 2007, 2008). Concretamente la temperatura del agua es el parámetro ambiental que mayor influencia ejerce sobre la fisiología y metabolismo del mejillón (Riva y Masse, 1983; Massé y Parache, 1984; Rajagopal et al. 2005; Anestis et al. 2007). La correlación positiva detectada entre algunas de las enzimas evaluadas en branquias (DTD, GR, SeGP y nonSeGP) y la temperatura del agua, en contraste con lo observado en glándula digestiva (Tabla 5), parece reflejar esta mayor susceptibilidad y capacidad del sistema antioxidante en branquias frente a las oscilaciones en la temperatura del agua.

Las oscilaciones de la salinidad también influyen sobre el metabolismo y fisiología del mejillón. Por ejemplo, el estrés salino (37 a 11 psu) en *M. galloprovincialis* incrementó el consumo de oxígeno, redujo el índice de condición, aumentó la susceptibilidad al daño oxidativo en el ADN, redujo la supervivencia en aire, influyó en las MT, y desestabilizó la membrana de los lisosomas (Nicholson 2001; Hamer *et al.* 2008). Además, diferencias regionales en la salinidad del agua pueden influir en la capacidad de los mejillones para superar el estrés oxidativo (Bebianno *et al.* 2007; Prevodnik *et al.* 2007). Aunque no se ha aclarado el mecanismo que controla estos efectos, se sabe que la salinidad influye sobre la especiación de los contaminantes en el medio marino y, por lo

tanto, sobre su biodisponibilidad y acumulación en mejillón (Johnston y Corbett, 1986), que aumenta al disminuir la salinidad (Phillips 1976; Bjerregaard y Depledge 1994; Mubiana *et al.* 2005; Wepener *et al.* 2008). Los resultados de este trabajo muestran una correlación negativa de la DTD en glándula digestiva con la salinidad, una correlación positiva de la LPO en glándula digestiva con la salinidad, y una correlación positiva de las MT en branquias con la salinidad (Tabla 5). A pesar de estas correlaciones, el estrecho rango de variación de la salinidad observado en el área de estudio, inferior a 2 psu (excluido el menor valor de salinidad de Algeciras 2- 34,3 psu- debido a la influencia del Río Guadarranque), no parece ser suficiente para afectar a los biomarcadores estudiados.

Como se ha señalado anteriormente, los metales pesados disueltos penetran principalmente a través de las branquias, acumulándose activamente en este tejido durante la exposición. Sin embargo, estos metales pueden ser posteriormente movilizados y redistribuidos en otros tejidos, especialmente la glándula digestiva. De hecho, la glándula digestiva es un importante órgano de acumulación y detoxificación de metales en mejillón (Herwig et al. 1989; Soto y Marigómez, 1997; Marigómez et al. 2002), especialmente en el caso de los metales esenciales como Cu (Geffard et al. 2004) y Zn (Pentreath 1978; Martincic et al. 1984; Geffard et al. 2004), y particularmente en exposiciones crónicas o a largo plazo (Serra et al. 1999; Irato et al. 2003; Cosson et al. 2008). Esto parece estar relacionado con el lento proceso de excreción de los metales esenciales en mejillón. Por ejemplo, Roesijadi et al. (1984) observaron que el Zn tardó más de 6 meses en ser eliminado de los tejidos de mejillón tras su trasplante desde un lugar contaminado a uno limpio. Los principales mecanismos de detoxificación de metales pesados en mejillón son su inmovilización en las MT, su incorporación en orgánulos ricos en metales, como los lisosomas, o su excreción al medio externo a través del tegumento, valvas, excrementos, producción de biso, o por emisión de gametos durante el desove (Cossa 1989; Marigómez et al. 2002; Desouky 2006; Cravo et al. 2009). Los mayores niveles de MT observados en la glándula digestiva, 5,4 veces superiores a los de branquias, coinciden con numerosos estudios que señalan a la glándula digestiva como el órgano donde se encuentra la mayor concentración de MT en mejillón, y donde las MT tienen mayor capacidad de inducción (Pavicic et al. 1993; Amiard et al. 1998, Porte et al. 2001; Marigómez et al. 2002, Mourgaud et al. 2002; Geffard et al. 2005; Raftopoulou et al. 2006). Los mayores niveles de MT observados en este estudio en glándula digestiva que en branquias parecen estar relacionados con la acumulación preferencial en este tejido de metales esenciales, como Cu y Zn, donde gran parte de ellos se encontrarían ligados a las MT o secuestrados en el sistema lisosómico de las células digestivas (Marigómez et al. 1995; Dimitriadis y Papadaki, 2004). Además, la correlación detectada entre las MT en glándula digestiva y la acumulación de Cd en los tejidos blandos de mejillón sugiere que, tras una fase inicial de mayor acumulación en branquias, el Cd es movilizado hacia este órgano, donde las MT pueden evitar su interacción con otras macromoléculas celulares. La relación entre las MT evaluadas en glándula digestiva de mejillón y la exposición a Cd ha sido demostrada en numerosos trabajos de laboratorio (Bebianno y Langston 1991, 1992, 1999, Pavicic *et al.* 1993; Serra et al. 1999; Viarengo *et al.* 2001) y campo (Couillard *et al.* 1993; Geffard *et al.* 2005; Ivankovic *et al.* 2005; Pampanin *et al.* 2005).

De modo similar a las MT, la mayor actividad CAT observada en glándula digestiva en comparación con las branquias (Tabla 3), y su correlación con la concentración de Cd en los tejidos blandos de mejillón (Tabla 5), sugieren la implicación de esta enzima en la protección contra la toxicidad del Cd en este tejido. En contraste, la mayor actividad de las enzimas GPs, GR y GST observada en branquias que en glándula digestiva podría compensar los menores niveles de CAT observados en branquias. Concretamente la GST fue 3,7 veces superior en branquias que en glándula digestiva, lo que pudo suplir en parte la función de la CAT en branquias, ya que la GST puede actuar como peroxidasa cuando la actividad de otras enzimas es baja (Power y Sheehan, 1996; Sheehan y Power, 1999; Almeida *et al.* 2005). Esto coincidió con Bebianno *et al.* (2007) que observaron que la proporción de GST acumulada en *M. galloprovincialis* fue de un 58% en branquias, 17% en glándula digestiva, 10% en manto, 8% en pie, y 7 % en gónadas. Además, las branquias de mejillón son capaces de excretar hidroperóxidos directamente al agua, evitando que alcancen una elevada concentración en éste tejido (Wilhelm-Filho *et al.* 1994).

3.2 Uso integrado de biomarcadores para la evaluación de la calidad ambiental

El índice de contaminación (IC) clasificó en un orden creciente de acumulación de contaminantes químicos en los tejidos blandos de mejillón con un 1 a los organismos de Manilva, La Herradura, Algeciras 1, Almuñecar y Torrox, con un 2 a los mejillones de Islas Medas, Islas Columbretes, Cullera, Portmán y Algeciras 2, con un 3 a los mejillones de Vallcarca, Valencia y Tarragona, y con un 4 a los organismos de Barcelona y Cartagena (Tabla 2). Los MDS y clústeres aplicados sobre los biomarcadores evaluados en glándula digestiva y branquias se muestran en la Figura 2.

Los análisis estadísticos multivariante de los biomarcadores evaluados en branquias (Figura 2B) y en glándula digestiva y branquias (Figura 2C) diferenciaron dos grupos de mejillones con una disimilitud significativa (branquias: ANOSIM, R global=0,998, p=0,8%; branquias y glándula: ANOSIM, R global =0,865, p=0,8%).

Figura 2: Ordenación y agrupación de las poblaciones de mejillón estudiadas según análisis MDS y clúster en A) glándula, B) branquias y C) ambos tejidos conjuntamente. La forma y color de los marcadores indican la clasificación de las poblaciones según su índice de contaminación (IC).



Los mejillones de Cartagena y Portmán integraron el primer grupo, mientras que el segundo grupo incluyó al resto de poblaciones de mejillón estudiadas. El análisis SIMPER en branquias (Figura 2B) reveló que las enzimas SOD (33%), CAT (25%), y SeGP (24%) contribuyeron en mayor grado a la similitud de los organismos de Cartagena y Portmán, mientras que CAT (23%) y MT (13%) en glándula digestiva, y SOD (18%), CAT (14%) y SeGP (13%) en branquias contribuyeron en mayor grado a la similitud de estos organismos en el análisis integrado de ambos tejidos (Figura 2C). En ambos casos los mejillones de Cartagena y Portmán mostraron elevados niveles de estos biomarcadores. Por el contrario, en el MDS de glándula digestiva (Figura 2C) los organismos de Portmán y Cartagena fueron incluidos, junto con los de Algeciras 2 (IC 2) y Valencia (IC 3), en el mismo grupo que los mejillones con IC 1 (La Herradura, Almuñecar, Algeciras 1, Fuengirola, Torrox y Manilva). Esto se debió fundamentalmente a su similitud en la respuesta de nonSeGP, CAT, LPO (todas 19%) y SeGP (16%). El segundo grupo de estaciones observado en el MDS de glándula digestiva (Figura 2A) agrupó a los organismos de Islas Medas, Barcelona, Tarragona, Vallcarca, Islas Columbretes y Cullera, con IC 2, 3 y 4 (ANOSIM, R global=0.829, p=0.1%). La variable que más contribuyó a la disimilitud entre estos dos grupos del MDS de glándula digestiva fue la LPO (65%). Dentro de cada uno de estos grupos se establecieron sub-grupos secundarios de mayor similitud conformados por Barcelona-Islas Medas, Cullera-Tarragona y Herradura-Almuñecar.

En branquias el MDS (Figura 2B) mostró que las enzimas GR (20%), GST (18%), CAT, SOD (ambas 11%) y DTD (10%) fueron las que más contribuyeron a las similitudes en el segundo grupo de estaciones, mientras que la GST (50%) fue la variable que más influyó en la disimilitud entre ambos grupos. En este segundo grupo del MDS de branquias las estaciones con IC mayor de 1 (a excepción de Algeciras 2) mostraron más similitud entre sí que con las de IC 1, aunque sólo fueron significativas las disimilitudes observadas entre Tarragona-Columbretes y el resto de estaciones de este grupo (ANOSIM, R global = 0,851, p = 2,8%). También Fuengirola, Almuñecar y La Herradura, con IC 1, se incluyeron en un sub-grupo significativamente distinto al del resto de estaciones de este segundo grupo (ANOSIM, R global = 0,467, p= 2,2%).

En el MDS aplicado a los biomarcadores evaluados en los dos tejidos (Figura 2C) se distinguieron dos sub-grupos dentro del segundo grupo de estaciones (ANOSIM, R global = 0,815, p=0,1%), debido principalmente a su distinto nivel de LPO en glándula digestiva (48%). El primer sub-grupo incluyó todas las estaciones con IC 1 (Herradura, Fuengirola, Almuñecar, Manilva, Torrox, Algeciras 1), Algeciras 2 (IC 2) y Valencia (IC 3). Se observa cómo los mejillones de Algeciras 2 y Valencia mostraron un comportamiento similar de estos biomarcadores a pesar de sus relativamente altos niveles de PCBs, DDTs (Valencia) y HAPs (Algeciras 2). En general, estos organismos se caracterizaron por presentar niveles medios de actividad SOD y SeGP en glándula digestiva, bajo nivel de GR en branquias, y bajo nivel de LPO en glándula digestiva. Por otro lado, el

segundo sub-grupo de este MDS incluyó a los organismos de Cullera, Islas Columbretes, Islas Medas, con IC 2, Vallcarca y Tarragona, con IC 3, y Barcelona, con IC 4, debido fundamentalmente a sus bajos niveles de SeGP, nonSeGP y CAT (todos 10%), y elevados niveles de LPO (12%) en glándula digestiva, y bajos niveles de GST (8%), SOD (7%) y DTD (6%) en branquias. Estos bajos niveles enzimáticos en branquias y glándula digestiva, y elevados niveles de LPO en glándula digestiva parecen reflejar una situación de estrés ambiental relacionada fundamentalmente con una contaminación de carácter orgánico, excepto en Islas Medas e Islas Columbretes, donde la contaminación fue de carácter fundamentalmente metálico: por As en el primer caso, y por Cd y Hg en el segundo caso. Además, dentro de ambos sub-grupos de este MDS se identificaron más similaridades entre: Fuengirola-La Herradura-Almuñecar, Algeciras 2-Manilva-Algeciras 1-Torrox-Valencia, Islas Medas-Cullera-Barcelona, y Vallcarca-Tarragona.

En resumen, el MDS y el análisis clúster integrado de los biomarcadores evaluados en glándula digestiva y branquias (Figura 2C) fueron los que más ajustadamente reflejaron el grado de acumulación de contaminantes en mejillón (IC). Así, se diferenciaron a los organismos de Cartagena y Portmán, caracterizados por una elevada acumulación de metales en sus tejidos, del resto de poblaciones de mejillón estudiadas. Dentro de este segundo grupo de estaciones, las poblaciones de mejillón que acumularon un menor nivel de contaminantes en sus tejidos (con la excepción de Valencia y Algeciras 2) fueron también diferenciadas de aquellas sometidas a mayor grado de contaminación, fundamentalmente contaminación de carácter orgánico y por As.

Conclusiones

La glándula digestiva parece ser el principal tejido diana para los contaminantes orgánicos en mejillón, donde estos contaminantes se relacionan con el daño oxidativo (LPO) y los bajos niveles de enzimas antioxidantes (GPs, CAT) observados. La elevada respuesta de las MT y CAT en glándula digestiva parece constituir una defensa frente a la toxicidad del Cd en este tejido. En branquias elevados niveles de las enzimas GST, SOD, CAT, GPs, GR parecen estar relacionados con la acumulación preferencial en este tejido de metales pesados no esenciales Hg, Cd y Pb. Así mismo, la relación detectada entre la respuesta de algunas enzimas antioxidantes (DTD, GPs, GR) en branquias y la temperatura del agua indica la sensibilidad del epitelio branquial a las fluctuaciones de este parámetro ambiental, y su capacidad de incrementar su respuesta antioxidante para contrarrestar una mayor generación de oxiradicales a mayor temperatura del agua.

En general i) los organismos expuestos a bajos niveles de contaminación se caracterizan por la ausencia de daño oxidativo y bajos o medios niveles de actividades enzimáticas y MT en branquias y glándula digestiva, ii) niveles de los biomarcadores estudiados en glándula digestiva y branquias significativamente superiores o inferiores a los encontrados en organismos expuestos a bajos niveles de contaminación reflejan una situación de estrés oxidativo, y en estos casos: ii.a) elevados niveles de los mecanismos de defensa celulares estudiados parecen proteger frente al estrés oxidativo, y ii.b) bajos niveles de respuesta parecen reflejar el agotamiento o incapacidad de estas defensas para proteger del daño oxidativo.

Los análisis multivariantes muestran que el comportamiento de los biomarcadores estudiados es distinto en glándula digestiva y branquias. La ordenación y agrupación de las poblaciones de mejillón estudiadas más consistente con el IC es la obtenida al integrar la respuesta de los biomarcadores en ambos tejidos. No obstante, la capacidad de estos biomarcadores para reflejar el grado de contaminación fue limitada, ya que algunas poblaciones de mejillón con elevados IC fueron agrupadas junto con poblaciones sometidas a una baja contaminación, y otras poblaciones de mejillón con altos IC presentaron una respuesta de los biomarcadores similar a la de organismos que acumularon bajos niveles de contaminantes. Hay que tener en cuenta, no obstante, que el IC usado en este trabajo es una simplificación de la contaminación "real", que da el mismo peso a todos los contaminantes, o las consecuencias de una exposición a un tipo de contaminación específica (metales o compuestos orgánicos). En este sentido, la respuesta ofrecida por los biomarcadores estudiados ofrece el valor añadido de integrar el efecto provocado por la exposición real a los contaminantes presentes en el medio marino, y reflejar el estado general de los organismos estudiados.

Referencias

- Akcha F, Burgeot T, Venier P, Narbonne JF. 1999. Relationship between kinetics of benzo[a]pyrene bioaccumulation and DNA binding in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Bull Environ Contamin Toxicol 62:455-462.
- Almeida EA, Bainy ACD, Loureiro APM, Medeiros MHG, Di Mascio P. 2003. DNA and lipid damage in the brown mussel *Perna perna* from a contaminated site. Bull Environ Contam Toxicol 71:270-275.
- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, Gomes OF, Medeiros MHG, Di Mascio P. 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. J Exp Mar Biol Ecol 318:21-30.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthet B, Metayer C. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. J Exp Mar Biol Ecol 106:73-89.
- Amiard JC, Geffard A, Amiard-Triquet C. 1998. Metallothioneins in mussels *Mytilus edulis* as a biomarker of metallic pollution: variability between sites, season and organs. J Rech Oceanogr 23:25-30.
- Anestis A, Lazou A, Portner HO, Michaelidis B. 2007. Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. Am J Physiol 293:R911-921.
- Balogh VK, Salanki J. 1987. Biological monitoring of heavy metal pollution in the region of lake Balaton (Hungary). Acta Biol Hung 38:13–30.
- Bayne BL, Brown, DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DA, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD, Widdings J. 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger. Nueva York. USA.
- Bebianno MJ, Langston WJ. 1991. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Mar Biol 108:91-96.
- Bebianno MJ, Langston WJ. 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus* galloprovincialis. Comp Biochem Physiol C 103:79-85.

- Bebianno MJ, Langston WJ. 1999. Metallothionein induction in mussels exposed to a metal mixture. En Klaassen CD (ed). *Metallothionein IV*. Birkhäuser. 187-194.
- Bebianno MJ, Company R, Serafim A, Camus L, Cosson RP, Fiala-Medoni A. 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. Aquat Toxicol 75:354-373.
- Bebianno MJ, Lopes B, Guerra L, Hoarau P, Ferreira AM. 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. Environ Int 33:550-558.
- Bjerregaard P, Depledge MH. 1994. Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: The influence of salinity and calcium ion concentration. Mar Biol 119:385–395.
- Bleeker EAJ, Kraak MHS, Davids C. 1992. Ecotoxicity of lead to the zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. Hydrobiol Bull 25:233-236.
- Bocchetti R, Regoli F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. Chemosphere 65:913-921.
- Box A, Sureda A, Galgani F, Pons A, Deudero S. 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp Biochem Physiol C 146:531-539.
- Canesi L, Viarengo A, Leonzio C, Filippelli M, Gallo G. 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. Aquat Toxicol 46:67-76.
- Canova S, Degan P, Peters LD, Livingstone DR, Voltan R, Venier P. 1998. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. Mutat Res 399:17-30.
- Company R, Serafim A., Cosson R, Fiala-Medioni A, Dixon D, Bebianno MJ. 2006. Temporal variation in the antioxidant defence system and lipid peroxidation in the gills and mantle of hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. Deep Sea Research 53:1101-1116.
- Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala-Medioni A, Camus L, Colacof A, Serrao-Santos R, Bebianno MJ. 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. Sci Total Environ 389:407-417.
- Cossa D. 1989. A review of the use of *Mytilus* spp. as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in costal waters. Oceanologica Acta 12:417-432.
- Cosson RP, Thiebaut E, Company R, Castrec-Rouelle M, Colaco A, Martins I, Sarradin PM, Bebianno MJ. 2008. Spatial variation of metal bioaccumulation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. Mar Environ Res 65:405-415.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P. 1997. Glutathione reductase, seleniumdependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotoxicol Environ Saf 28:122-131.
- Couillard Y, Campbell PGC, Tessier A. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. Limnol Oceanogr 38:299-313.
- Cravo A, Lopes B, Serafim A, Company R, Barreira L, Gomes T, Bebianno MJ. 2009. A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. J Environ Monitor 11:1673-1686.
- de Zwaan A, Mathieu M. 1992. Cellular biochemistry and endocrinology. En Gosling E (ed). *The mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier. New York. USA.
- Desouky MMA. 2006. Tissue distribution and subcellular localization of trace metals in the pond snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role of lysosomal granules in metal sequestration. Aquat Toxicol 77:143–152.
- Dimitriadis VK, Papadaki M. 2004. Field application of autometallography and X-ray microanalysis using the digestive gland of the common mussel. Ecotoxicol Environ Saf 59:31-37.
- Domouhtsidou GP, Dailianis S, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. 2004. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers Combination with trace metal concentrations. Mar Pollut Bull 48:572-586.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat Toxicol 39:93-110.
- Dragun Z, Erk M, Raspor B, Ivankovic D, Pavicic J. 2004. Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Environ Int 30:1019-1025.
- Farrington JW. 1991. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. Environ Health Persp 90:75-84.

- Fattorini D, Alonso-Hernández CM, Díaz-Asencio M, Muñoz-Caravaca A, Pannacciulli FG, Tangherlini M, Regoli F. 2004. Chemical speciation of arsenic in different marine organisms: Importance in monitoring studies. Mar Environ Res 58:845-850.
- Fattorini D, Notti A, Regoli F. 2006. Characterization of arsenic content in marine organisms from temperate, tropical, and polar environments. Chem Ecol 22:405-414.
- Filho DW, Tribess T, Gaspari C, Claudio FD, Torres MA, Magalhaes ARM. 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel *Perna perna*. Aquaculture 203:149-158.
- Francesconi KA, Edmonds JS. 1998. Arsenic species in marine samples. Croat Chem Acta 71:343-359.
- Gailer J, Francesconi KA, Edmonds JS, Irgolic KJ. 1995. Metabolism of arsenic compounds by the blue mussel Mytilus edulis after accumulation from seawater spiked with arsenic compounds. Appl Organomet Chem 9:341-355.
- Geffard A, Jeantet AY, Amiard JC, Le Pennec M, Ballan-Dufrancais C, Amiard-Triquet C. 2004. Comparative study of metal handling strategies in bivalves *Mytilus edulis* and *Crassostrea gigas*: a multidisciplinary approach. J Mar Biol Ass UK 84:641-650.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC. 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*?. Ecotoxicol Environ Saf 61:209-220.
- George SG, Coombs TL. 1977. The effects of chelatin agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. Mar Biol 39:261–278.
- Geret F, Jouan A, Turpin V, Bebianno MJ, Cosson RP. 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). Aquat Living Res 15:61-66.
- Goldberg ED. 1975. The Mussel Watch: a first step in global marine monitoring. Mar Poll Bull 6:111-114.
- Hamer B, Jaksic Z, Pavicic-Hamer D, Perik L, Medakovic D, Ivankovic D, Pavicic J, Zilberberg C, Schröred HC, Müller WEG, Smodlaka N, Batel R. 2008. Effect of hypoosmotic stress by low salinity acclimation of Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* on biological parameters used for pollution assessment. Aquat Toxicol 89:137-151.
- Herwig HJ, Brands F, Kruitwagen E, Zandee DI. 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. Aquat Toxicol 15:269-286.
- ICES 2008: ICES Advice. Book 1: Development of proposals for environmental assessment criteria.
- Irato P, Santovito G, Cassini A, Piccinni E, Albergoni V. 2003. Metal accumulation and binding protein induction in *Mytilus galloprovincialis*, *Scapharca inaequivalvis*, and *Tapes philippinarum* from the lagoon of Venice. Arch Environ Cont Toxicol 44:476-484.
- Ivankovic D, Pavicic J, Erk M, Filipovic-Marijic V, Raspor B. 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: Seasonal and spatial variability. Mar Pollut Bull 50:1303-1313.
- Johnston JJ, Corbett MD. 1986. The effects of salinity and temperature on the in vitro metabolism of the organophosphorus insecticide fenitrothion by the blue crab, *Callinectes sapidus*. Pest Biochem Physiol 26: 193-201.
- Kádár E, Costa V, Santos RS, Lopes H. 2005. Behavioral response to the bioavailability of inorganic mercury in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. J Experimental Biol 208:505-513.
- Khessiba A, Romeo M, Aissa P. 2005. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. Env Pollut 133:275-281.
- Kirchin MA, Wiseman A, Livingstone DR. 1992. Seasonal and sex variation in the mixed function oxygenase system of the digestive gland microsomes of the common mussel *Mytilus edulis* L. Comp Biochem Physiol C 101:81-91.
- Lakshmanan RT, Nambisan PNK. 1989. Bioaccumulation and depuration of some trace metals in the mussel, *Perna viridis* (Linnaeus). Bull Environ Contamin Toxicol 43:131-138.
- Landrum PF, Harkey GA, Kukkonen J. 1996. Evaluation of organic contaminant exposure in aquatic organisms: the significance of bioconcentration and bioaccumulation. En Newman MC, Jagoe CH (eds): *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*. Lewis Publishers. Tokio. 85–131.
- Langston WJ, Bebianno MJ, Burt G. 1998. Metal handling strategies in molluscs. En Langston WJ, Bebianno MJ (eds): *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapmann and Hall. Londres. 219–284.
- Lau PS, Wong HL, Garrigues Ph. 2004. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. Continent. Shelf Res 24:1969-1987.
- Linares G. 2001. Escalamiento multidimensional: conceptos y enfoques. Revista Investigación Operacional 22:173-173.
- Livingstone DR, Pipe RK. 1992. Mussels and environmental contaminants: Molecular and cellular aspects. En Gosling E (ed): *The mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier. Nueva York. 425-464.

- Lorenzo JI, Beiras R, Mubiana VK, Blust R. 2005. Copper uptake by *Mytilus edulis* in the presence of humic acids. Environ Toxicol Chem 24:973–980.
- Luoma SN. 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms—A review. Sci Total Environ 28:1-22.

Malins DC, Ostrander GK 1991. Perspectives in aquatic toxicology. Annu Rev Pharmacol Toxicol 31:371-399

- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher B. 2004.Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoforme of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat Toxicol 70:83-93.
- Marigómez I, Soto M, Cajaraville MP. 1995. Morphofunctional patterns of tissue systems involved in metal handling and metabolism. En Cajaraville MP (ed): *Cell Biology in Environmental Toxicology*. Universidad País Vasco. Bilbao. España. 89-134.
- Marigómez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. Microsc Res Tech 56:358–392.
- Martincic D, Nurnberg HW, Stoeppler M, Branica M. 1984. Bioaccumulation of heavy metals by bivalves from Lim Fjord (North Adriatic Sea). Mar Biol 81:177-88.
- Massé H, Parache A. 1984. Évolution de la tolérance thermique de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck en fonction des températures saisonnières: comparaison de la sensibilité thermique d'individus provenant de populations différentes. Haliotis 14:111-118.
- McCarthy JF, Shugart LR. 1990. Biological Markers of Environmental Contamination. En McCarthy JF, Shugart LR (eds): *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers. Florida. 3-14.
- Meador JP, Stein JE, Reichert WL, Varanasi U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. Rev Environ Contam Toxicol 143:79-165.
- Mourgaud Y, Martinez E, Geffard A, Andral B, Stanisiere JY, Amiard JC. 2002. Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. Biomarkers 7:479-490.
- Mubiana VK, Qadah D, Meys J, Blust R. 2005. Temporal and spatial trends in heavy metal concentrations in the marine mussel *Mytilus edulis* from the Western Scheldt Estuary (The Netherlands). Hydrobiologia 540:169–180.
- Nicholson S. 2001. Ecocytological and toxicological responses to copper in *Perna viridis* (L.) (Bivalvia: Mytilidae) haemocyte lysosomal membranes. Chemosphere 45:399-407.
- NOAA 1995. International Mussel Watch Project. The Initial Implementation Phase Final Report. May 1995. International Mussel Watch Committee. http://www.ccma.nos.noaa.gov/ publications/tm95.pdf//.
- Nolan C, Duke E, Lorenzon G, Sabbioni E, Marafante E. 1984. Heavy metal uptake and intracellular binding in isolated gill preparations of *Mytilus galloprovincialis* L. Sci Total Environ 40:83–92.
- NRC 1987. Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. Environ Health Persp 74:3-9.
- OSPAR 2004. Strategy for a Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP). OSPAR Commission, reference number 2004-17-E.
- Pampanin DM, Marangon I, Volpato E, Campesan G, Nasci C. 2005. Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy). Environ Pollut 136:103-107.
- Pavicic J, Raspor B, Martincic D. 1993. Quantitative determination of metallothionein-like proteins in mussels. Methodological approach and field evaluation. Mar Biol 115:435-444.
- Pentreath RJ. 1973. The accumulation from water of ⁶⁵Zn, ⁵⁴Mn, ⁵⁸Lo and ⁵⁹Fe by the mussel, *Mytilus edulis*. J Mar Biol Assoc UK 53:127-143.
- Petrovic S, Semencic L, Ozetic B, Orzetic M. 2004. Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). Mar Pollut Bull 49:713–720.
- Phillips D JH. 1976. The common mussel, *Mytilus edulis* as indicator of pollution by Zinc, Cadmium, Lead and Copper-1, effect of environmental variables on uptake of metals. Mar Biol 38:59-69.
- Porte C, Biosca X, Solé M, Albaigés J. 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). Environ Pollut 112:261-268.
- Power A, Sheehan D. 1996. Seasonal variation in the antioxidant defence system of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. Comp Biochem Physiol C 114:99-103.
- Prevodnik A, Gardeström J, Lilja K, Elfwing T, McDonagh B, Petrovic N, Tedengren M, Sheehan D, Bollner T. 2007. Oxidative stress in response to xenobiotics in the blue mussel *Mytilus edulis* L.: Evidence for variation along a natural salinity gradient of the Baltic Sea. Aquat Toxicol 82:63-71.
- Raftopoulou EK, Dailianis S, Dimitriadis VK, Kaloyianni M. 2006. Introduction of cAMP and establishment of neutral lipids alterations as pollution biomarkers using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarkers. Sci Total Environ 368:597-614.

- Rajagopal S, Van der Gaag M, Van de Velde G, Jenner HA. 2005. Upper temperature tolerances of exotic brackish-water mussel, *Mytilopsis leueophaeata* (Conrad): An experimental study. Mar Environ Res 60:512-530.
- Rajalakshmi S, Mohandas A. 2005. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. Ecotoxicol Environ Saf 62:140–143.
- Raspor B, Pavicic J, Kozar S, Kwokal Z, Paic M, Odzak N, Ujevic I, Klajakovic Z. 1999. Assessment of metal exposure of marine edible mussels by means of a biomarker. En Klaassen CD (ed): *Metallothionein IV*. Birkhäuser. 629-632.
- 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.
- Ribera D, Narbonne JF, Michel X, Livingstone DR, O'Hara S. 1991. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. Comp Biochem Physiology C 100:177-181.
- Riva A, Masse H. 1983. Etude ecophysiologique de quelques mollusques bivalves. Bases biologiques de l'Aquaculture. Act Colloques. Montpellier 1:45–62.
- Roesijadi G, Young JS, Drum AS, Gurtisen JM. 1984. Behavior of trace metals in *Mytilus edulis* during a reciprocal transplant field experiment. Mar Ecol Prog Ser 18:155-170.
- Roesijadi G, Fellingham GW. 1987. Influence of Cu, Cd and Zn preexposure on Hg toxity in the mussel *Mytilus edulis*. Canadian J Fisheries Aquat Sci 44:680-684.
- Roesijadi G, Robinson WE. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. Capítulo 9. En Malins DC, Ostrander GK.: Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives. Lewis Publisher. 387-420.
- Saénz LA, Seibert EL, Zanette J, Fiedler HD, Curtius AJ, Ferreira JF, de Almeida EA, Marques MRF, Bainy ACD. 2010. Biochemical biomarkers and metals in *Perna perna* mussels from mariculture zones of Santa Catarina, Brazil. Ecotox Environ Saf 73:796-804.
- Sarkar A, Ray D, Shrivastava A, Sarker S. 2006. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology 15:330-340.
- Serra R, Isani G, Tramontano G, Carpene E. 1999. Seasonal dependence of cadmium accumulation and Cdbinding proteins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. Comp Biochem Physiol C 123:165-174.
- Sharma VK, Sohn M. 2009. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. Environ Int 35:743-759.
- Sheehan D, Power A. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp Bioch Physiol C 123:193-199.
- Shi D, Wang WX. 2004. Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu and Zn. Environ Pollut 132:265–277.
- Shin PKS, Lam WKC. 2001. Development of a marine sediment pollution index. Environ Pollut 113:281-291.
- Soto M, Marigómez I. 1997. BSD extent, an index for metal pollution screening based on the metal content within digestive cell lysosomes of mussels as determined by autometallography. Ecotoxicol Environ Saf 37:141–151.
- UNEP 1997. Report of the meeting of experts to review the MED POL biomonitoring programme. UNEP(OCA)/MED WG. 132/7. Atenas. Grecia.
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN. 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. Chem-Biol Interact 167:219-226.
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN. 2008. Modulation of antioxidant defences in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposures. Chemosphere 71:1977-1985.
- Viarengo A, Nott JA. 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp Biochem Physiol C 104:355–372.
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. Comp Biochem Physiol C 100:187-190.
- Viarengo A, Burlando B, Evangelisti V, Mozzone S, Dondero F. 2001. Sensitivity and specificity of metallothionein as a biomarker for aquatic environment biomonitoring. En *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*. Elsevier. 29-43.
- Wepener V, Bervoets L, Mubiana V, Blust R. 2008. Metal exposure and biological responses in resident and transplanted blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Scheldt estuary. Mar Pollut Bull 57:624-631.
- WHO 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. World Health Organization. Genova.
- Widdows J, Donkin P. 1992. Mussels and environmental contaminants: Bioaccumulation and physiological aspects. En Gosling E (Ed.): *The mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier. Amsterdam. 383-424.

- Wilhelm-Filho DW, Gonzalez-Flecha B, Boveris A. 1994. Gill diffusion as a physiological mechanism for
- hydrogen peroxide elimination by fish. Braz J Med Biol Res 27:2879–2882.
 Wu RSS, Siu WHL, Shin PKS. 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. Mar Pollut Bull 51:623-634.
- Yap CK, Hatta Y, Edward FB, Tan SG. 2008. Distribution of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Ni, Fe and Zn) in the different soft tissues and shells of wild mussels Perna viridis collected from Bagan Tiang and Kuala Kedah. Malaysian Appl Biol 37:1-10.

RECAPITULACIÓN:

El objetivo de los Capítulos II y III de esta Tesis ha sido el estudio de una batería de biomarcadores (DT-diaforasa -DTD, glutatión S-transferasa -GST, superóxido dismutasa -SOD, catalasa -CAT, glutatión peroxidasa -GP, glutatión reductasa -GR, metalotioneínas -MT y peroxidación de las membranas lipídicas -LPO) evaluados en glándula digestiva y branquias de mejillón procedente de la costa mediterránea española. A la vista de las diferencias observadas en el comportamiento de estos biomarcadores en las branquias y glándula digestiva, y su distinta relación con la acumulación de contaminantes en mejillón, en este Capítulo se hace un análisis comparativo de la respuesta de estos biomarcadores en cada tejido, y se evalúa su respuesta integrada, y su capacidad para diagnosticar la contaminación ambiental.

Se ha observado que los niveles medios de estos biomarcadores son diferentes dependiendo del tejido, glándula digestiva o branquias, a excepción de la LPO, que no mostró diferencias significativas entre tejidos. Los niveles medios de MT, DTD, SOD y CAT fueron superiores en glándula digestiva, y los de GPs, GR y GST en branquias. La diferente relación de estos biomarcadores en cada tejido con la acumulación de contaminantes parece estar relacionada con las diferencias estructurales, funcionales y de composición que existen entre glándula digestiva y branquias.

La correlación positiva observada entre los niveles de LPO en glándula digestiva y la acumulación de contaminantes orgánicos en los tejidos blandos de mejillón se relaciona con la tendencia de estos compuestos hidrofóbicos para bioacumularse en tejidos con mayor contenido en lípidos, como es el caso de la glándula digestiva. Por otro lado, el daño oxidativo detectado en la glándula digestiva de mejillones de Cadaqués e Islas Medas parece estar relacionado con la toxicidad del arsénico en este tejido.

La correlación positiva detectada entre las actividades enzimáticas SOD, CAT, SeGP, nonSeGP, GR y GST en branquias y la acumulación de metales no esenciales Hg, Cd y Pb parece relacionarse también con la acumulación de este tipo de contaminantes de forma prioritaria en las branquias. El incremento de estas actividades enzimáticas en branquias indicaría una adaptación en estos organismos para evitar los posibles daños ocasionados por la capacidad de los metales para generar EROs. Las correlaciones anteriores, y la correlación detectada entre las actividades enzimáticas DTD, GR y GPs y la temperatura del agua apoyan la idea de que el contacto directo del epitelio branquial con el medio externo hace de las branquias un órgano sensible a las fluctuaciones en este parámetro ambiental, y al estrés oxidativo provocado los contaminantes metálicos. No obstante, la glándula digestiva es también un importante órgano de acumulación de metales pesados, especialmente de metales esenciales como Cu y Zn, hacia donde éstos son movilizados tras su entrada en mejillón. De hecho, el mayor nivel de MT observado en glándula digestiva parece estar

relacionado con la mayor acumulación en este tejido de los metales esenciales Cu y Zn, donde gran parte de ellos se encontrarían unidos a las MT. Así mismo, la correlación detectada entre las MT en glándula digestiva y el Cd sugiere una movilización de este metal hacia la glándula, donde su unión con las MT evitaría su toxicidad. Los niveles de la enzima CAT presentaron un comportamiento antioxidante diferente al del resto de enzimas estudiadas en glándula digestiva y branquias. Mientras que en las branquias la CAT presentó una alta actividad en mejillones con elevados niveles de compuestos orgánicos, en glándula digestiva tuvo un comportamiento similar al de las MT, relacionado fundamentalmente con la acumulación de Cd.

En general, la ordenación y agrupación de las poblaciones de mejillón ofrecida por la integración de la respuesta de los biomarcadores en branquias y glándula digestiva fue, de todas las estudiadas, la que más se aproximó a la obtenida con el Índice de Contaminación (IC). El escalamiento multidimensional y análisis clúster aplicados a estos datos diferenciaron y agruparon las poblaciones de mejillón que acumularon un menor nivel de contaminantes en sus tejidos de aquellas sometidas a mayor grado de contaminación, con la excepción de dos puntos: Algeciras 2 y Valencia. Estas estaciones con elevado IC se clasificaron en función de los biomarcadores junto con las de menor IC. En términos generales i) los organismos expuestos a bajos niveles de contaminación orgánica y metálica se caracterizaron por bajos o medios niveles de MT, de las actividades enzimáticas estudiadas, y de LPO en branquias y glándula digestiva, ii) los organismos expuestos a mayores niveles de contaminantes orgánicos y/o metálicos ,como As y Cd, se caracterizaron por presentar bajos niveles de las enzimas estudiadas y altos niveles de LPO en la glándula digestiva, y iii) los mejillones que acumularon elevados niveles de metales no esenciales Hg, Cd y Pb presentaron elevados niveles de actividad enzimática en branquias y ausencia de daño oxidativo en ambos tejidos, lo que indica la eficiente protección antioxidante.

CAPÍTULO V

Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) como biomarcadores de contaminación cito-genotóxica en aguas mediterráneas

RESUMEN:

En este estudio se ha investigado la genotoxicidad y citotoxicidad ambiental a través de la determinación de los niveles de micronúcleos (MN) y otras anormalidades nucleares, tales como la frecuencia de puentes nucleares (PN) y de células binucleadas (BN) en branquias de mejillón silvestre, Mytilus galloprovincialis, de 17 lugares de la costa mediterránea española. Los resultados obtenidos fueron estudiados en relación con la acumulación de los principales tipos de contaminantes (metales: Pb, Hg, Cd, Cu, Zn- y As, HAPs, PCBs y DDTs) en los tejidos de mejillón, los niveles de varias actividades enzimáticas antioxidantes en branquias, y las variables ambientales, temperatura y salinidad. Las frecuencias más altas de MN y PN fueron observadas en mejillones de sitios contaminados por metales, como Cartagena (MN: 11,6%; PN: 4,6%) y Portmán (MN: 8,0%; PN: 3,5‰). Estos indicios de genotoxicidad se han relacionado con una situación de estrés oxidativo debido a la exposición a metales. Las elevadas frecuencias de MN y NB observadas en mejillones de Algeciras 1 (MN: 8,6%; PN: 4,0%) y de MN (7,2%) observadas en mejillones de Manilva indicaron genotoxicidad, aunque en este caso no atribuible a los contaminantes analizados, ya que éstos presentaron bajos niveles en estos organismos. Por otro lado, las frecuencias de MN observadas en mejillones de sitios caracterizados por una alta contaminación orgánica, tales como Barcelona, Vallcarca, Tarragona y Valencia, fueron menores de las esperadas (oscilando entre 3,8 y 5,8‰) considerando los niveles de contaminación orgánica en estos lugares. Por el contrario, las evidencias de citotoxicidad indicadas por las altas frecuencias de BN observadas en mejillones de Vallcarca, Barcelona y Cartagena (3,9, 3,4, y 2,3‰, respectivamente) parecen estar específicamente relacionadas con la acumulación de compuestos orgánicos. Las correlaciones positivas encontradas entre las frecuencias de MN y PN, y también entre ambos tipos de anormalidades nucleares y la temperatura del agua sugieren que ambos eventos genotóxicos están relacionados, y que la temperatura del agua influye en su génesis y niveles. Este hecho debe de ser considerado en la aplicación de estos biomarcadores en estudios de campo.
Research Article

Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels (Mytilus galloprovincialis) as Biomarkers of Cyto-genotoxic Pollution in Mediterranean Waters

Beatriz Fernández, Juan Antonio Campillo,^{*} Concepción Martínez-Gómez, and José Benedicto

Spanish Institute of Oceanography (IEO), Marine Environment and Environmental Protection Area, Oceanographic Centre of Murcia, Varadero 1, 30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

Environmental genotoxicity and cytotoxicity along the Spanish Mediterranean coast was investigated through the determination of levels of micronuclei (MN) and other nuclear abnormalities (NAs) such as nuclear buds (NB) and binucleated cells (BN) in gills of wild mussels, Mytilus galloprovincialis, from 17 study sites. The results obtained were studied in relation to the exposure to main pollutants (metals, PAHs, PCBs and DDTs), gill antioxidant enzyme activities and environmental variables (temperature and salinity). The highest MN and NB levels were found in mussels from metalpolluted sites, such as Cartagena (MN: 11.6%, NB: 4.6‰) and Portman (MN: 8.0‰, NB: 3.5‰), where genotoxicity seemed to be related to the oxidative stress generated by exposure to metals. High frequencies of MN and NB in mussels from Algeciras 1 (MN: 8.6‰, NB: 4‰) and of MN (7.2%) in mussels from Manilva also indicated genotoxicity, though not attributable to the pollutants analysed. In contrast, MN levels at sites highly polluted by organic contaminants such as Barcelona, Vallcarca, Tarragona and Valencia, were lower than expected (ranging from 3.8 to 5.8‰). On the other hand, evidences of cytotoxicity indicated by the high frequencies of BN found in mussels from Vallcarca, Barcelona, and Cartagena (3.9, 3.4, and 2.3%, respectively) appeared to be specifically related to the accumulation of organic pollutants. Positive correlations found between MN and NB frequencies, and also between both NAs and water temperature, suggested that they were related genotoxic events, and that this environmental factor is able to influence their levels and has to be taken into account in the application of these biomarkers in field studies. Environ. Mol. Mutagen. 52:479-491, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: genotoxicity; cytotoxicity; DNA damage; micronucleus; mussel; Mediterranean Sea

INTRODUCTION

Genotoxicity can be defined as the potentially harmful effects on genetic material that occur as a consequence of an induced damage to DNA [OSPAR Commission, 2002]. This damage to DNA can be produced endogenously, due to the attack of reactive oxygen species (ROS) and free radicals produced as by-products in normal metabolic processes, or exogenously by exposure to radiation, natural toxins, or anthropogenic chemicals [De Flora et al., 1991]. Among external agents, chemical compounds able to damage DNA can be grouped into four classes according to the type of damage they produce: (1) chemicals that act directly on DNA; (2) chemicals whose metabolites cause DNA damage; (3) chemicals that increase the production of ROS; and (4) chemicals that inhibit DNA synthesis and repair [Lee and Steinert, 2003]. The three basic steps involved in DNA damage produced by genotoxins Type 1, 2, and 3 are formation of DNA-adducts with toxic molecules, secondary alterations of DNA via ROS production and alteration of cell functions, which can trigger mutations, cell proliferation and lead to the development and progression of diseases such as cancer [Monserrat et al., 2007]. Nevertheless, cells can develop several detoxification mechanisms and antioxidant

DOI 10.1002/em.20646

Grant sponsor: Spanish Institute of Oceanography (IEO) (project BIOMEJIMED III and a pre-doctoral fellowship for research personnel formation).

^{*}Correspondence to: Juan Antonio Campillo, Spanish Institute of Oceanography (IEO), Marine Environment and Environmental Protection Area, Oceanographic Centre of Murcia, Varadero 1, 30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain. E-mail: juan.campillo@mu.ieo.es

Received 7 October 2010; provisionally accepted 21 December 2010; and in final form 5 January 2011

Published online 2 March 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary. com).

480 Fernández et al.

enzymatic processes to keep down ROS, electrophilic parent compounds or their metabolites, and prevent their attack to genetic material [Manduzio et al., 2005].

The realisation that a large proportion of anthropogenic pollutants released in the marine environment may exert their effects via cyto-genotoxicity or the activation of toxic metabolic mechanisms has increased the concern regarding the hazard associated with the exposure of aquatic organisms to such contaminants. Indeed, some of the most common pollutants in the marine environment have been identified and classified according to their carcinogenic potential [IARC, 1987; L and IS, 1988]. In addition, ecogenotoxicological studies have tried to elucidate the expression of pollutant-induced changes in the genetic material with the aim to detect and predict the toxicological hazards they pose to biota [UNEP/WHO, 1995]. To achieve this exceedingly complex goal, several biomarkers have been proposed to detect the exposure and effects of these substances in the marine environment, such as recombination assays (sister chromatid exchange) and tests to detect mutations (ames test), embryotoxicity (sea urchin embryo/larval assay), morphological defects (neoplasms), DNA lesions (adducts, single and double-strand breaks) or cytogenetic alterations (chromosome aberrations, micronuclei) [De Flora et al., 1991; Kotelevtsev et al., 1994]. Among them, nuclear abnormalities (NAs) identifiable under the microscope have been used to assess genotoxicity (micronuclei, nuclear buds) and cytotoxicity (binucleated cells). Micronuclei (MN) are cytoplasmic masses of chromatin which are not integrated in the daughter nuclei during mitosis and that remain in the cytoplasm after cell division. They can be generated as a consequence of the lagging of a whole chromosome (aneugenic event) or an acentric chromosome fragment (clastogenic event) [Heddle, 1973; Schmid, 1975]. Incomplete micronuclei, also called nuclear buds (NBs), are structures similar to MN in shape, structure and size which are linked to the main nuclei of cells by a thread or stalks of chromatin. It has been suggested that they arise from the elimination of amplified DNA [Miele et al., 1989; Shimizu et al., 2000] and possibly of DNArepair complexes [Haaf et al., 1999]. Binucleation or frequency of binucleated cells (BN) is an indicator of abnormal cell division due to the blocking of cytokinesis, which would result in genetic imbalance in the cells and may be involved in carcinogenesis [Rodilla, 1993].

Mussels are widely used as target species to study chemical pollution as their filter-feeding habits and sessile condition enable them to significantly accumulate substances present in trace amounts in the surrounding environment [Goldberg, 1986]. The application of the MN test in mussels has been recommended as a nonspecific biomarker of genotoxicity in marine pollution assessment [ICES, 2004, 2007], this test having been applied in field studies in haemocytes, gill cells or simultaneously in both cell types [Bolognesi et al., 1996; Dailianis et al., 2003; Izquierdo et al., 2003; Venier and Zampieron, 2005; Barsiene et al., 2006a, b]. Frequencies of NB and BN have also been assessed to complement the information provided by MN [Dolcetti and Venier, 2002; Dailianis et al., 2003; Izquierdo et al., 2003; Barsiene et al., 2006a,b].

The objective of this study was the assessment of genotoxicity and cytotoxicity of waters along the Mediterranean coast of Spain through the determination of the frequency of cells containing MN, NB and BN in gill tissues of wild mussels (Mytilus galloprovincialis) collected from 17 sites within a chemical biomonitoring programme performed by the Oceanographic Centre of Murcia (Spanish Institute of Oceanography-IEO) [Martinez-Gómez et al. 2007]. We selected gills to quantify these NAs as this tissue is the primary target for marine pollutants and seems to have a higher MN induction capacity than haemocytes [Majone et al., 1987; Venier et al., 1997; Bolognesi et al., 1999]. We also investigated the relationship between the frequencies of these NAs and the bioaccumulation of several priority pollutants (metals, PAHs, PCBs, and DDTs) in soft tissues of mussels.

Metals and organic compounds can increase the production of ROS, free radicals, and reactive metabolites, which can subsequently interact with nucleophilic sites of DNA [Cheesman and Slater, 1993]. In fact, oxidative stress has been related to DNA strand breakages and the induction of MN in mussels [Frenzilli et al., 2001; Regoli et al., 2004; Bochetti et al., 2008; Binelli et al., 2010]. As antioxidant enzymatic activities have been previously studied as biomarkers of oxidative stress in gills of mussels from the same sites [Fernández et al., 2010], we investigated the relationship between these antioxidant responses and the frequencies of NAs found in this study. In addition, as MN generation depends on the mitotic activity of the studied tissue, which in turn depends on physiological (age, sex, reproductive cycle) and environmental (temperature, salinity, food availability) parameters [Dixon et al., 2002], we also studied the relationship between the frequencies of NAs with temperature and salinity.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Mussels—*M. galloprovincialis* (3.5 to 4.2 cm in length)—were collected in May–June 2003 from 17 sites located along the Spanish Mediterranean coast (Fig. 1): Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Vallcarca, Tarragona, Columbretes Islands, Valencia, Cullera, Portman, Cartagena, Almuñecar, La Herradura, Torrox, Fuengirola, Manilva, Algeciras 1-Punta Carnero and Algeciras 2-Guadarranque. These included a variety of coastal areas such as marine protected reserves (Medas Islands, Columbretes Islands) and sites affected by harbour, industrial, urban (Valencia, Barcelona, Vallcarca-cement plant,



Tarragona or Cartagena) or mining (Portman) activities. After collection, mussels were transported alive to the laboratory where the preparation of slides was done. At each sampling site water temperature and salinity were recorded. In addition, data of antioxidant enzymatic activities (catalase-CAT, superoxide dismutase-SOD, glutathione peroxidases-SeGP and non-SeGP, glutathione reductase-GR, DT-diaphorase-DTD and glutathione S-transferase-GST) in gills of mussels from these sites previously reported in Fernández et al. [2010] are showed in Table I.

Chemical Contaminant Concentrations

Concentrations of metals (Hg, Cd, Cu, Zn, and As), organochlorinated compounds (PCBs and DDTs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in whole soft tissues of mussels from each study site are reproduced from Fernández et al. [2010], except in the case of Cadaqués. For this site, the analytical methods employed were the same as those described in the aforementioned work. Trace metal data were expressed as $\mu g g^{-1}$ dry weight, while concentrations of organic compounds (PAHs, PCBs and DDTs) were expressed as ng g^{-1} dry weight.

Frequencies of Nuclear Abnormalities

Obtention of gill cells and preparation of slides was performed essentially as described in UNEP/RAMOGE [1999]. Gills from single mussels (n = 6 for all the sampling sites except Cartagena and Portman, where n = 8) were removed and cut into small pieces and the resulting cellular aggregate was digested for 10 min at 37°C in modified Hank's Balanced Salt Solution containing 0.1 mg/mL Dispase I (neutral protease, grade I). The cellular suspension was filtered and then centrifuged at 1,000 rpm for 10 min, and aliquots from the pellet obtained were fixed in methanol/acetic acid (3:1) for 20 min, dropped onto clean glass slides, air-dried and then stained with 3% Giemsa.

Environmental and Molecular Mutagenesis. DOI 10.1002/em

Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels 481

MN, NB, and BN cells (Fig. 2) were scored using a microscope Olympus BX41 (U-CTR30-2) at 1,000× magnification. MNs were identified following UNEP/RAMOGE [1999]: chromatin structure and color intensity similar to that of the main nucleus; on the same optical plane as the main nucleus; round or oval; not fragmented; located within 4-fold the shortest axis of the nearest nucleus, and with a size less than one-third of that of the main nucleus. In addition, the boundary of a MN should be intact and completely distinguishable from the boundary of the main nucleus. NBs and BN cells were identified following Fenech et al. [2003]: NBs are structures that resemble MN, such as extruded nuclear material that appears like a MN with a narrow nucleoplasmic connection to the main nucleus, and nuclear blebs that have an obvious nucleoplasmic connection with the main nucleus. In a BN cell, the two nuclei should have intact nuclear membranes, should be approximately equal in size, staining pattern and intensity and may touch but should not overlap each other. At least 1,000 cells with preserved cytoplasm per mussel were counted and the frequencies of MN, NB, and BN were expressed per 1,000 cells (‰).

Statistical Analysis

Normality of distributions was tested through the Shapiro-Wilk test, while the Levene test was used to confirm homocedasticity of variances. The ANOVA F-test was applied to detect the existence of significant differences between mean concentrations of contaminants and the frequencies of MN, NB and BN cells. It was necessary to transform data for Pb and DDT (log), Cd $(1/\sqrt{Cd})$ and NB $(\sqrt{(NB+1)})$ to achieve homocedasticity of variances. As BN cells were not detected at two sites (mean frequency of $0.0 \pm 0.0\%$) homocedasticity of variances was violated. This also occurred for Hg, As and PCB concentrations. However, ANOVA is a robust test which admits unequal variances when the significance of the differences detected is high [Underwood, 1997], as occurred in these cases. To detect which mean values differed between them, post hoc pair-wise comparisons were performed using Tukey's b-test. The relationship between the frequencies of MN, NB, and BN, contaminant bioaccumulation, antioxidant enzymatic responses (SOD, CAT, SeGP, non-SeGP, GR, DTD, GST) and environmental variables (temperature, salinity) was investigated through correlation analyses (Pearson's test, two-tailed). In all tests the significance level was set at $\alpha = 0.05$. All analyses were carried out using the SPSS statistical package (version 11.0).

RESULTS

Environmental Parameters and Contaminant Levels

Water temperature and salinity, and the concentration of contaminants in whole soft tissues of mussels are

Capítulo V

(mean ± st	andard																	
Sites	T^{1}	Sal^2	PCB^3	DDT^3	PAH^3	Cu ⁴	Pb^4	Hg^4	Cd^4	Zn^4	As^4	SOD^5	CAT^{6}	SeGP^7	$noSeGP^7$	GR^7	DTD^7	GST^7
Cadaqués	17.0	37.3	$20 \pm I^{\rm GH}$	$I2 \pm I.2^{\mathrm{D}}$	$42 \pm 8^{\rm F}$	$6.5 \pm 0.1^{\mathrm{DE}}$	2.2 ± 0.1 G	$0.10 \pm 0.01^{\mathrm{E}}$	$0.6 \pm 0.0^{\mathrm{GH}}$	$I03 \pm 4^{\mathrm{GH}}$	$63 \pm 4.7^{\mathrm{B}}$							
Medas I.	17.3	37.4	15 ± 1^{H}	9 ± 1^{E}	$30 \pm 4^{\rm F}$	$6.6 \pm 0.3^{\rm D}$	$2.7 \pm 0.2^{\mathrm{EFG}}$	$0.11 \pm 0.01^{\text{DE}}$	$0.8 \pm 0.0^{\rm E}$	$131 \pm 0^{\mathrm{FG}}$	$83 \pm 3^{\Lambda}$	$30 \pm 3^{\mathrm{D}}$	40 ± 7^{BCD}	10 ± 1^{CD}	15 ± 5^{D}	$15 \pm 3^{\mathrm{D}}$	10 ± 2^{AB}	307 ± 73^{CD}
Barcelona	16.6	37.4	$254 \pm 10^{\rm A}$	$87 \pm 6^{\rm A}$	$246 \pm 19^{\mathrm{A}}$	$11.3 \pm 0.2^{\rm A}$	$9.8 \pm 0.6^{\rm C}$	0.20 ± 0.00^{BC}	$0.5 \pm 0.0^{\rm HI}$	$160 \pm 6^{\rm F}$	36 ± 0^{C}	$30 \pm 5^{\mathrm{D}}$	44 ± 4^{ABCD}	12 ± 3^{CD}	$166 \pm 3^{\mathrm{D}}$	$15 \pm 4^{\mathrm{D}}$	12 ± 4^{AB}	334 ± 81^{D}
Vallcarca	18.5	37.6	$225 \pm 13^{\rm B}$	$83 \pm 7^{\rm A}$	$95 \pm 12^{\rm D}$	7.8 ± 0.4^{BC}	$7.9 \pm 0.4^{\rm D}$	$0.25 \pm 0.01^{\rm B}$	0.4 ± 0.0^{JK}	$153 \pm 21^{\rm F}$	$23 \pm 0^{\text{DEFG}}$	$42 \pm 6^{\text{B}}$	48 ± 7^{ABCD}	13 ± 2^{BCD}	21 ± 3^{ABCD}	16 ± 1^{CD}	10 ± 1 AB	298 ± 56^{CD}
Tarragona	17.2	37.3	51 ± 11^{r}	$25 \pm 1^{\rm B}$	$216 \pm 39^{\rm B}$	$7.5 \pm 0.4^{\circ}$	$1.9 \pm 0.1^{\rm Er}$	$0.13 \pm 0.01^{\text{CDE}}$	$0.3 \pm 0.0^{\rm K}$	91 ± 7^{H}	$28 \pm 14^{\text{DE}}$	55 ± 6^{A}	$49 \pm 10^{\text{ABCU}}$	$16 \pm 4^{\rm BC}$	24 ± 5^{ABC}	14 + 3 ⁰	$8 \pm 4^{\rm B}$	347 ± 73^{D}
Columbretes I.	19.0	37.2	11 ± 2^{n}	$8 \pm 0^{\rm E}$	$18 \pm 1^{\Gamma}$	$7.5 \pm 0.1^{\circ}$	$2.5 \pm 0.3^{\circ}$	$0.19 \pm 0.03^{\rm BCL}$	$1.4 \pm 0.2^{\rm B}$	$148 \pm 18^{\Gamma}$	$32 \pm 1^{\rm CD}$	$43 \pm 5^{\rm D}$	32 ± 7^{D}	$13 \pm 3^{\rm BCU}$	20 ± 5^{BCD}	$14 \pm 1^{\nu}$	10 ± 3^{AB}	$545 \pm 43^{\rm D}$
Valencia Cullara	20.2	30.8	$113 \pm 15^{\circ}$ $30 \pm 3^{\circ}$	$24 \pm 3^{\circ}$ 10 + 1 ^C	$84 \pm 9^{\text{EF}}$	8.2 ± 0.2^{-6} 6.0 ± 0.2^{-6}	2.8 ± 0.1^{-1}	$0.13 \pm 0.01^{\text{cm}}$	0.4 ± 0.0^{2} 0.3 + 0.0 ^{JK}	130 ± 9^{-0} 141 ± 12^{F}	21 ± 3^{-1} $35 \pm 0^{\text{DEF}}$	$34 \pm 4^{\circ}$	35 ± 8^{m} 44 ± 10^{ABCD}	11 ± 3 0 + 3	19 ± 3^{-1}	17 ± 3 16 ± 5	15 ± 4. 16 + 3 ^A	$344 \pm 36^{\circ}$ $356 \pm 81^{\circ}$
Portman	23.6	37.2	$9 + 4^{H}$	$\frac{15}{1}$ + $\frac{12}{1}$	$6 + 0^{F}$	$6.7 + 0.3^{D}$	25.5 ± 3.5^{B}	0.10 = 0.00 $0.22 + 0.02^{B}$	1.7 ± 0.1^{A}	$243 + 33^{\text{DE}}$	$25 \pm 1^{\text{DEF}}$	$40 + 2^{BC}$	$40 + 5^{BCD}$	7 = 2 18 + 3 ^{AB}	$26 + 2^{AB}$	$32 + 4^{\rm A}$	$13 + 3^{AB}$	10 = 000
Cartagena	24.3	37.3	90 ± 2^{D}	14 ± 1^{D}	0 – 0 99	8.1 ± 0.3^{B}	$57.8 \pm 3.4^{\rm A}$	$0.78 \pm 0.12^{\rm A}$	$1.6 \pm 0.1^{\rm A}$	$249 \pm 17^{\text{DE}}$	$23 \pm 1^{\text{DEFG}}$	59 ± 7^{A}	57 ± 12^{A}	$24 \pm 5^{\rm A}$	$27 \pm 6^{\text{A}}$	34 ± 4 ^A	13 ± 3^{AB}	$783 \pm 68^{\rm A}$
Almuñecar	21.5	36.4	9 ± 1^{H}	$6 \pm 1^{\rm F}$	$31 \pm 4^{\rm F}$	$6.6 \pm 0.0^{\rm D}$	$2.9\pm0.2^{\rm EF}$	$0.10 \pm 0.01^{\rm E}$	$0.5\pm0.0^{\mathrm{HI}}$	$227 \pm 17^{\rm E}$	$16 \pm 1^{\mathrm{FG}}$	40 ± 5^{BC}	$33 \pm 6^{\mathrm{D}}$	15 ± 3^{BCD}	21 ± 3^{ABCD}	24 ± 4^{BC}	11 ± 2^{AB}	325 ± 29^{D}
Herradura	21.6	36.5	$5 \pm 1^{ m H}$	$5 \pm 1^{\rm F}$	$25 \pm 15^{\rm F}$	$6.2 \pm 0.1^{\text{DE}}$	$1.8 \pm 0.1^{\mathrm{H}}$	$0.12 \pm 0.01^{\text{CDE}}$	$1.3 \pm 0.0^{\rm C}$	$318 \pm 25^{\mathrm{B}}$	15 ± 0^{FG}	$43 \pm 6^{\mathrm{B}}$	38 ± 9^{CD}	16 ± 4^{BC}	22 ± 4^{ABCD}	28 ± 5^{AB}	14 ± 5^{AB}	$346 \pm 89^{\rm D}$
Torrox	20.1	36.2	$10 \pm 1^{\mathrm{H}}$	$10 \pm 1^{\rm E}$	$45 \pm 9^{\rm F}$	6.8 ± 0.2^{D}	$3.3 \pm 0.2^{\mathrm{E}}$	$0.08 \pm 0.00^{\rm E}$	$0.7 \pm 0.0^{\text{EFG}}$	295 ± 4^{BC}	13 ± 1^{G}	$32 \pm 5^{\rm D}$	35 ± 9^{CD}	14 ± 3^{BCD}	$16 \pm 4^{\rm D}$	18 ± 6^{CD}	12 ± 1^{AB}	211 ± 62^{D}
Fuengirola	21.3	36.4	$16 \pm 2^{\rm H}$	5 ± 0^{F}	$28 \pm 12^{\rm F}$	6.7 ± 0.1^{D}	$3.1\pm0.2^{\mathrm{EF}}$	$0.12 \pm 0.00^{\text{CDE}}$	0.9 ± 0.0^{D}	$431 \pm 13^{\rm A}$	$19 \pm 0^{\text{EFG}}$	40 ± 5^{BC}	44 ± 7^{ABCD}	16 ± 2^{BC}	19 ± 3^{BCD}	28 ± 7^{AB}	$15 \pm 3^{\mathrm{A}}$	263 ± 61^{CD}
Manilva	17.1	36.9	7 ± 0^{H}	5 ± 0^{F}	$22 \pm 3^{\rm F}$	$6.3 \pm 0.2^{\rm DE}$	$1.9\pm0.0^{ m H}$	$0.09 \pm 0.00^{\rm E}$	$0.7 \pm 0.0^{\mathrm{EF}}$	312 ± 19^{B}	16 ± 0^{FG}	47 ± 2^{B}	48 ± 7^{ABCD}	11 ± 2^{CD}	$16 \pm 3^{\mathrm{D}}$	21 ± 5^{CD}	11 ± 1^{AB}	$257 \pm 59^{\text{CD}}$
Algeciras 1	17.8	36.7	$12 \pm 1^{\rm H}$	$6 \pm 0^{\rm F}$	$22 \pm 11^{\rm F}$	6.6 ± 0.2^{D}	$2.7\pm0.1^{\rm EF}$	$0.08 \pm 0.01^{\rm E}$	$0.7 \pm 0.0^{\mathrm{FG}}$	$300 \pm 24^{\mathrm{BC}}$	18 ± 1^{FG}	$33 \pm 5^{\rm CD}$	34 ± 6^{CD}	11 ± 3^{CD}	$16 \pm 3^{\mathrm{D}}$	$18 \pm 7^{\rm CD}$	12 ± 4^{AB}	296 ± 69^{CD}
Algeciras 2	23.9	34.3	$70 \pm 4^{\rm E}$	14 ± 0^{D}	179 ± 33^{C}	$8.0 \pm 0.2 \ ^{\mathrm{BC}}$	$2.7\pm0.1^{\rm EF}$	$0.15 \pm 0.00^{\text{CDE}}$	0.4 ± 0.0^{JK}	$274 \pm 26^{\text{CD}}$	13 ± 1^{G}	$44 \pm 6^{\mathrm{B}}$	54 ± 11^{ABC}	14 ± 3^{BCD}	19 ± 4^{CD}	18 ± 4^{CD}	13 ± 3^{AB}	$203 \pm 34^{\rm D}$
¹ °C. ² psu.																		
3 ng g $^{-1}$ dry	weight.																	
4 µg g ⁻¹ dry	weight.																	
5 Units min ⁻¹	mg pro	t_1.																
$^{\circ}\mu mol min^{-1}$	mg pro																	
nim lomn	mg pro				JJ.F 7	1020 - P	0 1 1			-	_		1					
Data with the	s same s	superscri	pt indicates	no signin	Icant differen	nce at the 90%	level aller a	signincant Alv	UVA lest and	i post noc ar	nalyses were	errormet	1 at each site					

Environmental and Molecular Mutagenesis. DOI 10.1002/em Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels 483



Fig. 2. Mussel gill cells $(1000 \times \text{magnification})$ from Mytilus gallopfovincialis showing (a) micronuclei, (b) nuclear buds, and (c) binucleated cells [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

shown in Table I. The highest water temperatures were recorded at Cartagena, Portman and Algeciras 2 (24.3–23.6°C), while the lowest ones were found at Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Tarragona and Manilva (16.6–17.3°C). Salinity generally increased from south-western (minimum: 34.3 psu at Algeciras 2) towards north-eastern sites (maximum: 37.6 psu at Vallcarca).

Regarding organic pollutants, the highest concentrations of PAHs, PCBs and DDTs were found in mussels from sites located near to urban, harbor, and industrial areas such as Barcelona, Vallcarca, Tarragona, Valencia, Cartagena, and Algeciras 2. Specifically, mussels from Barcelona and Vallcarca for PCBs and DDTs, and mussels from Barcelona, Tarragona and Algeciras 2 for PAHs, showed significantly higher levels of organic compounds than the remaining mussel populations.

Similarly to organic compounds, the highest Cu concentrations were found in mussels from Barcelona, Valencia, Cartagena, Algeciras 2, and Vallcarca. On the other hand, mussels from Cartagena and Portman displayed the highest accumulations of Pb, Cd, and Hg. Also mussels from Barcelona and Vallcarca for Pb and Hg, and mussels from Columbretes Islands and La Herradura for Cd, displayed significantly higher concentrations of these metals than mussels from the majority of the remaining sites. In



Fig. 3. Frequency of micronucleated cells (mean \pm SED). Bars labelled with the same letter are not statistically different (P > 0.05) tested by one-way ANOVA and Tukey's b multiple comparison test.

the case of As and Zn, an inverse trend on their concentrations along the study area was detected. Thus, mussels from southern sites showed the lowest concentrations of As (from Algeciras 2 to Almuñecar) and the highest concentrations of Zn (from Algeciras 2 to Portman), while the highest concentrations of As and lowest concentrations of Zn were found in mussels from northern sites such as Cadaqués and Medas Islands in the case of As, and Cadaqués and Tarragona in the case of Zn.

Frequencies of Nuclear Abnormalities

The mean frequencies of MN, NB, and BN cells at each site, and the results from ANOVA and post hoc pair-wise comparisons are shown in Figures 3, 4, and 5, respectively.

Mussels from Cartagena displayed a significantly higher frequency of MN (11.6‰) than the remaining mussel populations, with the exception of mussels from Algeciras 1, Portman, Algeciras 2, and Manilva, whose mean MN values were 8.6, 8.0, 7.9, and 7.2‰, respectively. In addition, the frequencies of MN in mussels from Algeciras 1 and Portman were significantly higher than in mussels from Cadaqués and Cullera, whose MN levels were 1.9 and 2.1‰, respectively (Fig. 3). The frequencies of MN found in mussels from some sites polluted by PAHs and/ or PCBs, such as Barcelona, Vallcarca, Tarragona, and Valencia (3.8, 5.0, 5.8, and 5.0‰, respectively), were not significantly higher than those obtained in mussels from Cadaqués and Cullera (P > 0.05).

Mean frequencies of NB ranged between 0.3‰ measured in mussels from Tarragona to 4.6‰ found in mussels from Cartagena (Fig. 4). Mussels from Cartagena, Algeciras 1 and Portman displayed significantly higher levels of

484 Fernández et al.





Fig. 4. Frequency of cells presenting nuclear buds (mean \pm SED). Bars labelled with the same letter are not statistically different (*P* > 0.05) tested by one-way ANOVA and Tukey's b multiple comparison test.

NB (4.6, 4.0, and 3.5‰) than mussels from the remaining sites, with the exception of mussels collected at Valencia, Cullera, Almuñecar, Herradura, Torrox, and Algeciras 2, whose NB levels ranged from 2.1 to 4.0‰. On the other hand, mussels from Cadaqués, Medas Islands, Barcelona, Vallcarca, Tarragona, Columbretes Islands, Fuengirola, and Manilva displayed low levels of NB, with mean frequencies ranging from 0.3 to 1.2‰. At these mussel populations, the frequencies of NB were significantly lower than those recorded in mussels from Portman, Cartagena, and Algeciras 1. Additionally, frequencies of NB lower than 1‰ were found in mussels from the northern sites, from Cadaqués to Columbretes Islands.

Mean frequencies of BN cells ranged from 0.0‰ in mussels from Cullera and Fuengirola to 3.9‰ in mussels from Vallcarca (Fig. 5). BN cell frequencies were significantly higher in mussels from Vallcarca and Barcelona (3.9 and 3.4‰, respectively) than at the remaining mussel populations studied, with the exception of mussels from Cartagena and Medas Islands, whose mean frequency of BN were 2.5 and 1.9‰, respectively. In addition, the frequency of BN was significantly higher in mussels from Cartagena than in mussels from Valencia, Cullera, Portman, and Fuengirola, whose mean values ranged from 0.0 to 0.5‰.

Correlation Analysis

Results from correlation analyses performed between the mean values of NAs, concentration of pollutants, antioxidant enzymes, and environmental variables are shown in Table II. Mean frequencies of MN were positively correlated with the concentration of Pb (r = 0.670, P =0.004), Hg (r = 0.610, P = 0.009), and water temperature (r = 0.500, P = 0.041). The frequencies of NB were

Fig. 5. Frequency of binucleated cells (mean \pm SED). Bars labelled with the same letter are not statistically different (P > 0.05) tested by one-way ANOVA and Tukey's b multiple comparison test.

also correlated to Pb (r = 0.535, P = 0.027) and water temperature (r = 0.670, P = 0.003). There was also a positive correlation between MN and NB (r = 0.666, P = 0.004). On the other hand, no positive relationships were found between mean frequencies of MN and NB and the concentration of organic compounds. In contrast, the frequency of BN cells displayed positive correlations with the sum of the concentrations of PCBs (r = 0.756, P= 0.000) and DDTs (r = 0.784, P = 0.000) and with the levels of 5 of the 13 PAHs analysed, especially low molecular weight PAHs such as phenanthrene (r = 0.610, P= 0.009) and anthracene (r = 0.601, P = 0.011), but also benzo[b]fluoranthene (r = 0.510, P = 0.037), benzo[k] fluoranthene (r = 0.539, P = 0.026) and benzo[ghi]perylene (r = 0.500, P = 0.041). However, the degree of the correlation between BN and total PAHs fell just short of statistical significance (r = 0.460, P = 0.063). In addition, the frequency of BN was also positively correlated with the concentration of Cu (r = 0.618, P = 0.008).

Regarding antioxidant enzymes, the frequencies of MN were slightly but significantly correlated to SOD (r = 0.501, P = 0.040), SeGP (r = 0.628, P = 0.009) and GR (r = 0.517, P = 0.040), while correlation fell short of being statistically significant with non-SeGP (r = 0.474, P = 0.064) and GST (r = 0.451, P = 0.080). Furthermore, slightly significant correlations were detected between mean frequencies of NB and GR (r = 0.568, P = 0.022) and between the levels of BN cells and DTD (r = -0.506, P = 0.038)

DISCUSSION

In this study, the frequencies of MN, NB and BN in gill tissues of mussels collected along the Mediterranean

MN 0.67 ^{**} 0.08 0.00 NB −0.39 −0.38 BN 0.46 DPCB CB28 CB52	-0.17 -0.44	100									5	LUGALL A	, 1
VIN 0.67 0.08 0.00 VIB −0.39 −0.38 BN 0.46 DPCB CB28 CB52	-0.17 -0.44			0		0			0				
NB −0.39 −0.38 SN 0.46 ∑PCB CB28 CB52	-0.44	17.0-	-0.12	-0.07	-0.10	0.09	0.25	-0.21	-0.18	-0.36	-0.15	-0.35	-0.23
BN 0.46 ∑PCB CB28 CB52 0.46		-0.52^{*}	-0.35	-0.40	-0.39	-0.33	-0.23	-0.33	-0.43	-0.35	-0.22	0.00	-0.22
ΣPCB CB28 CB52	0.61^{**}	0.60^{*}	0.38	0.40	0.43	0.37	0.35	0.51^*	0.54^*	0.42	0.50^*	-0.29	0.38
010 010 010	B101	CB105	CB118	CB138	CB153	CB156	CB180	\sum DDT	ppDDE	ppDDD	opDDT	ppDDT	
MN -0.02 -0.19 -0.15	-0.10	0.14	-0.13	0.03	0.03	-0.25	0.04	-0.18	-0.21	-0.26	-0.13	-0.05	
VB -0.25 -0.46 -0.39	-0.33	-0.22	-0.37	-0.21	-0.19	-0.35	-0.17	-0.42	-0.41	-0.53*	-0.42	-0.30	
3N 0.76*** 0.62** 0.74**	0.78***	0.64**	0.81***	0.75**	0.72**	0.47	0.65**	0.78***	0.78***	0.62^{**}	0.69**	0.78***	
Hg Cd Pb	Cu	Zn	\mathbf{As}	SOD	CAT	SeGP	noSeGP	GR	DTD	GST	Temp	Sal	
MN 0.61** 0.37 0.67**	0.09	0.40	-0.47	0.50^{*}	0.17	0.63^{**}	0.47	0.52^*	-0.06	0.45	0.50^*	-0.23	
NB 0.39 0.41 0.53 *	-0.19	0.39	-0.46	0.14	-0.08	0.41	0.29	0.57^*	0.39	0.42	0.67^{**}	-0.24	
				100	0.10	0.02	0.01	LC 0-	-051*	0.06	-0.38	0.43	

Capítulo V

Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels 485

coast of Spain have been studied to assess environmental genotoxicity and cytotoxicity. At these sites, where mussels are sampled annually within the framework of a chemical biomonitoring based on the determination of the concentration of certain priority pollutants (trace metals, PAHs, PCBs, and DDTs), the biological effects of pollutants have been also studied through the determination of several biomarkers such as antioxidant enzymatic activities, metalothionein concentration or stability of lysosomal membrane [Martinez et al., 2008; Fernández et al., 2010]. In this context, we have investigated the relationships between these NAs, the biaccumulation of priority pollutants, oxidative stress and environmental variables, temperature and salinity.

Mussel populations studied in this work were subjected to different environmental conditions, especially differences in water temperature and salinity, due to the influence of two different surface water currents over the Mediterranean shelf of Spain (the Atlantic water stream in the south and the Liguro-Provenço-Catalan current in the north) [Millot and Taupier-Letage, 2005]. Regarding salinity, no relationship with the frequencies of NAs was found, which may be accounted for the low range of variation of this parameter detected between sites. On the contrary, the positive correlations found between MN, NB and temperature (Table II) indicated the influence of this factor on their generation. Several studies have demostrated that baseline frequencies of MN in mussels, regarded as the incidence of MN observed in the absence of environmental risk or before exposure to genotoxins [Fenech, 1993], are related to water temperature. Indeed, for unpolluted sites in the Mediterranean Sea, baseline MN levels in gills of *M. galloprovincialis* have been set depending on water temperature to 1‰ at temperatures below 15°C, 2‰ between 15 and 20°C, and 3‰ above 20°C [Brunetti et al., 1992]. Besides, temperature can increase cell sensitivity towards environmental pollutants, as Buschini et al. [2003] demonstrated in mussels (Dreissena polymorpha) where DNA damage resulting from exposure to genotoxic compounds increased at higher water temperatures $(4-37^{\circ}C)$.

In this way, higher frequencies of MN in gills of mussels (M. edulis) from the Baltic Sea have been measured at high water temperatures than at lower ones. For instance, Kopecka et al. [2006] reported mean MN frequencies of 6‰ at 12°C in contrast to levels of 2‰ at 3°C, while Schiedek et al. [2006] reported mean MN levels of 5‰ at 18°C in contrast to frequencies of 1‰ at 9°C. According to Kopecka et al. [2006] the comparatively low amounts of MN in mussels subjected to low water temperatures could be due to the lower mitotic activity (less than one mitosis per 1,000 cells) at low water temperature. In contrast to studies performed in the Baltic Sea [Barsiene et al., 2006a, b; Kopecka et al. 2006; Schiedek et al. 2006], where lower frequencies of MN

486 Fernández et al.

(from 0.4 to 6‰) than those reported in the present study (from 1.9 to 11.6‰) have been detected, several studies performed in the Mediterranean Sea have reported similar and even higher ranges of variation on the frequencies of MN than us. Thus, the frequency of MN in control mussels and in mussels sampled or caged at polluted sites in the Ligurian Sea ranged from 1.8 to 24‰ [Brunetti et al. 1988; Scarpato et al., 1990; Bolognesi et al., 2004a; Nigro et al. 2006], in the coast of Greece ranged from 2 to 12‰ [Kalpaxis et al., 2004], and in the Algerian coast ranged from 1.2 to 11.8‰ [Taleb et al. 2009].

Although the differences in ambient water temperature might play a role in the generation of MN and NB, the frequencies of these NAs found in mussel populations studied in this work could be also related with the different types and degrees of bioaccumulation of contaminants in these organisms. Thus, the lowest frequencies of MN were found in mussels from Cadaqués and Cullera (1.9 and 2.1‰, respectively), where the concentration of pollutants analysed was low and water temperature was 17 and 20°C, respectively (Table I). This was in agreement with spontaneous gill MN frequency reported for this species in the Mediterranean Sea [Brunetti et al., 1992]. In a similar way, the lowest frequencies of NB (comprised between 0.3 and 0.9‰) detected in mussels from Cadaqués, Medas Islands, and Columbretes Islands, where concentrations of pollutants were low and water temperatures ranged between 17.0 and 19.0°C (Table I), could be considered as baseline levels in this thermal range.

NBs have been observed in numerous cell types and their origin, existence and biological signification have been compared with those of MN [Serrano-García and Montero-Montoya, 2001]. Indeed, it has been suggested that NB might be converted into MN during interphase [Shimizu et al., 1998]. The correlation found in this work between MN and NB frequencies (Table II) supported the hypothesis that both NAs are related genotoxic events.

MN and NB frequencies were significantly higher in mussels from Cartagena and, to a lesser extent, from Portman than at the majority of the remaining mussel populations (Figs. 3 and 4). The fact that mussels from these sites were characterised by the highest accumulations of Pb, Hg, and Cd (Table I) suggests that these genotoxic damages could be due to metal-mediated toxicity. This hypothesis is also supported by the positive correlations found between MN frequencies and the levels of Hg and Pb, and between BN and Pb concentrations (Table II). These results agree with several studies that have demonstrated the ability of metals to induce MN in mussels after laboratory exposures to Hg, Cu, and Cd [Bolognesi et al., 1999; Koukouzika and Dimitriadis, 2008] and also in field studies using native and caged mussels from sites polluted by metals [Bolognesi et al., 2004a; Magni et al., 2006; Ausili et al., 2008].

Mussels from Cartagena and Portman have been characterized by low lysosomal membrane integrity of their haemocytes [Martínez-Gómez et al., 2008] and signs of oxidative stress in gill tissues [Fernández et al., 2010] in relation to a high bioaccumulation of metals. In fact, the highest levels of antioxidant enzyme activities SOD, CAT, SeGP, non-SeGP, GR, and GST have been detected in mussels from Cartagena, while mussels from Portman showed significantly higher activity levels of SeGP, non-SeGP, GR, and GST than the majority of the remaining mussel populations (Table I). Cheesman and Slater [1993] suggested that during heavy metal exposure the electrophilic ions and radicals produced can interact with nucleophilic sites of DNA, leading to strand breaks and other related damages. In addition, lysosomes can interfere with DNA integrity through their role in ROS production, as the intra-lysosomal environment is a site of oxyradical production, and the destabilization of lysosomal membranes may result in the release of oxyradicals [Livingstone, 2001]. Thus, DNA strand breakages as a consequence of oxidative stress due to metal bioaccumulation may be related to the induction of MN and NB in mussels from these metal polluted sites, as single and doublestrand breakages have been signalled as one of the reasons for MN generation occurring [Black et al., 1996; Accomando et al., 1999; Akcha et al., 2000b; Almeida et al., 2005; Stambuk et al., 2008; Shi et al., 2009]. In addition, positive correlations detected beetwen the frequencies of MN, NB and the levels of some antioxidant enzymes (SOD, SeGP, GR) (Table II) supported the involvement of an increased production of ROS in the DNA damage detected. Similar realtionships between oxidative stress and genotoxic damage in mussels have been described by other authors. Thus, increased antioxidant enzyme activities (CAT, GP, SOD, and GST) [Binelli et al., 2010] and a reduced antioxidant efficiency (GSH, CAT, GST, GR, and GP) and total oxyradical scavenging capacity-TOSC-[Bochetti et al., 2008] have been related to increased levels of DNA strand breaks and MN in mussels caged or sampled from polluted areas. Also mussels from highly eutrophicated or industrialised sites showed low DNA integrity (comet assay) in relation to a reduced TOSC [Frenzilli et al., 2001] and to a depletion of antioxidant defences (CAT, GST, GR, GSH) and TOSC and high lysosomal damage [Regoli et al., 2004].

The ability of organic compounds to damage DNA mainly arises as a result of their oxidative biotransformation, which results in the production of highly DNA-reactive metabolites which covalently bind DNA and other macromolecules [Akcha et al., 2000a; Siu et al., 2003]. In mussels, the induction of MN has been reported by exposure to organic compounds such as benzo[*a*]pyrene, p,p'-DDT and its metabolites, paraquat, pentachlorophenol, phenanthrene, and mixtures of PAH and pesticides [Venier et al., 1997; Pavlica et al., 2000; Siu et al., 2003, 2004ab, Siu et al. 2008; Woznicki et al., 2004; Mantecca et al., 2006; Binelli et al., 2008a,b; Koukouzika and Dimitriadis, 2008]. In this study, the frequencies of MN detected in mussels from some organically polluted sites such as Barcelona, Vallcarca, Tarragona and Valencia (3.8, 5.0, 5.8, and 5.0%, respectively), although higher than those obtained in mussels from Cadaqués and Cullera, were not significantly different from them (P > 0.05). This contrasts with mussels from other sites polluted by organic compounds, such as Cartagena and Algeciras 2, whose frequencies of MN (11.6 and 7.9‰, respectively) were significantly higher than in mussels from these reference sites (Fig. 3). The lack of statistically significant differences between these MN levels may be due to the high interindividual variability found within mussel populations studied, as also other authors have reported [Wrisberg et al., 1992; Burgeot et al., 1996; Koukouzika and Dimitriadis, 2005; Taleb et al., 2007]. This may be due to a variety of factors such as animal health, nutritional status, the presence of pathogens or intra- and interpopulational genetic variability [Depledge, 1998]. It is likely that a higher sample size would have increased the capacity of discrimination of this biomarker, realisation that should be taken into account in subsequent studies. Similarly to MN, lower frequencies of NB than expected from their high bioaccumulation of organic pollutants were found in mussels from Barcelona, Vallcarca and Tarragona (0.3, 0.6, and 0.3‰, respectively-Fig. 4). Such unexpected results on the frequencies of MN and NB in mussels from organically polluted sites may be due to the chronic nature of exposure to contaminants at these sites, located close to major industrial, urban, and harbor areas. This was in agreement with other studies which reported that DNA damage produced by genotoxins persisted to a lesser extent under long-term exposures than after short-acute exposures [Majone et al., 1987; Bihari et al., 1990; Scarpato et al., 1990; Dailianis et al., 2003; Woznicki et al., 2004]. This has been attributed to adaptation mechanisms such as a selective phenomenon that increases mortality, with only the most resistant organisms surviving [Brunetti et al., 1988] or to the increase on cell turnover, which reduces the persistence of MN [Mersh et al., 1996]. Besides, some compounds may inhibit the mitotic activity, resulting in a low capacity of MN induction [Majone et al., 1987; Wrisberg et al., 1992; Dolcetti and Venier, 2002; Venier et al., 2003]. Furthermore, as a cause-effect relationship between DNA strand breakages (reversible genetic damage) and the generation of MN (irreversible damage) has been reported in mussels [Accomando et al., 1999; Akcha et al., 2000b; Almeida et al., 2005; Stambuk et al., 2008], faster and more efficient DNA repair systems found in chronically exposed organisms [Siu et al., 2004a; Black et al., 1996] may prevent strand breakages from being converted into MN. In addition, the influence of low water temperatures in the generation of MN and NB in mussels from these sites, especially in mussels from Barcelona, Vallcarca, and Tarragona (16.6, 18.5, and 17.2°C, respectively), cannot be ruled out.

Environmental and Molecular Mutagenesis. DOI 10.1002/em Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels 487

Regarding the frequencies of BN, significantly higher levels were found in mussels from Vallcarca, Barcelona (3.9 and 3.4‰, respectively), and to a lesser extent from Cartagena (2.5‰), than in the remaining mussel populations. The high bioaccumulation of organic pollutants and Cu in mussels from these sites (Table I) and the positive correlations detected between BN levels and the concentrations of PCBs, DDTs, some PAH analysed and Cu (Table II) pointed out the influence of these pollutants on the frequencies of BN. The presence of Cu near harbours was probably related to its use in antifouling paints instead of the toxic and banned tributyltin (TBT) [Gipperth, 2009]: both types of compounds have been reported to induce cytogenetic damage in mussels [Jha et al., 2000 a,b; Hagger et al., 2005; Villela et al., 2006]. The majority of references in the literature for the determination of the frequency of BN cells in marine organisms are referred to fish, where it has been reported the capacity of metals (Cu, Cd, and Cr) and organic compounds (petroleum hydrocarbons) to increase their frequency [Cavas et al. 2005, Cavas and Ergene-Gözükara, 2005a; Andreikenaite et al. 2007] and their assessment has been signalled as a suitable tool to monitor environmental cytotoxicity [Cavas and Ergene-Gözükara, 2005b; Hafez, 2009]. Regarding mussels, increased levels of BN have been reported after exposure to crude oil [Barsiene et al., 2006c], the flame retardant tetrabromodiphenyl ether-47 [Barsiene et al., 2006d], benzo[a]pyrene [Venier et al., 1997] and in mussels collected near to an urban effluent [Izquierdo et al., 2003]. In agreement with these studies, our results showed that high frequencies of BN seemed to be related to the bioaccumulation of organic compounds. However, further laboratory and field studies are necessary to validate this endpoint as a reliable biomarker in mussels for assessing marine environmental cytotoxicity.

Our results showed that mussels from Algeciras 1 and Manilva presented unexpectedly high levels of MN (8.6 and 7.2‰, respectively—Fig. 3) regarding their pollutant bioaccumulation (Table II). This was also the case for NB (4.0[‰]—Fig. 4) in mussels from Algeciras 1. Considering the fact that contaminants measured in this study are only a fraction of the total bulk of the genotoxic agents present in the marine environment, DNA damage detected at these sites may be related with exposure to pollutants not analysed. For example, chemical compounds such as triclosan, one of the best known antibacterial agents [Binelli et al., 2009]; drinking water disinfectants such as sodium hypochlorite, chlorine dioxide and peracetic acid [Bolognesi et al., 2004b]; the biocide tributyltin [Hagger et al., 2005] or the analgesic and antipyretic agent paracetamol [Parolini et al. 2010] have been shown to be able to induce MN in mussels. In addition, chromosome damage tends to be a cumulative process, and the contaminants do not necessarily need to be in the area at the time of sampling for MN assay to give a positive result [Ferguson

488 Fernández et al.

et al., 1996]. In this context, one of the clear advantages of using biological effect techniques is that they can indicate links between contaminant exposure and ecological endpoints, but can also serve to detect the impact of substances (or a combination of substances) that may not be analysed as part of routine chemical monitoring programmes [Thain et al., 2008].

CONCLUSIONS

The frequencies of MN, NB, and BN in gills of mussels from the Spanish Mediterranean coast allowed the discrimination of sites according to the degree of genotoxic and cytotoxic effects measured. Evidences of genotoxicity indicated by the highest levels of MN and NB found in mussels from the most metal (Pb, Hg, and Cd) polluted sites (Cartagena and Portman) seemed to be related to the ability of metals to produce oxidative stress, as it was indicated by the induced antioxidant enzymatic responses recorded in mussels from both sites. On the other hand, the frequencies of MN found in mussels from some organically polluted sites (Barcelona, Vallcarca, Tarragona, and Valencia), though higher than baseline levels, did not differ from them and were somewhat lower than expected. Signals of genotoxicity indicated by the high frequencies of MN and NB detected in mussels from Algeciras 1 and Manilva were not attributable to the pollutants analysed. Evidences of cytotoxicity indicated by the highest frequencies of BN found in mussels from Vallcarca, Barcelona and to a lesser extent, Cartagena, appeared to be related to the high accumulation of organic pollutants detected in mussels from these sites. This was also supported by the positive correlations detected between BN frequencies and the concentrations of PCBs, DDTs and some PAH analysed.

Results from this study also showed tha MN and NB were related to water temperature. Thus, the influence of this factor on their background levels should be taken into account in the application of these biomarkers as screening tools to detect environmental genotoxicity in biomonitoring programmes. In this context, lowest frequencies of MN (around 2‰) found in mussels from sites where the accumulation of pollutants analysed was low agreed with baseline data reported for the Mediterranean Sea, while lowest frequencies of NB (from 0.3 to 0.9‰) detected at nonpolluted sites could be considered as baseline levels for the Spanish Mediterranean coast in the thermal ranges measured.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the technical personnel of the Marine Contamination and Biological Effects group of the Oceanographic Centre of Murcia (IEO) for their assistance.

REFERENCES

- Accomando R, Viarengo A, Moore MN, Marchi B. 1999. Effects of ageing on nuclear DNA integrity and metabolism in mussel cells (*Mytilus edulis* L.). Int J Biochem Cell Biol 313:443–450.
- Akcha C, Izuel C, Venier P, Hubinzki H, Burgeot T, Narbonne JF. 2000a. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 49:269–287.
- Akcha F, Burgeot T, Budzinski H, Pfohl-Leszkowicz A, Narbonne JF. 2000b. Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed in vivo to B[a]P-contaminated feed. Mar Ecol Prog Ser 205:195–206.
- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, Gomes OF, Medeiros MHG, Di Mascio P. 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. J Exp Mar Biol Ecol 318:21–31.
- Andreikenaite L, Barsiene J, Vosyliene MZ. 2007. Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with heavy metal mixture and road maintenance salts. Acta Zool Lit 17:213–219.
- Ausili A, Gabellini M, Cammarata G, Fattorini D, Benedetti M, Pisanelli B, Gorbi S, Regoli F. 2008. Ecotoxicological and human health risk in a petrochemical district of southern Italy. Mar Environ Res 66:215–217.
- Barsiene J, Lethonen KK, Vuorinen P, Lang T, Pempkowiak J, Syvokiene J, Dedonyte V, Rybakovas A, Vountisjaervi H, Kopecka J. 2006a. Biomarker responses in the mussel (*Mytilus edulis*) and the flounder (*Platichthys flesus*) in the Klaipeda-Butinge area (Baltic Sea). Mar Pollut Bull 53:422–436.
- Barsiene J, Shiedek D, Rybakovas A, Syvokiene J, Kopecka J, Forlin L. 2006b. Cytogenetic and cytotoxic effects in gill cells of the blue mussel *Mytilus* spp. from different zones of the Baltic Sea. Mar Pollut Bull 53:469–447.
- Barsiene J, Andreikėnaitė L, Rybakovas A. 2006c. Cytogenetic damage in perch (*Perca fluviatilis* L.) and duck mussel (*Anodonta anatina* L.) exposed to crude oil. Ekologiya 1:25–31.
- Barsiene J, Syvokiene J, Bjornstad A. 2006d. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. Aquat Toxicol 78:S105–S108.
- Bihari N, Batel R, Zahn RK. 1990. DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus* galloprovincialis treated with benzo[a]pyrene and 4-nittroquinoline-N-Oxide. Aquat Toxicol 18:13–22.
- Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A. 2008a. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and pp-dichlorodiphenyldichloroethylene in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Mutat Res 649:135–145.
- Binelli A, Riva C, Provini A. 2008b. Genotoxic effects of p,p'-DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis-(chlorophenylethane) and its metabolites in zebra mussel (*D. polymorpha*) by SCGE assay and micronucleus test. Environ Mol Mutagen 49:406–415.
- Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A. 2009. In vivo experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in zebra mussel hemocytes. Aquat Toxicol 91:238–244.
- Binelli A, Cogni D, Parolini M, Provini A. 2010. Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere 79:518–528.
- Black MC, Ferrell JR, Horning RC, Martin LK. 1996. DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field. Environ Toxicol Chem 15:802–808.
- Bocchetti R, Fattorini D, Pisanelli B, Macchia S, 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.

- Bolognesi C, Rabboni R, Roggieri P, 1996. Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. Comp Biochem Physiol C 113:319–323.
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A. 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. Environ Mol Mutagen 33:287– 292.
- Bolognesi C, Frenzilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggieri P. 2004a. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: Wild versus caged mussels. Mutat Res 552:153–162.
- Bolognesi C, Buschini A, Branchi E, Carboni P, Furlini M, Martino A, Monteverde M, Poli P, Rossi, C. 2004b. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. Sci Total Environ 333:127–136.
- Brunetti R, Majone F, Gola I, Beltrame C, 1988. The micronucleus test: Examples of application to marine ecology. Mar Ecol Prog Ser 44:65–68.
- Brunetti R, Gabriele M, Valerio P, Fumagalli O. 1992. The micronucleus test: Temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus gallopro*vincialis. Mar Ecol Prog Ser 83:75–78.
- Burgeot T, Woll S, Galgani F. 1996. Evaluation of the micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French coasts. Mar Pollut Bull 32:39–46.
- Buschini A, Carboni P, Martino A, Poli P, Rossi C. 2003. Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*. Mutat Res 537:81–92.
- Cavas T, Ergene-Gözükara S. 2005a. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquat Toxicol 74:264–271.
- Cavas T, Ergene-Gözükara S. 2005b. Micronucleus test in fish cells: A bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. Environ Mol Mutagen 46:64–70.
- Cavas T, Garanko NN, Arkhipchuk VV. 2005. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. Food Chem Toxicol 43:569–574.
- Cheesman KH, Slater TF. 1993. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull 49:481–493.
- Dailianis S, Domouhtsidou GP, Raftopoulou E, Kaloyianni M, Dimitriadis VK. 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. Mar Environ Res 56:443–470.
- De Flora S, Bagnasco M, Zanacchi P. 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. Mutat Res 258:285–320.
- Depledge MH. 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. Mutat Res 399:109–122.
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ, Jha AN. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: A methodological overview. Mutagenesis 17:495–507.
- Dolcetti L, Venier P. 2002. Susceptibility to genetic damage and cell types in Mediterranean mussels. Mar Environ Res 54:487–491.
- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environ Health Perspect 101:101–107.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res 534:65–75.

Environmental and Molecular Mutagenesis. DOI 10.1002/em

Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels 489

- Ferguson LR, Gregory TJ, Pearson AE, Hay JE, Lewis GD. 1996. Mutagenicity tests as a monitoring tool for potential mutagens and carcinogens in shellfish gathering areas of New Zealand. NZ J Mar Freshw Res 30:413–421.
- Fernández B, Campillo JA, Martínez-Gómez C, Benedicto J. 2010. Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquat Toxicol 99:186–197.
- Frenzilli G, Nigro M, Scarcelli V, Gorbi S, Regoli F. 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A field study in a highly eutrophicated coastal lagoon. Aquat Toxicol 53:19–32.
- Gipperth L. 2009. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. J Environ Manage 90:86–95.
- Goldberg E. 1986. The mussel watch concept. Environ Monit Assess 7:91–103.
- Haaf T, Raderschall E, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Golub EI. 1999. Sequestration of mammalian Rad51–recombination protein into micronuclei. J Cell Biol 144:11–20.
- Hafez AM. 2009. *Mugil cephalus* genome: A sensitive monitor for genotoxicity and cytotoxicity in aquatic environment. Aust J Basic Appl Sci 3:2176–2187.
- Hagger JA, Depledge MH, Galloway TS, 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. Mar Pollut Bull 51:811– 816.
- Heddle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutat Res 18:307–317.
- IARC 1987. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity. An updating of IARC Monographs Volume 1–42: Suppl. 7. IARC, Lyon. France.
- ICES 2004. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC). International Council for the Exploration of the Sea. Ostend, Belgium.
- ICES 2007. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC. Alessandria, Italy. Rep. CM 2007/MHC:03.
- Izquierdo JI, Machado G, Ayllon F, d'Amico VL, Bala LO, Vallarino E, Elias R, Garcia-Vazquez E. 2003. Assessing pollution in coastal ecosystems: A preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*. Ecotox Environ Safe 55:24–29.
- Jha AN, Hagger JA, Hill SJ. 2000a. Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. Environ Mol Mutagen 35:343–350.
- Jha AN, Hagger JA, Hill SJ, Depledge MH. 2000b. Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBTO): An integrated approach to the evaluation of the relative sensitivities of two marine species. Mar Environ Res 50:565–573.
- Kalpaxis DL, Theos C, Xaplanteri MA, Dinos GP, Catsiki AV, Leotsinidis M. 2004. Biomonitoring of Gulf of Patras, N. Peloponnesus, Greece. Application of a biomarker suite including evaluation of translation efficiency in *Mytilus galloprovincialis* cells. Environ Res 94:211–220.
- Kopecka J, Lehtonen K, Barsiene J, Broeg K, Vuorinen P, Gercken J, Pempkowiak J. 2006. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdansk (southern Baltic). Mar Pollut Bull 53:406– 421.
- Kotelevtsev SV, Stepanova LI, Glaser VM. 1994. Biomonitoring of genotoxicity in coastal waters. In: Kees JMK, editors. Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. Boca Raton. Florida. pp 227– 241.
- Koukouzika N, Dimitriadis VK. 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: "Lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress." Ecotoxicology 14:449–463.

490 Fernández et al.

- Koukouzika N, Dimitriadis VK. 2008. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. Mar Pollut Bull 56:941–949.
- L and IS. 1988. Library and Information Services of the Marine Biological Association of the United Kingdom. Levels of carcinogens in the marine environment. Parts 1 and 2. The Laboratory Plymouth.
- Lee RF, Steinert S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/ comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat Res 544:43–64.
- Livingstone DR. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar Pollut Bull 42:656–666.
- Magni P, De Falco G, Falugi C, Franzoni M, Monteverde M, Perrone E, Sgro, M, Bolognesi C. 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). Environ Pollut 142:65–72.
- Majone F, Brunetti R, Gola I, Levis AG. 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after treatment with mitomycin C. Mutat Res 191:157–161.
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F. 2005. The point about oxidative stress in molluscs. ISJ 2:91–104.
- Mantecca P, Vailati G, Bachetta R. 2006. Histological changes and micronucleus induction in the zebra mussel *Dreissen polymorpha*. Histol Histopathol 21:829–840.
- Martínez-Gómez C, Campillo JA, León V, Fernández B, Benedicto J. 2007. Biomonitoring strategy to assess the effects of chemical pollution along the Iberian Mediterranean Coast: Present state and future development. ICES CM I:11.
- Martínez-Gómez C, Benedicto J, Campillo JA, Moore M. 2008. Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. J Environ Monit 10:490–499.
- Mersch J, Beauvais MN, Nagel P. 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. Mutat Res 371:47–55.
- Miele M, Bonatti S, Menichini P, Ottaggio L, Abbondandolo A. 1989. The presence of amplified regions affects the stability of chromosomes in drug resistant Chinese hamster cells. Mutat Res 219:171–178.
- Millot C, Taupier-Letage I. 2005. Circulation in the Mediterranean Sea. In: Saliot A, editor. The Handbook of Environmental Chemistry, 5 (K). Springer, Verlag, Heidelberg. pp 29–66.
- Monserrat JM, Martínez P E, Geracitano LA, Amado LL, Martins CMG, Pinho GLL, Chaves IS, Cravo MF, Lima JV, Bianchini A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. Comp Biochem Physiol C 146:221–234.
- Nigro M, Falleni A, Del Barga I, Scarcelli V, Lucchesi P, Regoli F, Frenzilli G. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. Aquat Toxicol 77:339–347.
- OSPAR Commission 2002. Survey on genotoxicity test methods for the evaluation of waste water within whole effluent assessment. ISBN 1-904426-02-6.
- Parolini M, Binelli A, Cogni D, Provini A. 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere 79:489–498.
- Pavlica M, Klobucar GIV, Vetma N, Erben R, Papes D. 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussels and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. Mutat Res 465:145– 150.
- 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.

- Rodilla V. 1993. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CGO cultures. Mutat Res 300:191–281.
- Scarpato R, Migliore L, Alfinito-Cognetti G, Barale R. 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. Mar Pollut Bull 21:74–80.
- Schiedek D, Broeg K, Barsiene J, Lehtonen K, Gercken J, Pfeifer S, Vuontisjärvi H, Vourinen PJ, Dedonyte V, Koehler A, Balk L, Schneider R. 2006. Biomarker responses as indication of contaminant effects in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the Southwestern Baltic Sea. Mar Pollut Bull 53:387–405.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. Mutat Res 31:9-15.
- Serrano-García L, Montero-Montoya R. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. Environ Mol Mutagen 38:38–45.
- Shi Y, Cao XW, Tang F, Du HR, Wang YZ, Qiu XQ, Yu HP, Lu B. 2009. In vitro toxicity of surface water disinfected by different sequential treatments. Water Res 43:218–228.
- Shimizu N, Itoh N, Utiyama H, Wahl GM. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S-phase. J Cell Biol 140:1307–1320.
- Shimizu N, Shimuara T, Tanaka T. 2000. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. Mutat Res 448:81–90.
- Siu WHL, Hung CLH, Wong HL, Richardson BJ, Lam PKS. 2003. Exposure and time dependent DNA strand breakage in hepatopancreas of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to Aroclor 1254, and mixtures of B[a]P and Aroclor 1254. Mar Pollut Bull 46:1285–1293.
- Siu WHL, Cao J, Jack RW, Wu RSS, Richardson BJ, Xu L, Lam PKS. 2004a. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquat Toxicol 66:345–447.
- Siu WHL, Mak E, Cao J, Luca-Abbott SB, Richardson BJ, Lam PKS. 2004b. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. Environ Toxicol Chem 23:1317–1325.
- Siu SYM, Lam PKS, Martin M, Caldwell CA, Richardson BJ. 2008. The use of selected genotoxicity assays in green-lipped mussels (*Perna viridis*): A validation study in Hong Kong coastal waters. Mar Pollut Bull 57:479–492.
- Stambuk A, Pavlica M, Malovic L, Klobucar GIV. 2008. Persistence of DNA damage in the freshwater mussel *Unio pictorum* upon exposure to ethyl methanesulphonate and hydrogen peroxide. Environ Mol Mutagen 49:217–225.
- Taleb ZM, Benghali S, Kaddour A, Boutiba Z. 2007. Monitoring the biological effects of pollution on the Algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. Oceanologia 49:543–564.
- Taleb ZM, Benali I, Gherras H, Ykhlef-Allal A, Bachir-Bouiadjra B, Amiard JC, Boutiba Z. 2009. Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus* galloprovincialis. Oceanologia 51:63–84.
- Thain JE, Vethaak AD, Hylland K. 2008. Contaminants in marine ecosystems: developing an integrated indicator framework using biological-effect techniques. ICES J Mar Sci 65:1508–1514.
- Underwood AJ. 1997. Experiments in ecology: Their logical design and interpretation using analysis of variance.Cambridge University Press, New York.
- UNEP/RAMOGE 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme.UNEP. 1–88. Athens.
- UNEP/WHO. 1995. Assessment of the state of pollution in the Mediterranean Sea by carcinogenic, mutagenic and teratogenic substances. MAP Technical Reports Series No. 92. Athens.

Micronuclei and Other Nuclear Abnormalities in Mussels 491

- Venier P, Maron S, Canova S. 1997. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a]pyrene. Mutat Res 390:33–44.
- Venier P, Tallandini L, Bisol PM. 2003. Characterization of coastal sites by applying genetic and genotoxicity markers in *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum*. Chem Ecol 19:113–128.
- Venier P, Zampieron C. 2005. Evidence of genetic damage in grass gobies and mussels from the Venice lagoon. Environ Int 31:1053–1064.
- Villela IV, de Oliveira IM, da Silva J, Henriques JAP. 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. Mutat Res 605:78–86.
- Woznicki P, Lewandowska R, Brzuzan P, Ziomek E, Bardega R. 2004. The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to benzo[a]pyrene. Acta Toxicol 12:41–45.
- Wrisberg MN, Bilbo, CM, Spliid H. 1992. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. Ecotox Environ Safe 23:191–205.

Accepted by— V. Mersch-Sundermann

RECAPITULACIÓN:

En este Capítulo se ha investigado la genotoxicidad y citotoxicidad en el medio marino a través de la cuantificación de anormalidades nucleares en branquias de mejillón silvestre, *Mytilus galloprovincialis*, de la costa mediterránea española. Se han determinado las frecuencias de micronúcleos (MN), de puentes nucleares (PN), y de células binucleadas (BN), y se ha estudiado su relación con la acumulación de los principales tipos de contaminantes (metales - Hg, Pb, Cd, Cu, Zn-, As, HAPs, PCBs y DDTs) en los tejidos de mejillón, los niveles en branquias de varias actividades enzimáticas (DT-diaforasa- DTD, glutatión S-transferasa- GST, superóxido dismutasa- SOD, catalasa- CAT, glutatión peroxidasas- GPs, y glutatión reductasa- GR), y las variables ambientales, temperatura y salinidad.

Las frecuencias de MN, PN y BN oscilaron entre 1,9 y 11,6 ‰, 0,3 y 4,6 ‰, y 0,0 y 3,9 ‰, respectivamente. Las frecuencias más altas de MN y PN se encontraron en los mejillones de Cartagena y Portmán (11,6 y 8,0 ‰, respectivamente), que acumularon las mayores concentraciones de metales pesados (Pb, Hg y Cd) en sus tejidos. Las correlaciones positivas detectadas entre las frecuencias de MN, la concentración de metales pesados Pb y Hg, y los niveles de las actividades enzimáticas SOD, SeGP y GR (y en menor grado nonSeGP y GST) sugieren que la genotoxicidad observada en los mejillones de Cartagena y Portmán está relacionada con un aumento en las roturas en la hélice de ADN debido a un incremento en la generación de radicales libres derivado de la acumulación de metales pesados. Además, la correlación positiva observada entre los niveles de MN y PN sugiere que ambas anormalidades nucleares son el resultado de eventos genotóxicos relacionados, y la correlación positiva observada entre las frecuencias de MN y PN y la temperatura del agua indica que este factor ambiental influye en la generación de ambos tipos de anormalidades nucleares. De hecho, la temperatura del agua parece ser determinante en la generación de MN en ausencia de estrés ambiental debido a una menor actividad mitótica y, por consiguiente, una menor generación basal de estas anormalidades nucleares a menor temperatura del agua. En este Capítulo se han propuesto como niveles basales de MN y PN en branquias de mejillón, M. galloprovincialis, para el área de estudio, y para el rango termal observado de 1,9 a 2,1 ‰ para los MN, y de 0,3 a 0,9 ‰ para los PN.

Por otro lado, las frecuencias de MN y PN fueron bajas en zonas donde los mejillones estuvieron expuestos a una exposición elevada y crónica a contaminantes orgánicos (Barcelona, Vallcarca, Tarragona y Valencia). La baja temperatura del agua observada en estos lugares en el momento de muestreo (de 16,6 a 18,5 °C), y el carácter crónico de la contaminación pudo influir en una menor generación de estas anormalidades nucleares, lo que pudo estar relacionado con una mejor adaptación y resistencia a la contaminación, así como con una mayor eficiencia en los mecanismos de reparación del ADN en organismos sometidos a contaminación crónica. Por el

contrario, a pesar de la baja acumulación de contaminantes detectada en los mejillones de Algeciras 1 y Manilva, la frecuencia de MN en sus branquias fue elevada, de 8,6 y 7,2 ‰, respectivamente. Esto pudo ser debido a la genotoxicidad de contaminantes no analizados en este estudio o que no estaban presentes en los tejidos de mejillón en el momento del muestro, pero cuya toxicidad persistente reflejaron estas elevadas frecuencias de MN.

La frecuencia de BN se correlacionó positivamente con la acumulación de PCBs, DDTs, Cu, y algunos de los HAPs analizados, mostrando los mejillones de Vallcarca, Barcelona y Cartagena los mayores niveles de este tipo de anormalidad nuclear. Esto sugirió que éste tipo de compuestos tienen capacidad citotóxica, y que la frecuencia de BN puede ser un biomarcador útil para detectar su presencia en el medio marino.

CAPÍTULO VI

Evaluación integrada de la calidad del agua de la Costa da Morte (Galicia, NO de España) a través de parámetros químicos, bioquímicos y fisiológicos en mejillón

RESUMEN:

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad ambiental en algunos de los lugares más afectados por el vertido del buque petróleo "Prestige" dos años después del accidente (abril y noviembre de 2004). Con este propósito se determinaron las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y diversos biomarcadores bioquímicos (actividades antioxidantes catalasa- CAT, glutatión reductasa- GR, glutatión peroxidasa- GP, superóxido dismutasa- SOD y DT-diaforasa- DTD, y peroxidación lipídica- LPO) y fisiológicos (esfuerzo para el crecimiento-Scope For Growth- SFG) en mejillón silvestre (Mytilus galloprovincialis) procedente de cuatro localizaciones de la Costa da Morte y de un lugar de referencia, no afectado por el vertido. Los resultados mostraron que la concentración de HAPs en los tejidos de mejillón descendió marcadamente 17 meses después del accidente, y que estos niveles siguieron decreciendo de abril a noviembre, momento en que las concentraciones de HAPs detectadas fueron similares a niveles basales observados con anterioridad al vertido. La predominancia de criseno en los perfiles de HAPs, de forma similar a lo que se observó inmediatamente después del vertido, indicó que el Prestige fue la fuente principal de los HAPs presentes en los tejidos de mejillón dos años después del accidente. A pesar de los bajos niveles de HAPs observados en abril y noviembre de 2004, los niveles de actividades antioxidantes (integrados a través del índice Respuesta Antioxidante Integrada- RAI) observados en los organismos de la Costa da Morte fueron superiores a los de los mejillones del lugar de referencia en ambos periodos de muestreo. En abril el RAI se relacionó con los niveles de HAPs encontrados en mejillón tres meses después del accidente (febrero 2003), lo que sugiere la persistencia en el medio marino de compuestos procedentes del vertido capaces de provocar estrés oxidativo. Sin embargo, las evidencias de estrés oxidativo no se reflejaron a nivel fisiológico en el esfuerzo para el crecimiento (SFG), ya que sólo se observaron ligeras diferencias entre los valores de SFG obtenidos en los organismos del lugar de referencia y aquellos procedentes de la Costa da Morte. En conclusión, aunque dos años después del vertido del Prestige los niveles de HAPs acumulados por los mejillones de la Costa da Morte eran similares a los niveles basales encontrados antes del accidente, los parámetros bioquímicos estudiados mostraron señales de estrés oxidativo en mejillones procedentes del área impactada. Sin embargo, el SFG reflejó un buen estado de salud para las poblaciones de mejillón estudiadas, que no mostraron evidencias de perturbación fisiológica ni 17 ni 24 meses después del vertido.

Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte (Galicia, NW Spain) by means of mussel chemical, biochemical and physiological parameters

Beatriz Fernández · Marina Albentosa · Lucía Viñas · Angeles Franco · Juan J. González · Juan A. Campillo

Accepted: 30 November 2009/Published online: 22 December 2009 © Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract The aim of this study was to assess environmental quality at some of the sites most severely affected by the Prestige oil spill off 2 years after the spillage (April and November 2004). For this purpose analyses of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and several biochemical (antioxidant enzymes catalase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and DT-diaphorase and lipid peroxidation) and physiological [scope for growth (SFG)] biomarkers were determined on wild mussel populations (Mytilus galloprovincialis) collected at four points along the Costa da Morte and compared with those of a reference site not affected by the oil spill. Results showed that PAH contents had markedly decreased 17 months after the accident, although they were higher in April than in November, when they showed values similar to background levels reported for this area. Nevertheless, the predominance of chrysene on PAH profiles, similarly to findings obtained immediately after the spill, indicated the *Prestige* as their main source. In spite of the low PAH levels recorded, antioxidant activity levels (explained through the integrated antioxidant response-IAR) were higher in the Costa da Morte than at the reference site either in April and November. In April IAR seems to be related to PAH levels found 3 months after the accident (February 2003), suggesting the persistence in the environment of oxidative stress-producing components from the spill. However,

B. Fernández · M. Albentosa (⊠) · J. A. Campillo
Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de
Oceanografía, IEO, Varadero 1, 30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain
e-mail: marina.albentosa@mu.ieo.es

L. Viñas · A. Franco · J. J. González Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía, IEO, Cabo Estai-Canido, 36200 Vigo, Spain evidence of oxidative stress was not reflected at physiological level by scope for growth, with only very slight differences being observed between values from the reference site and those from Costa da Morte sites. In conclusion, although 2 years after the spill PAHs bioaccumulated by mussels from the Costa da Morte had decreased to background levels, biochemical parameters showed signals of oxidative stress in mussels from this area. However, SFG reflected a good health status for the mussel populations studied and did not reveal evidence of physiological disturbance either 17 or 24 months after the *Prestige* spill.

Keywords Mytilus galloprovincialis · PAHs · Antioxidant enzymes · Lipid peroxidation · Scope for growth · Prestige oil spill

Introduction

Mussels are commonly used as bioindicators in the assessment of marine environmental quality throughout the world due to their wide geographical distribution, sessile character and capacity to pump large volumes of water and concentrate many contaminants in their tissues (Widdows and Donkin 1992). In this way, they are capable of resisting high levels of chemical contamination and of bioconcentrating xenobiotics to more than a thousand times background levels, which can facilitate chemical analysis. The usefulness of mussels as bioindicators is greatly increased when chemical analyses are integrated with data on the biological effects of pollutants (Bayne et al. 1988; Cajaraville et al. 2000; Devier et al. 2005). In this context, both laboratory and field studies have demonstrated that different biochemical, cellular and physiological indexes may be useful in marine organisms as biomarkers of exposure or damage due to chemical pollution (Lam and Gray 2003).

Oxidative stress is a common pathway of toxicity induced by several classes of pollutants (Winston and Di Giulio 1991) by which production of reactive oxygen species (ROS) is enhanced. ROS can be highly toxic to aquatic organisms as they often produce cellular damage such as lipid peroxidation (LPO) in membranes, altered pyridine nucleotide redox status and DNA damage (Lemaire and Livingstone 1993). Protection against the toxicity of oxyradicals towards cellular targets is afforded by a complex defence system consisting of both lowmolecular-weight scavengers and antioxidant enzymes. Enzymatic activities for the detoxification of ROS and the degree of LPO have been proposed as biomarkers of oxidative stress in mussels exposed to different types of pollutants (Viarengo et al. 1991; Solé et al. 1996; Porte et al. 2000a; Manduzio et al. 2004; Tsangaris et al. 2007).

A further biological index whose use in integrated monitoring studies is currently being considered is scope for growth (SFG), this being a measure of growth potential, a biological process that is highly sensitive to pollutants. The estimation of energy available for growth (somatic and gonadal) from the physiological determination of energy acquisition and consumption has been used in studies evaluating the quality of coastal marine ecosystems (Widdows et al. 1995, 1997, 2002; Cotou et al. 2002; Halldörsson et al. 2005). These studies have demonstrated the correlation between SFG and the accumulation of pollutants in tissues, and the study by Crowe et al. (2004) has also shown the existence of a correlation between SFG values and biodiversity indices in benthic communities, leading us to consider that SFG is a good indicator of pollution not only in individuals but also in populations (Widdows and Staff 2006).

After the accident involving the tanker Prestige in November 2002, that washed up the coastline of Galicia (NW Spain), numerous studies were carried out to determine the accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water, sediments and biota (Carro et al. 2006; Franco et al. 2006; González et al. 2006; Viñas et al. 2009) as well as along the north-west Portuguese coast (Ferreira et al. 2003). In most of these studies mussels were used as bioindicators both to determine the change over time and distribution of accumulated hydrocarbon levels (Nieto et al. 2006; Soriano et al. 2006) and to study their biological effects (Cajaraville et al. 2006; Marigómez et al. 2006; Orbea and Cajaraville 2006; Orbea et al. 2006). However, there have been fewer integrated studies involving chemical appraisals and biological determinations performed on the same sample of mussels. The data presented in this manuscript are the first to integrate physiological indicators such as SFG with biochemical indicators such as antioxidant enzyme and LPO levels as well as chemical data on the bioaccumulation of PAHs in wild mussels from the Galician coast affected by the *Prestige* oil spill.

One of the problems presented by combined studies that assess environmental quality on the basis of both chemical and biological criteria is precisely the integration of the results obtained in order to provide a correct and faithful interpretation of the results. In this regard Beliaeff and Burgeot (2002) have defined the Integrated Biomarker Response (IBR) index, which uses star plots to display the responses obtained from a battery of biomarkers. More recently, Dagnino et al. (2007) describe a system for integrating biomarker results in mussels which called "Expert System", based on the responses of different biomarkers in control and polluted mussels. The present study uses the index defined by Beliaeff and Burgeot that we have called the Integrated Antioxidant Response (IAR) to integrate the responses given by the different enzymatic antioxidant activities.

The purpose of this study was to assess the environmental quality of a stretch of the Galician coast, the Costa da Morte, through the use of chemical (PAH accumulation), biochemical (antioxidant enzymes and LPO) and physiological (SFG) determinations on the same sample of wild mussels. The selected biomarkers are indicators of both exposure (antioxidant activities catalase-CAT, glutathione reductase-GR, NAD(P)H DT-diaphorase-DTD, glutathione peroxidase-GPX and superoxide dismutase-SOD) and effects (LPO and SFG). The area studied corresponds to the part of the Galician coast that was most severely affected by the oil spill from the tanker *Prestige*, sampling being performed more than a year after the disaster and at two clearly differentiated times of year: April and November.

Materials and methods

Sampling

Sampling was carried out in April and November 2004, i.e. 17 and 24 months after the *Prestige* oil spill. Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were collected (Fig. 1) at five sites along the Galician coast from which four of them (Corrubedo, Punta Insua, Muxía and Caión) were highly impacted by the spill, whilst the fifth (Santa María de Oia) was not affected by the spillage and was used as a clean reference. These sites also coincide with those used in the IEO's Marine Pollution Monitoring Program, which means that data on PAH accumulation in wild mussels is available from before the spill.



Fig. 1 Map of the Galician coast (Spain) showing the location of the five sampling sites studied

For PAH determinations 50 mussels of a standard size (4 cm shell length) were pooled as a composite sample representative of each location and sampling period. Mussels were stored at -20° C until analysis. Once the samples were defrosted, mussel meat was homogenised and freeze-dried. For biochemical analysis, 35 mussels of the same size were collected at each sampling site. Gills were immediately removed and pooled in 7 samples, which were stored in liquid nitrogen prior to analysis. For SFG, at least 20 live mussels of the same size were packed in insulated boxes and transported cool and air-exposed via express delivery to the laboratory. Physiological determinations were individually carried out on 10 individuals.

PAH content in mussel tissues

Two standard solutions containing the 13 EPA PAHs analysed in this study (10 ng/ μ l in acetonitrile) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). LiChrosolv grade methanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC grade hexane, acetonitrile and acetone were obtained from Lab-Scan (Dublin, Ireland). MP Alumina B-Super I for column chromatography was purchased from MP EcoChrom (Eschwege, Germany).

Freeze-dried mussel tissues from each sample were Soxhlet extracted with a 1:3 acetone:hexane mixture for 8 h and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) as described elsewhere (Soriano et al. 2006). In brief, samples to be analysed by HPLC were submitted to a clean-up step by column chromatography on deactivated alumina (10% water) and hexane elution. 13 PAHs (phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene, chrysene, benzo[*e*]pyrene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, benzo[*a*]pyrene, benzo[*ghi*]perylene, dibenz[*ah*]anthracene and indeno[1,2,3-cd]pyrene) were determined by HPLC (HP 1100 apparatus, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled with a wavelength programmable fluorescence detector (HP 1036, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), using a Vydac 201 TP column (Grace Vydac, Hesperia, CA, USA), eluted with a methanol:water gradient.

A multilevel calibration curve produced from the certified solutions supplied by Dr. Ehrenstorfer was used for quantification. The analytical method was subjected to external quality control process, by participation in intercalibration exercises organised by Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe (QUASIMEME II 2003, 2004).

Biochemical parameters

Gills were homogenised in K-phosphate buffer 100 mM, pH 7.6 containing 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 3 µg/ml leupeptine. Cytosolic fractions were obtained after centrifugation at $600g \times 15$ min, $13.000g \times 20$ min and $100.000g \times 60$ min, while microsomal fractions were obtained by resuspension of the resulting pellet in 50 mM Tris–HCl pH 7.6 containing 20% (w/v) glycerol, 1 mM DTT and 1 mM EDTA. The entire procedure was conducted at 4°C. All enzyme determinations were carried out on cytosolic fractions at 25°C and expressed by protein content determined following the method described by Lowry et al. (1951).

Catalase (CAT) activity was measured according to Claiborne (1985) by the decrease in absorbance at 240 nm by H₂O₂ consumption ($\varepsilon = -0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as μ mol of H₂O₂ degraded min⁻¹ mg⁻¹ protein. Glutathione reductase (GR) activity was measured according to Ramos-Martínez et al. (1983) by following the decrease in absorbance at 340 mn ($\varepsilon =$ $-6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to the oxidation of NADPH and expressed as nmol of NADPH oxidised min⁻¹ mg⁻¹ protein. NAD(P)H DT-diaphorase (DTD) activity was measured as the dicumarol-inhibitable portion of NAD(P)H dependent DCPIP reductase activity (Benson et al. 1980). Reduction of DCPIP was monitored by measuring the decrease in absorbance at 600 nm ($\varepsilon = 21 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) and was expressed as nmol DCPIP reduced $\min^{-1} \operatorname{mg}^{-1}$ protein. Glutathione peroxidase Se-dependent (GPX) activity was measured monitoring the formation of GSSG in a coupled enzyme system with glutathione reductase (Livingstone et al. 1992) at 340 nm ($\varepsilon = -6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed as nmol of NADPH oxidised $min^{-1} mg^{-1}$ protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by measuring the reduction of cytochrome c by O₂⁻ generated by the xanthine oxidase/hypoxanthine system at 550 nm (McCord and Fridovich 1969). Activity was expressed as Units min⁻¹ mg⁻¹ protein, with one unit of SOD being defined as the amount of enzyme that inhibits the reduction of cytochrome c by 50%.

141

Lipid peroxidation (LPO) was quantified on microsomal fractions of gills as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) following Buege and Aust (1978). The malondialdehyde (MDA) formed was estimated at 535 nm using a standard of malonaldehyde bis-(dimethylacetal) and lipid peroxidation was expressed as nmol of MDA formed mg⁻¹ protein.

Physiological parameters

The mussels were acclimatised after transport for 24 h in tanks under controlled temperature and feeding conditions (15°C and the microalgae *Isochrysis galbana*, clone T-ISO as food). Physiological measurements were taken the day after the mussels arrived at the laboratory, to which end they were kept individually under standardised conditions (filtered 35 psu SW, 15°C, and a standard algal ration of *I. galbana*, 1 mg organic matter AFDW 1^{-1}) (Widdows et al. 2002) in a flow-through system.

Clearance rates (CR) were calculated from the difference in food concentrations at the inflow and outflow points of the flow-through system. The flow rate was adjusted in order to maintain a difference between inflow and outflow concentrations of less than 40% of the inflow. Ingestion rates (IR) were obtained from the clearance and food concentration rates, expressed as units of organic matter per litre. This was done by filtering inflow samples through previously rinsed, ashed and weighed Whatman GF/C filters. The filters were then rinsed with a 0.5 M ammonium formate solution, dried for 24 h at 100°C and ashed at 450°C for 1 h. The difference between dry weight and ashed weight was taken as organic weight.

Absorption rates (AR) were obtained by multiplying the IRs by the absorption efficiency (AE), the latter being calculated according to the method described by Conover (1966) from the organic content of faeces and food.

The energy consumption rates, namely the excretion rate (ER) and the respiration rate (RR), were determined in sealed glass respirometers each containing a single mussel with filtered sea water at 15° C. Oxygen concentrations were measured using a YSI 52 DO instrument connected to a YSI 5905 self-stirring BOD probe. Ammonia concentrations were measured using the indophenol blue method as described by Solorzano (1969).

Physiological rates were standardised for a specimen of 1 g flesh dry weight using the allometric exponent b = 0.67, which relates the variation in physiological rates to animal size (weight) (Bayne and Newell 1983). Physiological rates were converted to energy equivalents (J g⁻¹ h⁻¹) in order to calculate their energy balance, using the energy equivalents referred to in Widdows and Johnson (1988). SFG was calculated by means of the expression: I = F + E + R + P thence $P(SFG) = (I - F) - E - R = (I \times AE)$, where I is

the energy ingested, F the energy lost in faces, AE the absorption efficiency, R the energy consumed in respiration, E the energy eliminated during excretion and P the energy available for somatic and gonadal growth (SFG).

Statistical analysis

The variation of each biomarker was tested by one-way analysis of variance (ANOVA). When ANOVA was significant (P < 0.05), post hoc pair-wise comparisons between locations were made using the SNK test to determine which values differed significantly (P < 0.05). The homogeneity of variances was checked by means of the Levene test. The antioxidant responses offered by the enzymatic activities (CAT, GR, GPX, DTD and SOD) evaluated were integrated in the IAR (Integrated Antioxidant Response), based on the IBR (Integrated Biomarker Response) described in Beliaeff and Burgeot (2002). We used this index in order to determine the antioxidant response and/or the oxidative stress to which each site was subjected. Previously, Pearson correlation analysis, based upon the mean for each variable at each sampling site, was performed to determine the strength of the relationship between antioxidant activities in order to check the existence of cooperative enzyme behaviour which allowed us to use the IAR index.

Results

PAH contents in mussel tissues

Table 1 shows total PAH levels (sum of 13 parent PAHs) measured on whole soft tissues of mussels collected from the sampling sites in April and November 2004. It also contains the PAH levels observed before (October 2000)

Table 1 Total concentration of 13 parent PAHs ($\mu g kg^{-1} dry$ weight) on whole soft tissues of wild mussels from the Galician coast at the indicated dates

Sites	Oct-00 ^a	Feb-03 ^a	Jun-03 ^a	Nov-03 ^a	Apr-04	Nov-04
Sta M ^a Oia	59	69	17	29	25	21
Corrubedo	101	7,782	1,455	430	179	48
Punta Insua	54	4,131	456	342	100	60
Muxía	63	3,548	82	214	119	108
Caion	86	3,059	692	625	255	117

Sum of phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[e]pyrene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene, dibenz[ah]anthracene, indeno[1,2,3-cd]pyrene

^a Data obtained from Table 1 of Soriano et al. (2006)

and after (February, June and November 2003) the *Prestige* oil spill, obtained from Soriano et al. (2006). After 4 months the accident (February 2003) the highest PAH levels were found in the area selected for this study, between Corrubedo and Caión (from 3,000 to 7,780 μ g kg⁻¹ dry weight). Although PAH levels had markedly decreased 17 months after the accident, in April 2004, they were still somewhat higher than before the accident, with Caión and Corrubedo showing the highest PAH content (255 and 179 μ g kg⁻¹ dw). Furthermore, PAH concentrations at the four Costa da Morte sampling sites continued to decrease from April to November 2004, when they showed very similar levels to those observed before the oil spill occurred. Mussels from Santa María de Oia were unaffected by the spill, there being no substantial difference in their PAH content as measured before and after the accident; the values were also the lowest of those recorded for all the sampling sites and dates.

Profiles of the distribution of the 13 PAHs at the sampling sites in April and November, including the data obtained before and after the accident, are shown in Fig. 2. In April, mussels collected from the Costa da Morte showed similar PAH profiles to those obtained immediately after the spill occurred, with a clear predominance of chrysene, whereas there had been no predominance of any single PAH at the same sites prior to the event. In November, PAH profiles were still dominated by chrysene at Corrubedo, Punta Insua and Caión and by chrysene and

Fig. 2 Radial representation of the percentages of 13 parent PAH distribution (P: phenanthrene, Ant: anthracene, Fla: fluoranthene, Py: pyrene, BaA: benz[a]anthracene,C: chrysene, BePy: benzo[e]pyrene, BbFl: benzo[b]fluoranthene, BkFl: benzo[k]fluoranthene, BaP: benzo[a]pyrene, Bper: benzo[ghi]perylene, DbahA: dibenz[ah]anthracene, Ipy: indeno[1,2,3-cd]pyrene) in mussels from the study sites before the accident (October 2000), 3 months after the accident (February 2003) [obtained from Soriano et al. (2006)] and in April and November 2004



fluoranthene at Muxía. At Santa María de Oia, PAH profiles were similar in April and November, with a predominance of phenanthrene, fluoranthene and pyrene. PAH profiles at this site were therefore clearly different from those found at the most severely affected sites.

To sum up, a year after the disaster PAH levels obtained from the area hardest hit by the oil spill, namely the Costa da Morte, had decreased dramatically, and they continued to fall until 2 years after the oil reached the coast, by which time they had returned to values similar to those observed prior to the spill. Nevertheless, even though the levels of PAHs were low, the profile of their distribution in 2004 samples was similar to that obtained immediately following the spill.

Biochemical parameters

Results of the statistical analysis (ANOVA) carried out on both the biochemical and the physiological parameters are shown in Table 2. Levels of antioxidant enzyme activities and the IAR obtained in April and November are shown in Table 3.

In April the mean values of the IAR index ranged from 0.7 to 12.6 in the cases of Santa María de Oia and Corrubedo, respectively. At Corrubedo and Muxía the IAR values were significantly higher than the values of the reference station (P < 0.05). These SNK test results of the IAR values seem to be related to the mussel PAH contents observed just after the accident in February 2003 (Table 1) in the sense that higher IAR data were obtained at the same stations where higher PAHs levels were observed. From the five antioxidant activities measured that constitutes the IAR, this is particularly true in the case of the GR and DTD activities. In this way, the four sampling sites along the Costa da Morte showed the highest levels of GR activity and the SNK test shows a similar profile between these activities and the PAHs contents after the spill. Similarly, DTD enzymatic activity was significantly higher at Corrubedo and Muxía than at the reference station, and CAT and GPX activities were also higher at the former sites than at the latter, although without reaching the threshold of statistical significance (P > 0.05) Furthermore, at Corrubedo (the highest mussel PAH content in 2003) all the enzymatic antioxidant activities determined (CAT, GR, DTD, GPX, SOD) were significantly higher than those found at the reference site. The CAT SNK test results, on the contrary as described for the other activities, seem to be related to 2004 mussel PAH contents when the highest PAH levels found in Corrubedo and Caión (Table 1) are corresponding with higher CAT activities.

In November the pattern shown by the IAR index was noticeably different, since only the value obtained at Caión (11.5) was significantly higher than that for Santa María de Oia (3.0); although the IAR index at Muxía (5.1) was much higher than that of the reference station, this difference was not statistically significant. At Caión all the antioxidant activities evaluated were higher than at the reference site, although only CAT and DTD were significantly higher (P < 0.05). Similarly, at Muxía activity levels of the antioxidant enzymes CAT, GR, DTD and SOD were higher than at Santa María de Oia, although this difference was only statistically significant in the case of DTD. In contrast to April results, in this survey seems to be a relation between antioxidant activities, mainly DTD, and the PAH accumulation registered in 2004.

Some enzymes displayed a seasonal pattern, this being the case of CAT, GR and, more clearly, SOD, whose activities were significantly higher (P < 0.05) in April (spring) than in November (autumn).

Positive correlations were found between the different antioxidant responses evaluated (Table 4). Thus, in April DTD was significantly correlated to GPX (r = 0.960, P = 0.009), and DTD was also closely correlated to GR and SOD ($r_{GR} = 0.857$, P = 0.064; $r_{SOD} = 0.828$, P = 0.084), and SOD to GPX (r = 0.867, P = 0.057). In November, SOD was significantly correlated to CAT ($r_{CAT} = 0.961$, P = 0.009), with the degree of its correlation to GR and DTD falling just short of statistical significance ($r_{GR} = 0.816$, P = 0.092; $r_{DTD} = 0.810$, P = 0.097), whilst CAT was correlated to GR (r = 0.872) with a significance level of 0.054.

LPO values in the gills of the organisms sampled in April (Table 5) showed no significant differences between any of the various sampling sites. On the other hand, in November LPO values at Punta Insua and Muxía were significantly higher than those at the reference site.

Physiological biomarkers

Results of physiological components of the energy balance of mussels in April and November are presented in Table 6 and Fig. 3. On each of the two occasions the SFG value was higher at the reference site, Santa María de Oia. In April this difference was significant when compared to the other sites (P < 0.05). In spite of this level of significance, the variation in SFG was little more than 14% of the value obtained at the reference site. In November, however, the SFG value for the reference site was similar (P > 0.05) to that obtained at any of the sampling sites located along the Costa da Morte (Table 6).

This difference in SFG values between sampling sites depends to a great extent on the variation in ingestion rate, and thus in absorption rate. The results of the SNK test performed on SFG values coincide with those obtained for the ingestion rate. On the other hand, the variation in metabolic rates between the different sampling sites is in

Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte

Table 2	ANOVA	table for	
		unone non	

biochemical and physiological variables measured

	April					Novemb	er			
	SS	df	MS	F	Р	SS	df	MS	F	Р
CAT										
BG	807	4	201.7	1.39	0.262	1,518	4	379.4	7.86	0.000*
WG	4,358	30	145.3			1,447	30	48.2		
Total	5,165	34				2,965	34			
GR										
BG	3,041	4	760.3	5.89	0.001*	1,497	4	374.2	3.14	0.028*
WG	3,872	30	129.1			3,570	30	119.0		
Total	6,914	34				5,067	34			
DTD										
BG	461	4	115.3	6.81	0.001*	478	4	119.5	7.30	0.001*
WG	508	30	16.9			377	23	16.4		
Total	970	34				854	27			
GPX										
BG	162	4	40.5	2.59	0.057	55	4	13.9	1.20	0.332
WG	469	30	15.6			348	30	11.6		
Total	632	34	1010			403	34	1110		
SOD	052	51				105	51			
BG	3 862	4	965 5	8 53	0.000*	361	4	90.3	4 56	0.005*
WG	3 306	30	113.2	0.55	0.000	504	30	10.5	4.50	0.005
Total	7 258	24	115.2			055	24	19.0		
	7,238	54				955	54			
	660	4	167	21 47	0.000*	402	4	102	20.44	0.000*
bU WC	150	4 20	107	51.47	0.000	495	20	125	20.44	0.000
WG	139	24	5			101	24	0		
Total	828	34				0/3	34			
LPO	1	4	0.2	2.24	0.090	5	4	1.4	(77	0.001*
BG	1	4	0.3	2.24	0.089	2	4	1.4	6.//	0.001*
WG	4	30	0.1			6	30	0.2		
Total	6	34				11	34			
IR										
BG	9,697	4	2424.2	11.17	0.000*	4,301	4	1075.3	2.78	0.038*
WG	9,766	45	217.0			17,400	45	386.7		
Total	19,462	49				21,701	49			
AR										
BG	4,592	4	1148.1	5.81	0.001*	7,043	4	1760.8	6.26	0.000*
WG	8,887	45	197.5			12,654	45	281.2		
Total	13,479	49				19,697	49			
ER										
BG	2	4	0.5	12.29	0.000*	1	4	0.2	7.64	0.000*
WG	2	45	0.0			1	45	0.0		
Total	4	49				2	49			
RR										
BG	61	4	15.4	17.01	0.000*	6	4	1.6	3.32	0.018*
WG	41	45	0.9			21	45	0.5		
Total	102	49				27	49			
SFG										
BG	2,051	4	512.7	4.07	0.007*	1,894	4	473.5	4.29	0.005*
WG	5,671	45	126.0			4,968	45	110.4		
Total	7,722	49				6,862	49			

BG between groups, *WG* whithin groups, *SS* sum of square, *DF* degrees of freedom, *MS* mean square, *F F* value; *P* significance level. * Significant values (P < 0.05)

Sites	CAT^{1}		GR^2		DTD^2		GPX^2		SOD^3		IAR	
	April	November	April	November	April	November	April	November	April	November	April	November
Sta M ^a Oia	49.7 ± 1.5^{a}	$40.9 \pm 1.7^{\rm b}$	30.6 ± 2.1^{a}	$37.9\pm3.1^{\mathrm{bc}}$	$10.7\pm1.8^{\mathrm{a}}$	11.1 ± 1.9^{a}	11.3 ± 0.6^{a}	12.4 ± 1.0^{a}	40.4 ± 3.9^{a}	$16.4\pm2.2^{\rm ab}$	$0.7\pm0.3^{\mathrm{a}}$	$3.0\pm0.9^{\mathrm{ab}}$
Corrubedo	$63.8\pm5.8^{\rm b}$	$34.9\pm1.6^{\mathrm{a}}$	$61.9\pm5.0^{\mathrm{c}}$	$28.5\pm0.9^{\rm a}$	$21.0\pm2.0^{\mathrm{c}}$	$13.9\pm1.5^{\mathrm{a}}$	$17.9 \pm 1.2^{\mathrm{b}}$	13.8 ± 1.6^{a}	$61.4\pm5.1^{\rm b}$	$13.9\pm1.3^{\mathrm{a}}$	$12.6 \pm 1.3^{\circ}$	$2.0\pm0.9^{\mathrm{a}}$
Punta Insua	$50.6\pm2.0^{\mathrm{a}}$	$39.5\pm1.5^{\mathrm{ab}}$	$50.2\pm3.8^{\mathrm{b}}$	$31.4\pm2.3^{\mathrm{ab}}$	$12.4\pm1.5^{\mathrm{a}}$	$11.2\pm0.7^{\mathrm{a}}$	$11.5\pm0.7^{\mathrm{a}}$	$10.4\pm0.8^{\mathrm{a}}$	$32.1\pm2.5^{\mathrm{a}}$	$11.8\pm0.7^{\mathrm{a}}$	$1.9\pm0.7^{ m ab}$	$1.0\pm0.5^{\mathrm{a}}$
Muxía	$56.1\pm4.3^{\mathrm{ab}}$	$43.0\pm2.5^{\rm b}$	$42.9 \pm 3.6^{\mathrm{b}}$	$38.9\pm2.9^{\mathrm{c}}$	$16.5\pm0.9^{ m b}$	$18.9\pm0.9^{ m b}$	15.1 ± 1.7^{ab}	11.6 ± 1.4^{a}	$39.5\pm3.9^{\mathrm{a}}$	$16.7\pm1.7^{\rm ab}$	$3.9\pm1.0^{ m b}$	$5.1 \pm 1.1^{\rm b}$
Caión	$63.6\pm5.0^{\mathrm{b}}$	$52.0\pm1.8^{\rm c}$	$42.3\pm4.1^{\rm b}$	$43.4 \pm 2.9^{\mathrm{c}}$	$13.2\pm0.8^{\rm ab}$	$21.6\pm1.4^{\rm b}$	$11.8\pm2.1^{\rm a}$	$13.5\pm1.4^{\rm a}$	29.8 ± 2.6^{a}	$21.4\pm2.0^{\mathrm{b}}$	$1.6\pm0.7^{\mathrm{ab}}$	$11.5\pm1.1^{\rm c}$
1 µmol mir	1^{-1} mg prot ⁻¹ ;	² nmol min ⁻¹	mg prot ⁻¹ ; ³ U	min ⁻¹ mg pro	t ⁻¹							

Table 3 Mean values (±standard error) of antioxidant enzymes catalase (CAT), glutathione reductase (GR), DT-diaphorase (DTD), glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase

B. Fernández et al.

no way related to the variation in SFG. Furthermore, the physiological rate that from a quantitative point of view has the greatest influence on calculating SFG values is the ingestion rate. In terms of total energy acquired (Fig. 3), the greatest proportion is used for growth, SFG, with slight differences depending on the time of year.

In spring, this fraction accounts for almost 70% of the ingested energy, but is somewhat less in autumn, when it falls to 62%. The energy fraction used in respiration is 7% in spring and 5% in autumn. Energy losses due to faeces are higher in autumn, at 32%, as opposed to 23% in spring. There is therefore a clear seasonal variation in physiological rates, regardless of whether they concern energy acquisition (CR, IR and AR) or energy loss (ER and RR), with all of them showing significantly higher values in spring than in autumn (P < 0.05). Consequently, SFG values obtained by integrating such physiological parameters also depend on the time of year, and were approximately 40% higher in April than those for November (P < 0.05) in all sampling sites, with the exception of Punta Insua, where the SFG values for both times of year were similar (P > 0.05), this being due to the fact that the clearance rates, and therefore the ingestion and absorption rates, were also similar. However, the metabolic rates (ER and RR) of the mussels gathered at this site (Punta Insua) follow the same seasonal pattern as the rest, i.e. with significantly higher values being obtained in April.

Discussion

Of the sites along the Galician coast selected for this study, only Santa María de Oia, located just north of Portugal, was not affected by the Prestige oil spill. The remaining four sites, located along the Costa da Morte, were severely affected by the spill, with a PAH content in mussel tissue of 7,780 μ g kg⁻¹ dw at Corrubedo and of between 3,000 and 4,000 μ g kg⁻¹ dw at the other three sites (Soriano et al. 2006). PAH levels in mussel tissue showed a considerable decrease 17 months after the spill occurred, in April 2004 (at Corrubedo, for example, the concentration of PAHs fell from 7,780 to 179 μ g kg⁻¹ dw), although these levels were still slightly higher than those obtained in November of the same year. At that time, precisely 2 years after the oil spill occurred, PAH levels $(40-120 \ \mu g \ kg^{-1} \ dw)$ were similar to those recorded in other areas of Galicia situated far from possible anthropogenic influences (Viñas 2002). This recovery time is similar to that observed after the accident involving the oil tanker Aegean Sea, when it was concluded that 1 year after the spill PAH values in mussels at the most severely affected areas had returned to background levels (Porte et al. 2000b). On the contrary, after the Exxon Valdez

742

Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte

Table 4 Pearson correlation analysis between antioxidant activities evaluated in mussels collected from Costa da Morte after 2 years of the *Prestige* oil spill (April and November 2004)

	April				November			
	CAT	GR	DTD	GPX	CAT	GR	DTD	GPX
GR	0.276 (0.653)				0.872* (0.054)			
DTD	0.368 (0.542)	0.857* (0.064)			0.756 (0.139)	0.496 (0.395)		
GPX	0.233 (0.706)	0.701 (0.187)	0.960*** (0.009)		0.425 (0.476)	0.059 (0.925)	0.389 (0.518)	
SOD	-0.004 (0.995)	0.650 (0.235)	0.828* (0.084)	0.867* (0.057)	0.961*** (0.009)	0.816* (0.092)	0.810* (0.097)	0.550 (0.337)

Correlation coefficients are significant at the *0.1, **0.05 or ***0.01 (significance level shown between brackets). n = 5

Table 5 Mean values (\pm standard error) of lipid peroxidation (LPO) (nmol min⁻¹ mg prot⁻¹) in gills of wild mussels from the Galician coast

Sites	LPO	
	April	November
Sta M ^a Oia	$1.5\pm0.1^{\mathrm{a}}$	1.8 ± 0.1^{a}
Corrubedo	1.4 ± 0.1^{a}	$1.7 \pm 0.2^{\mathrm{a}}$
Punta Insua	$1.9 \pm 0.2^{\mathrm{a}}$	$2.5\pm0.2^{\mathrm{b}}$
Muxía	1.6 ± 0.1^{a}	2.4 ± 0.2^{b}
Caion	1.4 ± 0.1^{a}	1.4 ± 0.1^{a}

Data with the same superscript did not differ significantly (SNK test, ANOVA *F*-test)

disaster, Carls et al. (2001) described that out of a total of 23 sampling stations for mussel (Mytilus trossulus), only 9 had returned to pre-spill PAH levels, whilst in another 10 PAH levels 3 years after the spill were significantly higher than those considered to be background values, rising as high as 8,100 μ g kg⁻¹ dw at some sites. The extremely low water temperatures may slow down the PAH degradation and dissolution processes, thereby increasing the temporal persistence of these pollutants remained in the marine environment. On the other hand, 3 years after the Erika disaster, PAH levels in mussels from the areas most severely affected by the oil spill had decreased considerably (Tronczynski et al. 2004), although C-PAH levels were still higher than before the spill, indicating that the purification process was not yet complete. The ability to return to background levels differs from one disaster to another since not only the characteristics of the spill but also the environmental and geographical conditions of the affected areas will condition the rate at which PAHs are eliminated from mussel tissue. Other studies performed on the Galician coast after the Prestige disaster (Nieto et al. 2006) indicate that the process of returning to prior PAH levels in mussels is a rapid one, taking about 1 year, a finding which coincides with the data from the present study and can be related to the high dynamics of the Galician coast. It should be pointed out that the time when the final samples were taken in this study, November 2004, corresponds to a favourable time of year for the accumulation of PAHs, due to the resuspension of sediments that may still contain hydrocarbons and the high lipid content of mussel tissues as a result of the process of gametogenesis. In spite of these factors, the levels found at this time can be considered to be background levels (Viñas 2002), and are also appreciably lower than those described as background levels at other points along the European coastline (Granby and Spliid 1995; Baumard et al. 1998, 1999).

Before the spill, PAH profiles at all the sites studied, with the exception of Corrubedo, contained the whole set of 3-6 ring PAHs, indicating that these sites were unaffected by oil pollution at the time. However, at Corrubedo, which showed relatively high PAH levels before the spill occurred (101 μ g kg⁻¹ dw), there was a predominance of chrysene, possibly indicating a previous petrogenic input at this site prior to the Prestige disaster. After the spill occurred (February 2003), Caión, Muxía, Punta Insua and to a lesser extent Corrubedo showed almost identical profiles with chrysene as the predominant PAH compound, together with high percentages of benzo[b]fluoranthene and benzo[e]pyrene. This indicates that the oil from the Pres*tige* was the single source of this pollution, as other studies using mussels from the same area (Soriano et al. 2006, Nieto et al. 2006) or organisms from the NW coast of Portugal (Ferreira et al. 2003) have also concluded.

It is well known that the exposure of molluscs to different marine pollutants leads to an increased accumulation of reactive oxygen species (ROS) and that antioxidant defences are required to prevent oxidative stress and cellular damage (Viarengo et al. 1990; Winston and Di Giulio 1991; Manduzio et al. 2005). Antioxidant enzyme levels have been used in various studies as a biomarker for the oxidative stress produced in marine bivalves by hydrocarbons (Solé et al. 1995; Porte et al. 2001a) and other pollutants (Regoli and Principato 1995; Regoli 1998; Cheung et al. 2002; Lionetto et al. 2003; Nesto et al. 2004; Petrovic et al. 2004; Torres et al. 2002). Studies by Solé et al. (1996), Albaigés et al. (2000) and Porte et al. (2000a), carried out on mussels affected by the oil spill from the

	(man mam											
Sites	CR ¹		IR^2		AR^2		ER^2		RR ²		SFG^2	
	April	November	April	November	April	November	April	November	April	November	April	November
Sta M ^a Oia	$5.8\pm0.2^{\mathrm{a}}$	$4.6\pm0.1^{\mathrm{ab}}$	133.2 ± 5.0^{a}	$106.5\pm3.4^{\mathrm{ab}}$	102.6 ± 3.9^{a}	72.4 ± 2.3^{ab}	1.6 ± 0.08^{a}	0.6 ± 0.06^{a}	$8.8\pm0.4^{ m bc}$	$5.5\pm0.2^{\mathrm{a}}$	92.2 ± 3.8^{a}	$66.3 \pm 2.3^{\rm ab}$
Corrubedo	$4.9\pm0.2^{ m b}$	$3.8\pm0.2^{\circ}$	$113.8\pm5.0^{\rm b}$	$86.6\pm3.8^{\circ}$	$87.7 \pm 3.9^{\mathrm{b}}$	$58.9\pm2.6^{\circ}$	$1.2\pm0.05^{\mathrm{b}}$	$0.5\pm0.05^{\mathrm{b}}$	$6.8\pm0.2^{ m d}$	$4.7\pm0.2^{\mathrm{b}}$	$79.6\pm3.8^{\mathrm{b}}$	$53.7\pm2.7^{\mathrm{b}}$
Punta Insua	$4.6\pm0.1^{ m b}$	$4.9\pm0.2^{\mathrm{a}}$	$106.6\pm2.8^{\rm b}$	112.3 ± 5.4^{a}	$82.0\pm2.1^{\mathrm{b}}$	$76.3 \pm 3.7^{\mathrm{a}}$	$1.3\pm0.05^{\mathrm{b}}$	$0.3 \pm 0.03^{\mathrm{b}}$	$8.0\pm0.2^{ m c}$	$5.7\pm0.1^{\mathrm{a}}$	$72.7 \pm 2.1^{\mathrm{b}}$	$70.4 \pm 3.7^{\mathrm{a}}$
Muxía	$5.1\pm0.2^{\rm ab}$	$4.2\pm0.2^{ m abc}$	$117.4\pm5.0^{\mathrm{b}}$	$96.9\pm3.7^{ m abc}$	$90.4\pm3.8^{\mathrm{b}}$	$65.9\pm2.5^{\mathrm{abc}}$	1.7 ± 0.04^{a}	$0.3\pm0.03^{\mathrm{b}}$	$9.1\pm0.4^{ m b}$	$5.1\pm0.2^{ m b}$	$79.6\pm3.8^{\mathrm{b}}$	60.5 ± 2.5^{ab}
Caión	$5.1\pm0.2^{\mathrm{b}}$	$4.0\pm0.3^{ m bc}$	$116.4 \pm 4.9^{\mathrm{b}}$	$91.2\pm7.2^{\mathrm{bc}}$	$89.6\pm3.8^{\mathrm{b}}$	$62.0 \pm 4.9^{\mathrm{bc}}$	$1.2\pm0.09^{\mathrm{b}}$	$0.3\pm0.04^{\mathrm{b}}$	$10.2\pm0.2^{\rm a}$	$5.4\pm0.3^{\mathrm{ab}}$	$78.3 \pm 3.9^{\rm b}$	$56.3 \pm 4.8^{\mathrm{b}}$
1 1 h ⁻¹ ; ² J	h ⁻¹ for a stan	ndarized individ	dual of 1 g of n	neat dry weight								
Data with th	e same supers	cript indicated	that they did n	ot differ significa	ntly at the 95%	i level (SNK tes	t done after a	significant AI	VOVA was peri	formed at eac	h site)	

CR clearance rate, IR ingestion rate, AR absorption rate, ER excretion rate, RR respiration rate, SFG scope for growth



Fig. 3 Components of the energy budget of wild mussels collected from Galician coast sites affected by the *Prestige* oil spill. *Total bar* indicate ingested energy which is composed by the energy used in respiration, the energy lost in faeces production and energy available for growth SFG. SFG mean values are indicated for both seasons (April and November). Energy losses due to excretion process are not included as they suppose less than 1% of the ingested energy

Aegean Sea revealed that high body levels of PAH were related to increased responses of cytochrome P450, CYPIA-like protein, SOD or LPO. Bocquene et al. (2004) also reported high levels of DNA adducts and LPO as well as low AChE activity in M. edulis 6 and 12 months after the Erika oil spill. In the specific case of the Prestige, after 5 months the spill an increase in oxidative stress, as evaluated by means of enzyme determinations (EROD, GST, GR and CAT), was detected in the demersal fish species Lepidorhombus boscii and Callionymus lyra, gradually decreasing in the 3 years after the spill (Martínez-Gómez et al. 2006, 2009). Similarly, Cajaraville et al. (2006) and Orbea and Cajaraville 2006 found a high degree of disturbance in several cell and tissue biomarkers (peroxisome proliferation, lysosomal membrane stability, atrophy of digestive epithelium, acyl-CoA oxidase-AOX

744

activity) in mussels from the most severely affected areas in the first 12 months after the spill, although a tendency to return to previous values was noted 2 years after the disaster.

The correlation between activity levels of the different antioxidant enzymes in April and November (Table 4) reflects the existence of cooperative enzyme behaviour, indicating a greater efficiency of the antioxidant defence system, as has also been described by Manduzio et al. (2004). For this reason, this study aims to integrate all the enzymatic antioxidant levels in a single synthetic index, the IAR, which would provide a global description of this behaviour and facilitate the interpretation of the results.

In April, high antioxidant enzymatic levels in Costa da Morte sites determine that their mean IAR values were higher than at the reference site. The significantly higher IAR in Corrubedo and Muxía indicate the existence of oxidative stress at both sites, although particularly so in the case of Corrubedo. In this survey, GR activity levels were higher at the four sites along the Costa da Morte than at the reference site. Although GR is not always recognised as an antioxidant enzyme, it can be included in this category on the basis of its role in reducing oxidised glutathione (GSSG) and regenerating reduced glutathione (GSH) (Doyotte et al. 1997; Yan et al. 1997; Cheung et al. 2001), which is the most important antioxidant compound involved in ROS detoxification (Winston and Di Giulio 1991). An increase in GR activity levels as a result of exposure to organic pollutants has been demonstrated both in the laboratory (Cheung et al. 2004; Dafre et al. 2004) and in the field (Porte et al. 2001b; Box et al. 2007; Richardson et al. 2008). Thus, the high levels of GR activity at the sampling sites along the Costa da Morte appear to reflect a higher degree of conversion of GSSG to GSH, which would be a defence against ROS toxicity.

With regard to the PAH bioaccumulation, only CAT enzyme activity values in April seem to be related to PAH content of mussels sampled at the same time. CAT degrades H₂O₂ into H₂O and O₂, preventing the production of hydroxyl radicals, and is considered as an important early indicator of oxidative stress, having been signalled as one of the best and earliest antioxidant enzymes to respond to pollutant bioaccumulation (Cossu et al. 1997). CAT induction has been reported in mussels exposed to PAH and PCB (Porte et al. 1991; Richardson et al. 2008; Eertman et al., 1995); to a water-accommodated fraction of crude oil (Cajaraville et al. 1992) or after transplantation to polluted sites (Da Ros et al. 2000; Luca-Abbott et al. 2005). The relation of the CAT enzyme with PAH levels appears to indicate a specific response of this enzyme to the accumulation of hydrocarbons, one which would also seem to afford protection against LPO, as is suggested by the inverse relationship between CAT activity and LPO levels in our study (Tables 3, 5). Pampanin et al. (2005) have also detected a negative correlation between LPO levels (measured as MDA content) and CAT activity in mussels affected by petrochemical pollution.

On the contrary, IAR values and the levels of the antioxidant enzymes GRX and DTD in April are more related to PAH concentrations measured in February 2003 than to the PAH data obtained in 2004. This relationship between antioxidant response in April 2004 and PAH concentrations found 14 months before suggests the presence in the area of compounds capable of generating oxidative stress in zones of maximum exposure to hydrocarbons from the spill. After the Aegean Sea oil spill Albaigés et al. (2000) and Porte et al. (2000a) reported a "delayed" response of the antioxidant enzyme SOD in *M. edulis*, even though petrogenic hydrocarbon concentrations were similar to background levels found before the accident. This may be due to the existence in the environment, and particularly in the sedimentary compartment, of oxidised hydrocarbons formed through chemical and biochemical reactions that were not quantified in this study. Indeed, during the winter following the *Prestige* oil spill (November 2003–January 2004) an increase in PAH concentrations was detected in mussels from the most severely affected areas, probably as a result of storms that may have re-introduced fuel-oil residues in the water column (Viñas et al. 2009).

LPO has been included in this study as a biomarker of the possible harmful effects of ROS on membrane phospholipids, proteins or nucleic acids (Stegeman et al. 1992; Barata et al. 2005). In April, and in spite of the evidence of oxidative stress indicated by high IAR values at Corrubedo, Caión and Muxía, LPO levels were no different from those found at the reference site. The antioxidant defence system thus appears to offer an efficient protection mechanism against reactive chemical species, the induction of antioxidant enzymes being an adaptation to overcome the stress produced by exposure to pollutants (Cossu et al. 1997).

The fact that this study was performed on two clearly differentiated seasons made it possible to observe the existence of higher levels of activity of the CAT, GR and particularly SOD enzymes in spring sample (April) as opposed to the autumm sample (November). It is known that the antioxidant defence system in mussels can be influenced by seasonally fluctuating factors such as temperature, nutrient bioavailability or the reproductive cycle (Sheehan and Power 1999; Orbea et al. 2002; Petrovic et al. 2004; Bocchetti and Regoli 2006). Spring, as compared to autumm, is characterised by a higher level of metabolic activity marked by both the reproductive cycle and the improved environmental temperature and food conditions needed to complete the process of gametogenesis and enable spawning to take place. In this regard, several studies have found higher antioxidant activity and lower levels of LPO products in mussels in spring than in winter (Viarengo et al. 1990, 1991; Sheehan and Power 1999; Romeo et al. 2003; Manduzio et al. 2004; Bocchetti and Regoli 2006), which coincides with what has been observed in this study. It is interesting to note that the antioxidant activities with greatest seasonal variability, SOD and CAT, bore a significant relation to respiration rates ($r_{CAT} = 0.784$, P < 0.01; $r_{SOD} = 0.588$, P < 0.1, data not shown). This would indicate that increased oxygen consumption, and thus an increase in the production of oxyradicals deriving from a higher rate of metabolic activity, is compensated for by an increase in antioxidant defences in April.

In November, higher enzymatic (CAT, GR, DTD and SOD) levels recorded at Caión determined that its IAR was significantly higher than that at Santa María de Oia. This was probably a response of mussels from this site to a higher exposition and bioaccumulation of hydrocarbons. Moreover, it seems to exist a relationship between the antioxidant enzyme DTD and mussel PAH accumulation. DTD belongs to the phase I mixed function oxidase (MFO) system, which is involved in the biotransformation and detoxification of organic compounds, and plays an important role in aquatic toxicology as a modulator of quinone toxicity since it allows a quinoline stable form to be produced with no passage of radicals (Cadenas 1995; Osman et al. 2004). Previous studies have shown a positive correlation between DTD and PAH concentration in M. galloprovincialis tissues (Livingstone et al. 1990; Porte et al. 1991, Solé et al. 1994, 1995).

On the other hand, and contrary to the April findings, LPO levels in November indicate the existence of peroxidative damage in mussels from Punta Insua and Muxía. It should also be taken into account that not only pollutants but also fluctuations in environmental factors such as temperature, salinity, oxygen rate or nutrient availability can influence the pro-oxidant/antioxidant balance (Viarengo et al. 1991; Power and Sheehan 1996; Orbea et al. 2002; Filho et al. 2001; Lau et al. 2004; Manduzio et al. 2004; Verlecar et al. 2008). In fact, in the case of mussels adapted to low or moderate pollution conditions, the above-mentioned seasonal factors can have a greater influence on antioxidant response than pollution itself, as the study by Orbea et al. (2002) in the Bay of Biscay (NE Spain) shows. Thus, a decrease in antioxidant enzyme activity levels in winter may have increased susceptibility to oxidative stress and favoured an increase in LPO in November.

Observed SFG values (70–90 J $g^{-1} h^{-1}$ in April and 50–70 J $g^{-1} h^{-1}$ in November) are considerably higher (maximum differences of between 20 and 30 J $g^{-1} h^{-1}$) than those described by other authors for mussels also kept under standardised laboratory conditions (Widdows

et al. 1995, 2002; Cotou et al. 2002). The standard algal ration used in the determination of SFG in the abovementioned studies is much lower (0.4 mg AFDW 1^{-1}) than that used in the present study (1 mg AFDW 1^{-1}), which would explain the higher SFG values found in the latter. On the other hand, high SFG values, similar to or even higher than those in the present study, have been described by Gardner (2000) or Honkoop et al. (2003), these also being related to a greater availability of food (1–3 mg AFDW 1^{-1}).

The physiological rate with the greatest influence on the determination of SFG is the clearance rate, which determines the ingestion rate (Table 6), SFG therefore being determined by the amount of energy acquired. Numerous studies have demonstrated that the clearance rate is the most sensitive of all physiological rates to the presence of pollutants in the environment (Honkoop et al. 2003 Widdows et al. 1982; Kraak et al. 1997; Toro et al. 2003b). For this reason it has been proposed that the clearance rate alone should be used as a bioindicator of the stress produced by environmental pollution (Donkin et al. 1989; Toro et al. 2003a), given that this parameter is easier to determine than SFG, reducing the length of the experimental period, is sufficiently sensitive and the results have the same ecological significance. Nevertheless, Widdows and Staff (2006) recommend a full evaluation of the energy balance, since determining SFG reduces interpopulation variability, shows a wider range of values and its significance is easier to understand than that of the clearance rate. Finally, the requirements in terms of the time and equipment needed to determine SFG are only slightly greater than those needed to determine the clearance rate, giving the SFG a clear advantage from a cost/ benefit standpoint.

In the present study, no difference was found between food absorption efficiencies at the various sampling sites, since this parameter basically depends on the quantity and quality of food available (the same diet was used for all the sites studied) and is less sensitive to the presence of pollutants (Honkoop et al. 2003). On the other hand, respiration rates are often related to pollution-induced stress in animals. In general, large increases in respiration rates have been described as being associated with the presence of PAHs (Widdows et al. 1995) or TBT (Halldörsson et al. 2005), this producing a decrease in SFG, i.e. the energy left for the animal to grow. The increase in oxygen consumption rates in the presence of hydrocarbons has been related to the increase in metabolic processes induced to neutralise the presence of pollutants (Widdows et al. 1982). However, in the present study the only relationship that has been observed in the case of respiration rates is that associated with seasonality, itself related, as has been mentioned above, to the gametogenic

cycle of these animals. Finally, the respiration energy values observed in this study are similar (close to $10 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) to those published by other authors for the same species, temperature and time of year (Widdows et al. 1982, 1995).

Similarly to what was observed in the case of antioxidant response activity, the results obtained for SFG indicate that its value depends on the time of year when measurements are made, even when temperature and food availability (15°C and 1 mg AFDW l^{-1}) remain the same. SFG values for all the sampling sites fall by somewhat more than 30% in autumn when compared to the values obtained in spring. This fact is closely related to the physiological status of the mussel, which enters a period of reduced activity during the autumn months, meaning that both energy acquisition and consumption rates are lower than in spring, the period when spawning occurs and environmental food availability and temperature conditions improve (Hawkins and Bayne 1984). The slowing down of the food acquisition process (due to a decrease in food availability and quality), and hence metabolic energy consumption, during the autumn and winter months is advantageous for the animal from an energy standpoint, since when clearance and ingestion rates fall the time it takes for food to pass through the digestive system increases, and with it the efficiency of absorption of food that in addition to being scarce is also usually poor in quality (low organic matter content) (Hawkins and Bayne 1984).

Although SFG values significantly differed between Santa María de Oia and Costa da Morte sites in April, they cannot be considered as indicative of an unhealthy status since the greatest difference between sites is scarcely 10%. The classification proposed by Widdows et al. (1995) for SFG values in accordance with the level of pollution (assessment criteria) establishes that SFG values between 15 and 20 J g^{-1} h⁻¹ are equivalent to a healthy status, those between 5 and 15 J g^{-1} h⁻¹ imply a moderate stress on the system, and those between -5 and $5 \text{ J g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ indicate the existence of major stress. The SFG values obtained in this study are higher than those given by Widdows et al. (1995) for the reasons cited above, and the data must therefore be relativised with regard to the maximum value, i.e. an SFG of 75-100% of the maximum value would indicate a healthy status, values in the 25-75% range would imply a moderate stress, and those under 25% would be equivalent to major stress. We can thus conclude that according to this particular biomarker both the Costa da Morte sampling sites (those affected by the oil spill) and the reference station (unaffected by the oil spill) show a healthy status. The lack of a noticeable relation between this biomarker and PAH content serves to reinforce this conclusion.

Conclusions

In spite of the extensive contamination observed along the Galician coast due to the *Prestige* oil spill, 2 years after the accident occurred PAH concentrations in mussel tissues were similar to background levels determined for this area, although their PAH profiles indicated that the oil from the *Prestige* was the main source for these hydrocarbons.

In the April sampling, antioxidant responses seem to be related to the PAH levels recorded 3 months after the accident, probably as a result of the presence in the marine environment of oxidised hydrocarbon compounds formed by the biotransformation of original hydrocarbons released in the accident. In spite of these signs of oxidative stress, no evidence of LPO was found at any of the Costa da Morte sites, probably due to the efficient antioxidant protection offered against ROS by the increase of antioxidant enzymatic activities. In November, higher levels of LPO were found, which appears to bear in relation to the seasonally-related decrease in some of the antioxidant enzymatic activities measured. However, in spite of this evidence of oxidative stress, SFG levels indicate no disturbance at a physiological level since both the mussels from the Costa da Morte sites (affected by the oil spill) and those from the reference site (unaffected by the oil spill) showed a healthy status 17 and 24 months after the accident, according to this biomarker.

Acknowledgments We are grateful to Jessica Bargiela for her technical assistance in the evaluation of PAHs, to Rocío García Muñoz for her help in the physiological determinations and to Bruno Cambeiro and Cristóbal Navarro for collaborating in the gathering of biological material. This study has been funded by the Strategic Action on R&D activities against accidental marine spills, within the framework of the Plan Nacional de I + D+I 2000-2003 (Ref. VEM2003-20068-CO5-03).

References

- Albaigés J, Porte C, Pastor D, Biosca X, Solé M (2000) The integrated use of chemical and biochemical markers for assessing the effects of the *Aegean Sea* oil spill in the Galician coast (NW Spain). Water Stud 8:73–84
- Barata C, Lekumberri I, Vila-Escale 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). Aquat Toxicol 74:3–19
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T, Bellocq J (1998) Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. Mar Poll Bull 36:951–960
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Burgeot T, Michel X, Bellocq J (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. Mar Environ Res 47:415–439

- Bayne BL, Newell RC (1983) Physiological energetics of marine molluscs. In: Salendin ASM, Kilbur KM (eds) The Mollusca, vol 4, pp 407–515
- Bayne BL, Addison RF, Capuzzo JM, Clarke KL, Gray JS, Moore M, Warwick RM (1988) An overview of the GEEP workshop. Mar Ecol Prog Ser 46:235–243
- Beliaeff B, Burgeot T (2002) Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Environ Tox Chem 21:1316–1322
- Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P (1980) Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcenogenesis and toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 77:5216–5220
- Bocchetti R, Regoli F (2006) Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. Chemosphere 65:913–921
- Bocquene G, Chantereau S, Clerendeau C, Beausir E, Menard D, Raffin B, Minier C, Burgeot T, Leszkowicz AP, Narbonne JF (2004) Biological effects of the "Erika" oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). Aquat Living Resour 17:309–316
- Box A, Sureda A, Galgani F, Pons A, Deudero S (2007) Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Comp Biochem Phys C 146:531–539
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. In: Fleischer S, Packer L (eds) Methods in enzymology, vol 52. Academic Press, New York, pp 302–310
- Cadenas E (1995) Antioxidant and prooxidant functions of DTdiaphorase in quinone metabolism. Biochem Pharmacol 49: 140
- Cajaraville MP, Uranga JA, Angulo E (1992) Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels. Quantitative histochemistry of enzymes related to the detoxication metabolism. Comp Biochem Phys 103C:369–377
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, Porte C, Sarasquete C, Viarengo A (2000) The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci Total Environ 247:295–311
- Cajaraville MP, Garmendia L, Orbea A, Werding R, Gómez-Mendikute A, Izagirre U, Soto M, Marigómez I (2006) Signs of recovery of mussels health two years after the *Prestige* oil spill. Mar Environ Res 62:S337–S341
- Carls MG, Babcock MM, Harris PM, Irvine GV, Cusick JA, Rice SD (2001) Persistence of oiling in mussel beds after the *Exxon Valdez* oil spill. Mar Environ Res 51:167–190
- Carro N, Cobas J, Maneiro J (2006) Distribution of aliphatic compounds in bivalve mollusks from Galicia after the *Prestige* oil spill: Spatial and temporal trends. Environ Res 100(3):339–348
- Cheung CCC, Zheng GJ, Li AMY, Richardson BJ, Lam PKS (2001) Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Aquat Toxicol 52:189–203
- Cheung CCC, Zheng GJ, Lam PKS, Richardson BJ (2002) Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. Mar Poll Bull 45:181–191
- Cheung CCC, Siu WHL, Richardson B, Luca-Abbott SB, Lam PKS (2004) Antioxidant responses to benzo[*a*]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Environ Pollut 128:393–403
- Claiborne A (1985) Catalase activity. In: Greenwald RA (ed) Handbook of methods for oxygen. Radical research. CRC Press, Boca Raton, pp 283–284

- Conover RJ (1966) Assimilation of organic matter by zooplankton. Limnol Oceanogr 11:338–345
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P (1997) Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. Ecotox Environ Safe 28:122–131
- Cotou E, Papathanassiou E, Tsangaris C (2002) Assessing the quality of marine coastal environments: comparison of scope for growth and Microtox super (registered) bioassay results of pollution gradient areas in Eastern Mediterranean (Greece). Environ Pollut 119:141–149
- Crowe TP, Smith EL, Donkin P, Barnaby DL, Rowland SJ (2004) Measurements of sublethal effects on individual organisms indicate community-level impacts of pollution. J Appl Ecol 41:114–123
- Da Ros L, Nasci C, Marigómez I, Soto M (2000) Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy. Mar Environ Res 50:417–423
- Dafre AL, Medeiros ID, Muller C, Ventura EC, Dias Bainy AC (2004) Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. Chem-Bio Interact 149:97–105
- Dagnino A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A (2007) Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. Biomarkers 12:155–172
- Devier MH, Augagneur S, Budzinski H, Le Menach K, Mora P, Narbonne JF, Garrigues P (2005) One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. J Environ Monitor 7:224–240
- Donkin P, Widdows J, Evans SV, Worall CM, Carr M (1989) Quantitative structure-activity relationships for the effect of hydrophobic organic chemicals on rate of feeding by mussels (*Mytilus edulis*). Aquat Toxicol 14:277–294
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P (1997) Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat Toxicol 39:93–110
- Eertman RHM, Groenink CLF, Sandee B, Hummel H, Smaal C (1995) Response of the blue mussel *Mytilus edulis* L. following exposure to PAHs or contaminated sediment. Mar Environ Res 39:169–173
- Ferreira AM, Micaelo C, Vale C (2003) Are coastal resources of NW Portugal fingerprinting hydrocarbons released from the *Prestige* accident. Cienc Mar 29:109–114
- Filho W, Tribess T, Gaspari C, Claudio FD, Torres MA, Magalhaes ARM (2001) Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203:149–158
- Franco MA, Viñas L, Soriano JA, De Armas D, González JJ, Beiras R, Salas N, Bayona JM, Albaigés J (2006) Spatial distribution and ecotoxicity of petroleum hydrocarbons in sediments from the Galicia continental shelf (NW Spain) after the *Prestige* oil spill. Mar Poll Bull 53:260–271
- Gardner JPA (2000) Where are the mussels on Cook Strait (New Zealand) shores? Low seston quality as a possible factor limiting multi-species distributions? Mar Ecol Prog Ser 194:123–132
- González JJ, Viñas L, Franco MA, Fumega J, Soriano JA, Grueiro G, Muniategui S, López-Mahia P, Prada D, Bayona JM, Alzaga R, Albaigés J (2006) Spatial and temporal distribution of dissolved/ dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the *Prestige* oil spill. Mar Poll Bull 53:250–259

Integrated assessment of water quality of the Costa da Morte

- Granby K, Spliid NH (1995) Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indexes. Mar Poll Bull 30:74–82
- Halldörsson HP, Svavarsson J, Granmo A (2005) The effect of pollution on scope for growth of the mussel (*Mytilus edulis* L.) in Iceland. Mar Environ Res 59:47–64
- Hawkins AJS, Bayne BL (1984) Seasonal variation in the balance between physiological mechanisms of feeding and digestion in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mollusca). Mar Biol 82:233–240
- Honkoop PJC, Bayne BL, Underwood AJ, Svensson S (2003) Appropriate experimental design for transplanting mussels (*Mytilus* sp.) in analyses of environmental stress: an example in Sydney Harbour (Australia). J Exp Mar Biol Ecol 297:253– 268
- Kraak MHS, Ainscough C, Fernandez A, Van Vlaardingen PLA, De Voogt P, Admiraal WA (1997) Short-term and chronic exposure of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to acridine: effects and metabolism. Aquat Toxicol 37:9–20
- Lam PKS, Gray JS (2003) The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar Poll Bull 46:182–186
- Lau PS, Wong HL, Garrigues P (2004) Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. Cont Shelf Res 24:1969–1987
- Lemaire P, Livingstone DR (1993) Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotics interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platlchthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*. Trends Comp Biochem Physiol 1:1119–1150
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME, Pascariello MF, Marinosci L, Schettino T (2003) Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus* galloprovincialis and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Mar Poll Bull 46:324–330
- Livingstone DR, Garcia Martinez P, Michel X, Narbonne JF, O'Hara S, Ribera D, Winston G (1990) Oxyradical production as pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other olluscs. Funct Ecol 4:415– 424
- Livingstone DR, Lips F, Garcia MP, Pipe RK (1992) Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Mar Biol 112:265–276
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275
- Luca-Abbott SB, Richardson BJ, McClellan KE, Zheng GJ, Martin M, Lam PKS (2005) Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters. Mar Poll Bull 51:694–707
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, Leboulenger F, Rocher W (2004) Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat Toxicol 70:83–93
- Manduzio H, Rocher B, Durand F, Galap C, Leboulenger F (2005) The point about oxidative stress in molluscs. Invertebr Surv J 2:91–104
- Marigómez I, Soto M, Cancio I, Orbea A, Garmendia L, Cajaraville MP (2006) Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the *Prestige* oil spill (Monitoring Campaign 2003). Mar Poll Bull 53:287–304
- Martínez-Gómez C, Campillo J, Benedicto J, Fernández B, Valdés J, García I, Sánchez F (2006) Monitoring biomarkers in fish (*Lepidorhombus boscii* and *Callionymus lyra*) from the northern

Iberian shelf after the *Prestige* oil spill. Mar Poll Bull 53:305–314

- Martínez-Gómez C, Fernández B, Valdés J, Campillo JA, Benedicto J, Sánchez F, Vethaak AD (2009) Evaluation of three-year monitoring with biomarkers in fish following the *Prestige* oil spill (N Spain). Chemosphere 74:613–620
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244:6049–6055
- Nesto N, Bertoldo M, Nasci C, Da Ros L (2004) Spatial and temporal variation of biomarkers in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Lagoon of Venice, Italy. Mar Environ Res 58:287–291
- Nieto O, Aboigor J, Buján R, N'Diaye M, Graña J, Saco-Álvarez L, Franco A, Soriano JA, Beiras R (2006) Temporal variation in the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) off the Galician Coast after the '*Prestige*' oil spill. Mar Ecol Prog Ser 328:41–49
- Orbea A, Cajaraville MP (2006) Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four Basque Estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. Environ Toxicol Chem 25:1616–1626
- Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Sole M, Porte C, Cajaraville MP (2002) Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). Aquat Toxicol 58:75–98
- Orbea A, Garmendia L, Marigómez I, Cajaraville MP (2006) Effects of the '*Prestige*' oil spill on cellular biomarkers in intertidal mussels: results of the first year of studies. Mar Ecol Prog Ser 306:177–189
- Osman AM, Rotteveel S, Den Besten PJ, van Noort PCM (2004) In vivo exposure of *Dreissena polymorpha* mussels to the quinones menadione and lawsone: Menadione is more toxic to mussels than lawsone. J Appl Toxicol 24:135–141
- Pampanin DM, Camus L, Gomiero A, Marangon I, Volpato E, Nasci C (2005) Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus* galloprovincialis) in the Venice Lagoon (Italy). Mar Poll Bull 50:1548–1557
- Petrovic S, Semencic L, Ozretic B, Ozretic M (2004) Seasonal variations of physiological and cellular biomarkers and their use in the biomonitoring of north Adriatic coastal waters (Croatia). Mar Poll Bull 49:713–720
- Porte C, Solé M, Albaigés J, Livingstone DR (1991) Responses of mixed-function oxygenase and antioxidase enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. Comp Biochem Physiol Part C 100:183–186
- Porte C, Biosca X, Sole M, Albaiges J (2000a) The Aegean Sea oil spill in the Galicia coast (NW Spain). III. The assessment of long term sublethal effects on mussels. Biomarkers 5:436– 446
- Porte C, Biosca X, Pastor D, Sole M, Albaigés J (2000b) The Aegean Sea oil spill. 2. Temporal study of the hydrocarbons accumulation in bivalves. Environ Sci Technol 34:5067–5075
- Porte C, Biosca X, Sole M, Albaiges J (2001a) The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). Environ Pollut 112:261–268
- Porte C, Solé M, Borghi V, Martínez M, Chamorro M, Torreblanca A, Ortíz M, Orbea A, Soto M, Cajaraville MP (2001b) Chemical, biochemical and cellular responses in the digestive gland of the mussel *Mytillus galloprovincialis* from the Spanish Mediterranean coast. Biomarkers 6:335–350
- Power P, Sheehan D (1996) Seasonal variation in the antioxidant defence system of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis.* Comp Biochem Phys 114C:99–103

- 750
- QUASIMEME II (2003) QUASIMEME laboratory performance studies. Round 34. BT-4 Exercise 588. Polyaromatic hydrocarbons in biota
- QUASIMEME II (2004) QUASIMEME laboratory performance studies. Round 36. BT-4. Exercise 619. Polyaromatic hydrocarbons in biota
- Ramos-Martínez JI, Rodriguez-Bartolomé T, Vazquez-Pernas R (1983) Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis* L. Comp Biochem Phys B 75:689–692
- Regoli F (1998) Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Arch Environ Con Tox 34:48–63
- 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
- Richardson BJ, Mak E, Luca-Abbott SB, Martin M, McClellan K, Lam PKS (2008) Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): do mussels "integrate" biomarker responses? Mar Poll Bull 57:503–514
- Romeo M, Hoarau P, Garello G, Gnassia-Barelli M, Girard JP (2003) Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. Environ Pollut 122:369–378
- Sheehan D, Power A (1999) Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp Biochem Phys C 123:193–199
- Solé M, Porte C, Albaigés J (1994) Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. Aquat Toxicol 30:271–283
- Solé M, Porte C, Albaigés J (1995) The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. Sci Total Environ 159:147–153
- Solé M, Porte C, Biosca X, Mitchelmore CL, Chipman JK, Livingstone DR, Albaigés J (1996) Effects of the Aegean Sea oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis* L.). Comp Biochem Phys C 113:257–265
- Solorzano L (1969) Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnol Oceanogr 14:799–801
- Soriano JA, Viñas L, Franco MA, González JJ, Ortiz L, Bayona JM, Albaigés J (2006) Spatial and temporal trends of petroleum hydrocarbons in wild mussels from the Galician coast (NW Spain) affected by the *Prestige* oil spill. Sci Total Environ 370:80–90
- Stegeman JJ, Brouwer M, Richard TDG, Förlin L, Fowler BA, Sanders BM, van Veld PA (1992) Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Bergman HL (eds) Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Chelsea, pp 235–335
- Toro B, Navarro JM, Palma-Fleming H (2003a) Use of clearance rate in *Choromytilus chorus* (Bivalvia : Mytilidae) as a nondestructive biomarker of aquatic pollution. Rev Chil Hist Nat 76:267–274
- Toro B, Navarro JM, Palma-Fleming H (2003b) Relationship between bioenergetics responses and organic pollutants in the giant

mussel, *Choromytilus chorus* (Mollusca : Mytilidae). Aquat Toxicol 63:257–269

- Torres MA, Testa CP, Gaspari C, Masutti MB, Panitz CMN, Curi-Pedrosa R, de Almeida EA, Di Mascio P, Wilhelm D (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. Mar Poll Bull 44:923–932
- Tronczynski J, Munschy C, Héas-Moisan K, Guiot N, Truquet I, Olivier N, Men S, Furaut A (2004) Contamination of the Bay of Biscay by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) following the T/V "Erika" oil spill. Aquat Living Resour 17:243–259
- Tsangaris C, Papathanasiou E, Cotou E (2007) Assessment of the impact of heavy metal pollution from a ferro-nickel smelting plant using biomarkers. Ecotoxicol Environ Safe 66:232–243
- Verlecar XN, Jena KB, Chainy GBN (2008) Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. Estuar Coast Shelf S 76:745–752
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Poli G, Moore MN, Orunesu M (1990) Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. Comp Biochem Phys C 97:37–42
- Viarengo A, Canesi L, Pertica M, Livingstone DR (1991) Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. Comp Biochem Phys C 100:187–190
- Viñas L (2002) Evaluación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en el entorno marino gallego. Doctoral Thesis. Universidad de Vigo
- Viñas L, Franco MA, Soriano JA, González JJ, Ortíz L, Bayona JM, Albaigés J (2009) Accumulation trends of petroleum hydrocarbons in commercial shellfish from the Galician coast (NW Spain) affected by the *Prestige* oil spill. Chemosphere 75:534–541
- Widdows J, Donkin P (1992) Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling E (ed) The mussel *Mytilus*: Ecology, physiology, genetics and culture. Elsevier, Amsterdam, pp 383–424
- Widdows J, Johnson D (1988) Physiological energetics of *Mytilus* edulis: scope for growth. Mar Ecol Prog Ser 46:113–121
- Widdows J, Staff F (2006) Biological effects of contaminants: Measurement of scope for growth in mussels. ICES Tech Mar Environ Sci no. 40, pp 30
- Widdows J, Bakke T, Bayne BL, Donkin P, Livingston DR, Lowe DM, Moore MN, Evans SV, Moore SL (1982) Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water-accommodated fraction of North Sea Oil. Mar Biol 67:15–31
- Widdows J, Donkin P, Brinsley MD, Evans SV, Salkeld PN, Franklin A, Law RJ, Waldock MJ (1995) Scope for growth and contaminant levels in North Sea mussels *Mytilus edulis*. Mar Ecol Prog Ser 127:131–148
- Widdows J, Nasci C, Fossato VU (1997) Effects of pollution on the scope for growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon, Italy. Mar Environ Res 43:69–79
- Widdows J, Donkin P, Staff FJ, Matthiessen P, Law RJ, Allen YT, Thain JE, Allchin CR, Jones BR (2002) Measurement of stress effects (scope for growth) and contaminant levels in mussels (*Mytilus edulis*) collected from the Irish Sea. Mar Environ Res 53:327–356
- Winston GW, Di Giulio RT (1991) Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat Toxicol 19:137–161
- Yan T, Teo LH, Sin YM (1997) Effects of mercury and lead on tissue glutathione of the green mussel, *Perna viridis* L. B Environ Contam Tox 58:845–850
RECAPITULACIÓN:

En este Capítulo se ha investigado la calidad ambiental y el estado de salud de mejillones procedentes de lugares afectados por el vertido del buque petrólero *Prestige* dos años después del accidente. Para ello se determinaron los niveles de HAPs en tejidos blandos, diversas respuestas bioquímicas en branquias (actividades antioxidantes catalasa- CAT, glutatión reductasa- GR, glutatión peroxidasa- GP, superóxido dismutasa- SOD y DT-diaforasa- DTD, y peroxidación lipídica- LPO) y determinaciones fisiológicas (esfuerzo para el crecimiento- *Scope For Growth*-SFG) en mejillón silvestre (*Mytilus galloprovincialis*) procedente de cuatro lugares de la Costa da Morte (Corrubedo, Punta Ínsua, Muxía y Caión) y de un lugar de referencia (Santa María de Oia), no impactado por el accidente. La respuesta de los distintos parámetros antioxidantes en branquias se ha simplificado mediante el desarrollo de un índice denominado Respuesta Antioxidante Integrada (RAI).

En abril de 2004 los niveles de HAPs en mejillón de las cuatro localizaciones de la Costa da Morte fueron ligeramente superiores a los obtenidos antes del accidente (noviembre de 2002). Estos niveles de HAPs continuaron decreciendo de abril a noviembre, momento en el que se observaron concentraciones de HAPs similares a las encontradas en zonas no impactadas y a los niveles basales previos al accidente. Este corto periodo de recuperación tras el accidente, entre uno y dos años, parece estar relacionado con las especiales condiciones ambientales, geográficas y dinámicas de esta zona costera, y con las características del vertido, que pudieron acelerar los procesos de disolución, degradación y eliminación de hidrocarburos del medio marino y de mejillón. De modo similar a lo ocurrido tras el vertido (febrero de 2003) la predominancia de criseno, y en menor grado de benzo[b]fluorantreno y benzo[e]pireno, en los perfiles de acumulación de HAPs en mejillón de la Costa da Morte tanto en abril y noviembre de 2004 indica que el fuel del *Prestige* fue el origen principal de estos hidrocarburos.

Los resultados de este estudio muestran un comportamiento coordinado de las enzimas antioxidantes estudiadas tanto en abril como en noviembre. Esto permitió la aplicación de un índice capaz de reflejar esta Respuesta Antioxidante Integrada – RAI -. El RAI de los mejillones de la Costa da Morte en abril fue mayor que el del lugar de referencia, siendo esto especialmente notable en Corrubedo. En abril se observaron elevados niveles de GR en los mejillones de los cuatro lugares de la Costa da Morte, y la enzima CAT presentó una respuesta relacionada con la acumulación de HAPs. El elevado RAI observado en los mejillones de la costa da Morte en abril parece reflejar una protección frente a la aparición de daño oxidativo, ya que no se observaron evidencias de peroxidación lipídica (LPO) en ninguna de estas poblaciones de mejillón. Por otro lado, los niveles de las enzimas GR y DTD en abril se relacionaron con la acumulación de HAPs observada en febrero de 2003, lo que sugirió la presencia en el área, posiblemente en el sedimento, de compuestos

procedentes del vertido capaces de generar estrés oxidativo, como por ejemplo productos no analizados derivados de la oxidación de hidrocarburos. Los mayores niveles de algunas enzimas antioxidantes (SOD y CAT) observados en abril en comparación con noviembre se relacionaron con el incremento de radicales de oxígeno debido a una mayor tasa fisiológica (respiración) en primavera.

En noviembre se observó un mayor RAI en los mejillones de Caión, aunque no se encontraron indicios de daño peroxidativo. Lo contrario sucedió en mejillones de Punta Ínsua y Muxía, donde se observaron elevados niveles de LPO a pesar de que los HAPs acumulados en estos mejillones fueron inferiores a los de abril. Este comportamiento puede estar ocasionado por la presencia en estas áreas de contaminantes no analizados y/o a la mayor susceptibilidad al estrés oxidativo en invierno que en primavera debido a los menores niveles de actividad de las enzimas antioxidantes, y a la influencia de factores ambientales.

Los resultados de este Capítulo no mostraron diferencias en la eficiencia de absorción de alimento entre las distintas poblaciones de mejillón estudiadas. Por otro lado, las pequeñas diferencias observadas en los ratios de respiración y SFG, y los menores niveles de SFG observados en noviembre en comparación con abril parecen estar más relacionadas con la variación estacional de estos parámetros que con la acumulación de HAPs. La mayor actividad fisiológica y, por lo tanto, adquisición y consumo de energía del mejillón en primavera en comparación con el otoño se relacionan con las condiciones de temperatura, biodisponibilidad de alimento y ciclo reproductivo (desove) características de este periodo. Aunque se observaron diferencias entre los SFG de los mejillones de la Costa da Morte y los del lugar de referencia, estas diferencias alcanzaron escasamente el 10%, y los niveles observados en ambos periodos indicaron un buen estado de salud de estos organismos.

CAPÍTULO VII

Conclusiones generales

CAPÍTULOS II, III Y IV:

De forma global, el estudio de diferentes biomarcadores en mejillón de la costa mediterránea española ha contribuido al conocimiento del comportamiento de estos mecanismos de defensa y toxicidad. Las principales conclusiones obtenidas en los Capítulos II, III y IV de esta Memoria son:

- La respuesta de los biomarcadores estudiados en branquias y glándula digestiva de mejillón presenta una especificidad tisular, que parece estar relacionada con las diferencias estructurales, funcionales y la composición de cada tejido.
- 2. Mejillones de zonas con mayor biodisponibilidad de metales no muestran evidencias de daño oxidativo en sus tejidos, lo que se relaciona con el papel protector de las enzimas dependientes del glutatión (GPs, GR y GST) y sus altos niveles de actividad en estas poblaciones de mejillón.
- 3. La relación detectada entre los niveles de actividad de las enzimas GPs, GR y DTD en branquias y la temperatura del agua indica la capacidad de este factor ambiental para influir sobre estas respuestas bioquímicas e incrementar la producción de EROs.
- 4. En branquias los niveles de las enzimas SOD y CAT se relacionan fundamentalmente con la acumulación de contaminantes orgánicos, mientras que las MT y la DTD no guardan relación con la acumulación de contaminantes, y sus niveles parecen estar influenciados por parámetros ambientales como temperatura y salinidad.
- 5. El daño oxidativo observado en glándula digestiva de mejillones que acumularon elevados niveles de contaminantes orgánicos y arsénico está relacionado con la toxicidad específica de estos compuestos en glándula digestiva, el desequilibrio en los sistemas de fase I y II de detoxificación, y bajos niveles de enzimas antioxidantes.
- 6. Los mayores niveles de MT observados en la glándula digestiva en comparación con las branquias se relacionan con la acumulación específica y homeostasis de metales esenciales en este tejido. Además, elevados niveles de MT y CAT en glándula digestiva parecen tener un papel protector frente a la toxicidad del Cd.
- 7. En general, de estos Capítulos se concluye que la respuesta de los biomarcadores en branquias y glándula digestiva integra los efectos biológicos e impacto de la contaminación sobre el mejillón, reflejando con bastante precisión la acumulación de los contaminantes prioritarios analizados. Esto se debe al hecho de que la respuesta integrada en branquias refleja fundamentalmente los efectos biológicos de la exposición a metales pesados,

mientras que la respuesta en glándula digestiva se relaciona fundamentalmente con la exposición y toxicidad de los contaminantes orgánicos.

CAPÍTULO V:

- Las mayores frecuencias de micronúcleos (MN) y puentes nucleares (PN) en la costa mediterránea española se encontraron en los mejillones que más metales pesados acumularon en sus tejidos. Los elevados niveles de algunas enzimas (SOD, SeGP, GR, nonSeGP, GST) observados en estos organismos sugieren que esta genotoxicidad está relacionada con el estrés oxidativo originado por la acumulación de metales.
- 2. Los MNs y PNs parecen ser eventos genotóxicos relacionados, en cuya generación influye la temperatura del agua. En este capítulo se han propuesto niveles basales de MNs y PNs en branquias de *M. galloprovincialis* para el área de estudio y el rango de temperaturas observado, útiles como valores de referencia.
- 3. Se observaron elevadas frecuencias de células binucleadas (BN) en mejillones que acumularon elevados niveles de compuestos orgánicos (PCBs, DDTs y algunos HAPs) y Cu, lo que apoya el uso de este tipo anormalidad nuclear como indicador de citotoxicidad ligada a estos contaminantes químicos.
- 4. Las bajas frecuencias de MNs y PNs detectadas en mejillones sometidos a una contaminación orgánica crónica se han relacionado con una mejor adaptación, resistencia y mecanismos de reparación del ADN en organismos que sobreviven en estos ambientes. Por otro lado, los elevados niveles de MNs y PNs observados en mejillones con bajos niveles de los contaminantes analizados en sus tejidos pueden tener su origen en otros compuestos con capacidad genotóxica presentes en el medio marino.

CAPITULO VI:

1. El estudio realizado en la Costa da Morte muestra que los niveles de HAPs en mejillón 17 meses después del accidente del *Prestige* (abril 2004) eran ligeramente superiores a los observados antes del accidente. Estos niveles de HAPs siguieron decreciendo, observándose en noviembre de 2004 concentraciones similares a las anteriores al accidente. Este corto periodo de recuperación se relaciona con las características del vertido y las condiciones ambientales y geográficas de esta zona costera, que favorecen la eliminación de hidrocarburos.

- La predominancia de criseno, y en menor grado de benzo[b]fluorantreno y benzo[e]pireno, en los perfiles de acumulación de HAPs en mejillón de la Costa da Morte en abril y noviembre de 2004 indica que el *Prestige* fue el origen principal de estos hidrocarburos.
- 3. En este estudio se ha desarrollado y aplicado un índice que integra los niveles de las diferentes enzimas estudiadas, denominado Respuesta Antioxidante Integrada –RAI-.
- 4. Elevados niveles de enzimas antioxidantes (especialmente GR) observados en los mejillones de la Costa da Morte en abril parecen evitar el daño oxidativo en branquias. El patrón de respuesta de algunas enzimas en abril fue similar a la distribución de HAPs observada tras el accidente (febrero de 2003), lo que sugiere la presencia en estas áreas de compuestos procedentes del vertido capaces de generar estrés oxidativo.
- 5. Se observaron mayores niveles de algunas enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GR), ratio de respiración y esfuerzo para el crecimiento (SFG) en abril que en noviembre, lo que refleja una mayor actividad fisiológica, generación de radicales libres, y mecanismos de defensa antioxidante en primavera.
- 6. Los indicios de daño oxidativo observados en algunos mejillones de la Costa da Morte en noviembre pudieron deberse a la presencia de contaminantes no analizados y/o a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo debido a la menor actividad antioxidante detectada en este periodo.
- Los niveles de SFG observados en los mejillones de la Costa da Morte en abril y noviembre indican un buen estado fisiológico de estos organismos.

En general, los resultados obtenidos en los trabajos que integran esta Tesis apoyan el uso de una batería de biomarcadores en mejillón en programas de gestión del medio marino. Estos biomarcadores pueden ser, de forma integrada a la monitorización química, una herramienta útil en el diagnóstico de los efectos e impacto de la contaminación. La influencia de parámetros ambientales como temperatura y salinidad sobre estos biomarcadores ha de ser tenida en cuenta para una correcta aplicación e interpretación de los mismos.

APÉNDICE I

Metodología Analítica

I.I. Obtención de Fracciones Subcelulares

Para la obtención de las fracciones subcelulares correspondientes al citosol y microsomas de branquias y glándula digestiva de mejillón se ha utilizado una modificación del método de centrifugación diferencial descrito en Stegeman (1985). Las glándulas digestivas y branquias se homogeneizaron en tampón fosfato 100 mM pH=7,6 con KCl 0,15 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, y leupeptina 3 µg/mL en una relación peso:volumen 1:4 para la glándula digestiva, y 1:2 para las branquias. El homogenado resultante se centrifugó a 600 x g durante 15 minutos a 2 °C, y el sobrenadante obtenido, una vez eliminada la grasa, se pasó a otro tubo de ensayo y se centrifugó a 13.000 x g durante 15 minutos a 2 °C. El sobrenadante resultante de esta segunda centrifugación se transfirió a un nuevo tubo de ensayo, donde se centrifugó a 39.000 x g durante 90 minutos a 2 °C. Tras esta tercera centrifugación el sobrenadante, correspondiente a la fracción citosólica, se almacenó en tubos criogénicos y congeló en nitrógeno líquido. El precipitado, correspondiente a la fracción microsomal, se resuspendió manualmente con una varilla de vidrio en Tris-HCl 50 mM pH=7,6, glicerol 20%, EDTA 1 mM, y DTT 1 mM en un una relación peso:volumen 1:1 con respecto al peso inicial de tejido. La fracción microsomal se almacenó en tubos criogénicos y congeló en nitrógeno líquido.

I.II Benzo[a]Pireno Hidroxilasa

La actividad benzo[a]pireno hidroxilasa (BPH) se ensayó en la fracción microsomal de la glándula digestiva siguiendo el método descrito en Dehnen *et al.* (1973). 900 µl de medio de reacción que contenían Tris-HCl pH 7,5 y NADPH 0,74 mM se incubaron durante 2-3 minutos a 25 °C y, tras añadir 100 µl de fracción microsomal, se incubó de nuevo durante 1 minuto. La reacción enzimática se inició añadiendo 25 µl de benzo[a]pireno (BaP) 2,4 mM disuelto en dimetilformamida. Para cada una de las muestras analizadas se ensayó un blanco a tiempo 0 en el que no se añadió el BaP en el medio de reacción. Tras 10 minutos de reacción en un baño a 25 °C, en agitación continua, y bajo luz amarilla, la reacción se detuvo añadiendo 1 ml de acetona fría a las muestras y blancos. Los tubos de ensayo se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Un alícuota de 1 ml de sobrenadante de cada muestra se mezcló con 2,3 ml de trietilamina al 8% y se centrifugó a 3.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la fluorescencia de los sobrenadantes a una longitud de onda de excitación de 467 nm y una longitud de onda de emisión de 525 nm. La actividad BPH se estimó por la diferencia entre la fluorescencia obtenida en cada muestra a tiempo 0 y a tiempo 10 minutos, utilizando una recta patrón de 3-hidroxi-BaP (pirenol: 1-10 pmol ml⁻¹) disuelto en trietilamina al 8%.

La actividad BPH se expresó en función del contenido en citocromo P450. Para determinar el contenido en citocromo P450 se aplicó el método descrito por Omura y Sato (1964) en las fracciones microsomales de glándula digestiva inmediatamente después de su obtención. Este método se basa en la capacidad del monóxido de carbono para coordinarse con la monooxigenasa citocromo P450 reducida y formar un complejo que absorbe a 450 nm de longitud de onda. Para cada muestra se prepararon 1,5 ml de medio de reacción compuestos por 1,4 ml de tampón fosfato 100 mM pH= 7,4 y 0,1 ml de fracción microsomal. Este medio de reacción se dividió en dos cubetas, una cubeta "referencia" y una cubeta "muestra", y se añadieron unos granos de ditionito sódico en cada una de ellas. A continuación se burbujeó monóxido de carbono (hasta saturación) en la cubeta "muestra", y se escaneó el espectro entre 450 y 490 nm durante unos minutos a temperatura ambiente para establecer una línea base. El contenido en citocromo P450 se estimó como la diferencia entre la absorbancia del pico máximo obtenido a 450 nm de longitud de onda en la cubeta "muestra" y la línea base, usando el coeficiente de extinción molar del compuesto citocromo P450 conjugado.

La actividad BPH se expresó en picomoles de BaP degradados por minuto y por nmol de citocromo P450 aplicando la siguiente fórmula:

BPH (pmol min⁻¹ nmol citocromo P450⁻¹) =

$$\frac{\text{BPH x F1 x 3,3 x CeitP450}}{10 \text{ min x F2 x (}\lambda \text{max450 - }\lambda \text{línea base) x 10}^{3}}$$

Donde:

BPH (pmoles ml^{-1}): Actividad BPH cuantificada a partir de la diferencia entre la fluorescencia obtenida a tiempo 10 y 0 minutos utilizando la recta patrón de pirenol.

F1: Factor de dilución en el medio de reacción de la actividad BPH (1000/100)

3,3: Factor de dilución al añadir la trietilamina al 8%

EcitP450: Coeficiente de extinción molar del citocromo P450 conjugado (91 mM⁻¹cm⁻¹).

 $(\lambda max450 - \lambda base)$: Contenido en citocromo P450 cuantificado a partir de la diferencia entre la absorbancia máxima del pico a 450 nm y la línea base.

F2: Factor de dilución de la muestra en el medio de reacción del citocromo P450 (1500/100)

10³: Factor de conversión de pmol a nmol para el citocromo P450

I.III. DT-Diaforasa

La enzima DT-diaforasa (DTD) se inhibe en presencia de dicumarol (3,3'-metilen-bis(4hidroxi-cumarina)), y se puede medir como la parte de la actividad 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) reductasa inhibida en presencia de dicumarol (Benson *et al.* 1980):

Para cada muestra se prepararon dos medios de reacción de 700 μ l que contenían Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NAD(P)H 0,3 mM, y DCPIP 0,04mM. A un medio de reacción se añadieron 25 μ l de dicumarol 3 mM disuelto en NaOH 0,15% (C_{final} = 0.1 mM), y al otro medio de reacción se añadieron 25 μ l de NaOH 0,15%. La reacción enzimática se inició añadiendo en los dos medios de reacción 25 μ l de muestra convenientemente diluida (F1) en Tris-HCl 50 mM pH 7,6. Se siguió el descenso en la absorbancia a 600 nm debido a la oxidación del DCPIP durante dos minutos. La

actividad DT-diaforasa se obtuvo de la diferencia entre las pendientes obtenidas en los ensayos realizados para cada muestra con y sin dicumarol en el medio de reacción, y se expresó en nmoles de DCPIP reducidos por minuto y por mg proteína citosólica aplicando la siguiente fórmula:

DTD (nmol min⁻¹ mg⁻¹) = $\frac{\text{DCPIP x F1 x F2 x1000}}{\text{C x [proteína]}}$

Donde:

DCPIP (Δ pendiente ml⁻¹ min⁻¹): Actividad DT-diaforasa calculada como la diferencia entre las pendientes de las rectas obtenidas en muestras ensayadas sin y con dicumarol.

F1: Factor de dilución inicial de la muestra

F2: Factor de dilución de la muestra en el medio de ensayo (750/25)

C: coefficiente de extinción molar del DCPIP oxidado a 600 nm $(21 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1})$

[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.IV. Glutatión S-Transferasa

La actividad glutatión S-transferasa (GST) se cuantificó según el método descrito en Habig *et al.* (1974) siguiendo la formación del compuesto conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutation a partir de CDNB (1-cloro-2,4dinitrobenceno):

 $\frac{GST}{CDNB + GSH \rightarrow \rightarrow \rightarrow 2,4-dinitrofenil-S-glutatión}$

Para cada muestra se prepararon 700 μ l de medio de reacción que contenían tampón fosfato 100 mM pH= 6,5, EDTA 1 mM, GSH 1 mM, y CDNB 1 mM. La reacción se inició añadiendo 25 μ l de muestra convenientemente diluida (F1) en tampón fosfato 100 mM pH 6,5, y se siguió el aumento de la absorbancia a 340 nm durante 2 minutos. A la pendiente obtenida para cada muestra se restó la pendiente obtenida en ensayos sin muestra (blanco). La actividad GST se calculó a partir de la diferencia entre la pendiente de cada muestra y la pendiente del blanco y se expresó en nmoles de GSH conjugados por minuto y por miligramo de proteína citosólica, aplicando la siguiente fórmula:

GST (nmol min⁻¹ mg⁻¹) = $\frac{\text{GST x } F1 \text{ x } F2 \text{ x } 1000}{\text{C x [proteína]}}$

Donde:

GST (Δ pend ml⁻¹ min⁻¹): Actividad GST calculada a partir de la diferencia entre las pendientes de las rectas obtenidas en medio de reacción con muestra y el blanco.

F1: Factor de dilución previo de la muestra

F2: Factor de dilución de la muestra en el medio de reacción (725/25)

€: coeficiente de extinción molar del 2,4-dinitrofenil-S-glutation a 340 nm (9,6 mM⁻¹ cm⁻¹)

[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.V. Metalotioneínas

El contenido en metalotioneinas (MT) en glándula digestiva y branquias de mejillón se determinó siguiendo el método espectrofotométrico descrito en Viarengo *et al.* (1997) y UNEP/RAMOGE (1999). Las muestras se homogeneizaron en una relación peso:volúmen 1:3 en Tris-HCl 50 mM pH= 8,9, sacarosa 0,5 M, β -mercaptoetanol 0,01 %, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,5 mM, y leupeptina 0,006 mM. El homogenado se centrifugó a 30.000 x g durante 20 minutos a 2 °C y el sobrenandante se congeló en nitrogeno líquido.

A 1 ml de muestra se añadieron 1,05 ml de etanol frío (-20° C) y 80 µl de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos a 2 °C. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo de ensayo limpio, y se añadieron 40 µl de HCl 37%, 10µl de una disolución de RNA (SIGMA R 7250, 1mg/10µl), y 3 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C). La mezcla se agitó y almacenó a -20 °C durante 1 hora. La fracción de MT parcialmente purificada obtenida se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos a 2 °C, y una vez descartado el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol/cloroformo/tampón (Tris-HCl 50 mM pH= 8,9 con sacarosa 0,5 M) (87:1:12) frío (-20 °C). Se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos a 2 °C, y el sobrenadante se descartó. El precipitado obtenido se secó bajo una corriente de nitrógeno gaseoso hasta quedar blanco y agrietado, y se resuspendió manualmente con una varilla de cristal en 150 µl de NaCl 0,25 M y 150 µl de HCl 1 N/EDTA 4 mM. La concentración de MT se calculó a través de la cuantificación del tinitrobenzoato (TNB), compuesto de color amarillo con máxima absorbancia a 412 nm, presente en cada muestra. Para ello se utilizó el método de Ellman añadiendo 4,2 mL de solución DTNB (SIGMA D 8130: 7,14 mg DTNB en 42 mL de tampón fosfato 0,2 M pH 8,0 y NaCl 2 M) a las muestras y a estándares de glutatión (GSH: SIGMA G 4521). Tras agitar la mezcla y dejar reposar durante 5 minutos, los tubos se centrifugaron a 4.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, y la absorbancia de los sobrenadantes se midió a una longitud de onda de 412 nm. La concentración de MT se expresó en µgramos de MT por gramo de tejido aplicando la siguiente fórmula:

$$\mathbf{MT} \ (\mu g \ g^{-1}) = \frac{-[SH] \ x \ 8.600 \ x \ 4.5 \ x \ 3}{21 \ x \ 1000}$$

Donde:

-[SH]: Concentración de GSH [mg ml⁻¹], equivalente a la concentración de sulfhidrilo de la muestra, obtenida al transformar la absorbancia utilizando la recta patrón de GSH.

8.600: peso molecular de las MT de moluscos

- 4,5: volumen final añadido de DTNB
- 3: factor de homogeneización inicial del tejido
- 21: residuos de cisteína presentes en las MT de moluscos

I.VI. Superóxido Dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó siguiendo el método descrito en McCord y Fridovich (1969) a través de la cuantificación de la inhibición en la reducción del citocromo c por parte del anión superóxido (O⁻₂) generado por el sistema xantina oxidasa (XOD)/hipoxantina. Este método consta de un sistema productor de anión superóxido (1), y un sistema de detección de la enzima SOD (2):

1) Hipoxantina
$$\rightarrow \rightarrow \rightarrow$$
 Xantina $\rightarrow \rightarrow \rightarrow$ Acido úrico
 $O_2 \rightarrow O_2^{-}$ $O_2 \rightarrow O_2^{-}$

2) O_2^{-} + Citocromo c-oxidado $\rightarrow \rightarrow \rightarrow O_2$ + Citocromo c-reducido $\downarrow SOD$ O_2

Antes de iniciar la reacción enzimática, y con el objetivo de eliminar las pequeñas moléculas capaces de interferir con esta actividad, las fracciones citosólicas de glándula digestiva y branquias se filtraron a través de columnas Sephadex G-25. Para determinar la máxima reducción del citocromo c, a 1500 µl de medio de reacción que contenía tampón fosfato 43 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM, hipoxantina 0,05 mM, y citocromo c 0,01 mM, se añadió xantina oxidasa (XOD) a una concentración final de 1,8 mU ml⁻¹, y se siguió el descenso en la absorbancia a 550 nm durante dos minutos. El ensayo se repitió añadiendo 50 µl de muestra convenientemente diluida (F1) en el medio de reacción y, a continuación, se ensayaron distintas diluciones de la muestra hasta obtener aproximadamente un 50% de inhibición de la máxima reducción del citocromo c obtenida sin muestra. La actividad SOD se expresó en unidades (U) por minuto y por miligramo de proteína definiéndose una unidad (U) de enzima SOD como la cantidad de enzima capaz de provocar una inhibición de la reducción del citocromo c del 50%:

% inhibición citocromo c = 100 - 100 x Pendiente muestra Pendiente blanco (max. red. cit c)

SOD (U min⁻¹ mg⁻¹) = $\frac{\% \text{ inhibibición cit c x F1 x F2}}{50 \text{ x [proteína]}}$

Donde:

F1: Factor de dilución inicial de la muestra
F2: Factor de dilución en el medio de reacción (1550/50)
[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.VII. Catalasa

La actividad catalasa se midió siguiendo el método descrito en Claiborne (1985), midiendo el descenso de la absorbancia a 240 nm a consecuencia de la transformación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:

$$2 H_2 O_2 \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow 2 H_2 O + O_2$$

A 2950 µl de medio de reacción que contenía tampón fosfato 50 mM pH 7,0, y H_2O_2 50 mM se añadieron 50 µl de muestra convenientemente diluida (F1) y se siguió el descenso de la absorbancia a 240 nm durante 2 minutos. La actividad CAT se expresó en µmoles de H_2O_2 degradados por minuto y por mg de proteína citosólica aplicando la fórmula:

CAT (μ mol min⁻¹ mg⁻¹) = $\frac{CAT \times F1 \times F2}{C \times [proteina]}$

Donde:

 $CAT (ml^{-1} min^{-1})$: Pendiente (-) de la muestra

F1: Factor de dilución previo de la muestra

F2: Factor de dilución en el medio de reacción (3000/50)

C: coefficiente de extinción molar del H_2O_2 (-0.04 mM⁻¹ cm⁻¹)

[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.VIII. Glutatión Peroxidasa

La enzima glutatión peroxidasa (GP) cataliza la reducción de peróxidos lipídicos no orgánicos y peróxidos lipídicos orgánicos oxidando glutatión y generando alcoholes. Si el ensayo enzimático se realiza utilizando como substrato de la reacción peróxido de hidrógeno se determina la actividad glutatión peroxidasa independiente del selenio (nonSeGP), mientras que si se utiliza peróxido de cumeno como substrato de la reacción se determina la actividad glutatión peroxidasa independiente del selenio (nonSeGP), mientras que si se utiliza dependiente del selenio (SeGP). La enzima GP se cuantificó según el procedimiento descrito en Livingstone *et al.* (1992) siguiendo la siguiente reacción:



GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado, ROOH: substrato (peróxido de cumeno o H₂O₂), GP: glutation peroxidasa; GRX: glutatión reductasa comercial

Para cada muestra se prepararon 700 µl de medio de reacción que contenían tampón fosfato 50 mM pH 7,5, GSH 3,5 mM, azida sódica 1 mM, 1 unidad de glutatión reductasa comercial (GRX), NADPH 0,12 mM, y 25 µl de muestra convenientemente diluida (F1). Tras incubar unos minutos, la reacción enzimática se inició añadiendo 25 µl de substrato (peróxido de hidrógeno o hidroperóxido de cumeno) para obtener una concentración final en el medio de reacción 0,8 mM en el caso del peróxido de hidrógeno, y 3 mM en el caso del hidroperóxido de cumeno. La enzima GP se cuantificó siguiendo el descenso de la absorbancia a 340 nm durante varios minutos debido al consumo de

NADPH durante la formación de GSH a partir de GSSG. Debido a la existencia de una conversión química del NADPH fue necesario hacer ensayos sin muestra en el medio de reacción, cuya pendiente se sustrajo de la pendiente obtenida en los ensayos con muestra. La actividad GP se expresó en nmoles de NADPH oxidados por minuto y por mg proteína citosólica aplicando la siguiente fórmula:

 $\mathbf{GP} \text{ (nmol min^{-1} mg^{-1})} = \underline{\mathbf{GP} \text{ x F1 x F2 x1000}}$

E x [proteína]

Donde:

GP (Δpendiente ml⁻¹ min⁻¹): Diferencia de pendiente de las rectas en el ensayo con y sin muestra
F1: Factor de dilución inicial de la muestra
F2: Factor de dilución de la muestra en el medio de ensayo (750/25)
€: coeficiente de extinción molar del NADPH oxidado a 340 nm (6,2 cm⁻¹mM⁻¹)
[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.IX. Glutatión Reductasa

La enzima glutatión reductasa (GR) hace posible la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) a través de un proceso dependiente del NADPH, y se cuantificó siguiendo el procedimiento descrito en Ramos-Martínez *et al.* (1983).

 $GSSG + 2 \text{ NADPH} \longrightarrow \longrightarrow \longrightarrow 2 \text{ GSH} + 2 \text{ NADP}$

Para cada muestra se incubaron 725 μ l de medio de reacción que contenían tampón fosfato 100 mM pH=6,8, GSSG 1 mM, y NADPH 0,12 mM durante unos minutos a 25 °C. A continuación se añadieron 25 μ l de muestra convenientemente diluida (F1), y se siguió el descenso de la absorbancia a 340 nm durante unos minutos. La enzima GR se expresó en nmoles de NADPH oxidados por minuto y por miligramo de proteína citosólica aplicando la siguiente fórmula:

GR (nmol min⁻¹ mg⁻¹) = $\frac{\text{GR x F1 x F2}}{\text{C x [proteína]}}$

Donde:

GR (ml⁻¹ min⁻¹): Pendiente de la recta obtenida en el ensayo.

F1: Factor de dilución inicial de la muestra

F2: Factor de dilución de la muestra en el medio de ensayo (750/25)

€: coeficiente de extinción molar del NADPH oxidado a 340 nm (6,2 cm⁻¹mM⁻¹)

[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.X. Peroxidación de las Membranas Lipídicas

La peroxidación de las membranas lipídicas se cuantificó siguiendo el método descrito en Buege y Aust (1978) basado en la cuantificación del malondialdehido (MDA), el compuesto más abundante de los formados al descomponerse los peróxidos lipídicos inestables derivados de los ácidos grasos poliinsaturados.

A 600 µl de varios estándares de malonaldehido bis-(dimetilacetal) [0-20 nmol ml⁻¹] y de las muestras convenientemente diluidas (F1) se añadieron 1200 µl de reactivo TBA, que contenían HCl 0,25 N, ácido tricloroacético 15 % y ácido tiobarbitúrico y 0,375%. Tras agitar, los tubos se incubaron en un baño a 80 °C durante 20 minutos. Los tubos se enfriaron con hielo, y se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 minutos. A continuación, se midió la absorbancia de las fracciones sobrenadantes a 535 nm y la concentración de MDA se determinó utilizando la recta patrón de malonaldehido bis-(dimetilacetal) y se expresó en nmoles de MDA generados por miligramo de proteína microsomal aplicando la fórmula siguiente:

LPO (nmolMDA mg⁻¹) =
$$\frac{\text{MDA x F1x F2}}{[\text{proteína}]}$$

Donde:

MDA: concentración de MDA (nmol ml⁻¹) calculada al transformar la absorbancia de los estándares de malonaldehido bis-(dimetilacetal).

F1: Factor de dilución inicial de la muestra

F2: Factor de dilución de la muestra en el medio de ensayo (1200/600)

[proteína]: Contenido en proteína de la muestra (mg ml⁻¹)

I.XI. Concentración de Proteínas

La concentración de proteínas se cuantificó siguiendo el método descrito en Lowry *et al.* (1951). Para ello, se prepararon los reactivos A, B y C, y estándares de albúmina bovina de concentraciones 0-1,6 mg ml⁻¹.

Reactivo A: 1,3 gr de Tartrato Na-K en 250 mL de agua con 0,5 gr de CuSO₄ 5H₂

Reactivo B: 20 g de Na₂CO₃ en 11 de NaOH 0,1 N

Reactivo C: Se toman 2,5 ml de reactivo A y se llevan a 50 ml con reactivo B

Se colocaron 100 μ l de los estándares de albúmina y de las muestras convenientemente diluidas (F1) en tubos de ensayo, y se añadieron 5 ml de reactivo C, agitando vigorosamente. Tras almacenar durante 25 minutos, protegidos de la luz, y a temperatura ambiente se añadieron 0,5 ml de reactivo de Folin (diluido x 2) a los tubos de ensayo, se agitaron y se volvieron a almacenar durante 25 minutos, protegidos de la luz, y a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia

de las muestras y estándares a 595 nm de longitud de onda. La concentración de proteína de la muestra se calculó usando la recta de estándar de albúmina, aplicando la siguiente fórmula:

[**proteína**] (mg ml⁻¹) = [proteína] x F

Donde:

[proteína]: Contenido en proteína de la muestra calculado a partir de la recta patrón de albúmina $(0-1,6 \text{ mg ml}^{-1})$

F: Factor de dilución inicial de la muestra

I.XII. Cuantificación de micronúcleos, células con puentes nucleares y células binucleadas

La frecuencia de micronúcleos en branquias de mejillón se determinó siguiendo el protocolo descrito en UNEP/RAMOGE (1999). Para ello se extrajeron las branquias del mejillón y se introdujeron dentro de un tubo de ensayo de cristal, donde se cortaron en pequeños trozos con unas tijeras. Se añadieron 2 mL de proteasa (Dispase: 0,1 mg mL⁻¹ en solución salina Hanks 2X), y se agitó vigorosamente con la mano. Pasados diez minutos, la suspensión celular obtenida se filtró y centrifugó a 600 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se separó un alícuota de 1 ml del precipitado obtenido, y se añadió un volumen igual de una disolución de metanol: ácido acético (3:1), que se dejó fijar durante 20 minutos. Parte de la suspensión celular se extendió sobre un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Los portaobjetos se tiñeron con una disolución de azul de metileno (Giemsa) al 3% durante 10-15 minutos y, tras su secado, las preparaciones se sellaron aplicando pegamento (Euquita) y colocando un cubreobjetos.

Los micronúcleos, puentes nucleares y células binucleadas se identificaron en microscopio a 1000X de magnificación usando un objetivo de inmersión en aceite. En cada muestra se contaron al menos 1000 células con el citoplasma intacto. El criterio usado para identificar los micronúcleos fue: que su estructura y color fueran similares a la del núcleo principal, que estuvieran localizados en el mismo plano óptico que el núcleo principal, que fueran redondos u ovalados, que no estuvieran fragmentados, y que su tamaño fuera inferior o igual a un tercio del núcleo principal. El contaje de las células con puentes nucleares y las células binucleadas se hizo siguiendo los criterios descritos en Fenech *et al.* (2003). Los puentes nucleares son estructuras que se parecen a los micronúcleos, pero que se encuentran unidos o conectados con el núcleo principal por una conexión nucleoplasmática, que puede ser muy estrecha o mucho más obvia. Las células binucleadas son células que presentan dos núcleos con su membrana celular intacta y aproximadamente del mismo tamaño, patrón de teñido, e intensidad. Estos núcleos pueden tocarse pero no superponerse. La frecuencia de micronúcleos, puentes nucleares y células binucleadas se expresó por 1000 células (‰).

(Solución HANKS: NaCl 273,8 mM, KCl 10,73 mM, MgSO₄·H₂O 0,81 mM, CaCl₂·2H₂O 2,52 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 0,674 mM, KH₂PO₄ 0,88 mM, NaHCO₃ 8,33 mM, D-Glucosa·H₂O 10,09 mM)

Referencias

- Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. 1980. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcenogenesis and toxicity. PNAS of the USA 77: 5216–5220.
- Buege J, Aust DS. 1978. Microsomal lipid peroxidation. En: Fleischer S, Packer L (editores): Methods in enzymology. Volumen II. Academic Press. Nueva York. pp 302-306.
- Claiborne A. 1985. Catalase activity. En: Greenwald RA. (editor): *Handbook of Methods for Oxygen. Radical Research*. CRC Press. Boca Raton. Florida. pp 283–284.
- Dehnen W, Tomingas R, Roos J. 1973. A modified method for the assay of benzo[a]pyrene hydroxylase. Anal Biochem 53:373-383.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mut Res 534:65-75.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutation S-Trasferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 240:7130-7139.
- Livingstone DR, Lips F, García MP, Pipe RK. 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Mar Biol 112: 265-276.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem 244:6049-6055.
- Omura T, Sato R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem 239:2370-2378.
- Ramos-Martínez JI, Bartolomé TR, Pernas, RV. 1983. Purification and properties of glutathione reductase from hepatopancreas of *Mytilus edulis* L. Comp Biochem Physiol B 75:689-692.
- Stegeman J.J. 1985. Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the western North Atlantic. Mar Biol 89:21-30.
- UNEP/RAMOGE 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP. Atenas. pp 1–88.
- 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.

APÉNDICE II

Índices de Impacto de las Revistas que han publicado los trabajos que contiene esta Memoria

Journal Citation Reports®

RETURN TO MARKED LIST

2010 JCR Science Edition

Sorted by: Journal Title

MARKED JOURNAL LIST

Abbreviated Journal Title	ISSN	2010 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2010 Articles	Cited Half- life	<i>Eigenfactor</i> ™ Score	Article Influence TM Score
AQUAT TOXICOL	0166- 445X	7232	3.333	3.822	0.461	217	6.0	0.01721	0.966

<u>Acceptable Use Policy</u> Copyright © 2012 <u>Thomson Reuters</u>.



Published by Thomson Reuters

Journal Citation Reports®

RETURN TÖ MARKED LIST

2010 JCR Science Edition

Sorted by: Journal Title

MARKED JOURNAL LIST

Abbreviated Journal Title	ISSN	2010 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2010 Articles	Cited Half- life	<i>Eigenfactor</i> ™ Score	Article Influence TM Score
CHEMOSPHERE	0045- 6535	32165	3.155	3.559	0.383	768	5.6	0.08258	0.888

<u>Acceptable Use Policy</u> Copyright © 2012 <u>Thomson Reuters</u>.



Journal Citation Reports®

RETURN TO MARKED LIST

2010 JCR Science Edition

Sorted by: Journal Title

MARKED JOURNAL LIST

Abbreviated Journal Title	ISSN	2010 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2010 Articles	Cited Half- life	<i>Eigenfactor</i> ™ Score	Article Influence TM Score
ENVIRON MOL MUTAGEN	0893- 6692	2931	3.493	2.740	0.766	77	8.9	0.00510	0.743

<u>Acceptable Use Policy</u> Copyright © 2012 <u>Thomson Reuters</u>.



Journal Citation Reports®

RETURN TÖ MARKED LIST

2010 JCR Science Edition

Sorted by: Journal Title

MARKED JOURNAL LIST

Abbreviated Journal Title	ISSN	2010 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2010 Articles	Cited Half- life	<i>Eigenfactor</i> TM Score	Article Influence TM Score
ECOTOXICOLOGY	0963- 9292	2015	3.051	2.879	0.437	158	4.7	0.00616	0.784

<u>Acceptable Use Policy</u> Copyright © 2012 <u>Thomson Reuters</u>.

