

**Centre de Recerca i Innovació en Toxicologia
Universitat Politècnica de Catalunya**



Tesis Doctoral

**UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EVALUAR
EL ESTADO FISIOLÓGICO DE LA OSTRA EN EL DELTA
DEL EBRO**

Victoria Ochoa Villalba
Barcelona, Octubre de 2012

Tesis Doctoral

Universidad Politécnica de Cataluña
Programa de Doctorado en Ingeniería de proyectos: medio
ambiente, seguridad, calidad y comunicación

**UTILIZACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EVALUAR
EL ESTADO FISIOLÓGICO DE LA OSTRA EN EL DELTA
DEL EBRO**

Memoria presentada por Victoria Ochoa Villalba
para optar al Título de Doctora en Biología

Victoria Ochoa Villalba
Barcelona, Octubre de 2012

Centro de Investigación e Innovación en Toxicología
Universidad Politécnica de Cataluña

Directora:
Dra. M^a Carmen Riva Juan

Co-Director:
Dr. Carlos Barata Martí

A la memoria de mi padre

*A mi madre,
por enseñarme a luchar*

Agradecimientos

Dicen que al final todo llega y parece que es verdad. Llegó el final de este periplo que parecía interminable y que tantas alegrías, penas y satisfacciones me ha traído en estos últimos cuatro años. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que directa o indirectamente participaron en la presente Tesis, ya fuese orientando, leyendo, corrigiendo, animando o acompañando en este trabajo.

Debo agradecer de forma especial a la Dra. M. Carmen Riva por haber confiado en mi persona; haberme ofrecido la posibilidad de realizar éste trabajo bajo su dirección y por haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades realizadas durante el desarrollo de la Tesis. Quiero expresar también, mi más sincero agradecimiento al Dr. Carlos Barata por su importante aporte y participación activa en el desarrollo y codirección de ésta tesis, sin su dedicación, motivación, criterio y paciencia no habría llegado a este punto.

Agradezco al Laboratorio de Toxicología Ambiental (Intexter, UPC) y al Centre de Recerca i Innovació en Toxicologia (CRIT-UPC) por la infraestructura para la realización del presente trabajo de tesis doctoral.

Para el presente trabajo se contó con la colaboración del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)* que nos prestó sus instalaciones en Sant Carles de la Ràpita para poder desarrollar las operaciones de muestreo, quisiera agradecer a su personal y muy especialmente con Ana Roque, la ayuda prestada. También, agradecer al equipo de Damià Barceló del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua que nos facilitaron los datos sobre concentración de plaguicidas en los lugares de estudio y muy especialmente a Miren López de Alba por facilitarnos esta base de datos y su inestimable ayuda en la discusión de los resultados de pesticidas.

Agradezco a los doctores José Vicente Rovira y Luis Lassaleta por despertar mi interés por la investigación y a quienes debo que un día decidiese hacer el doctorado.

No quiero olvidar a mis compañeros y amigos del CRIT-UPC, Bettina, Laia, Carla, Sandra, Mari, Lluís y Marta, con quienes he compartido incontables horas de trabajo en muestreos de campo y en laboratorio y porque cada uno de ellos ha aportado su granito de arena en este trabajo. Y muy especialmente al doctor Joan Ribó por sus revisiones y por su disposición a ayudarme siempre que lo he necesitado.

A todos los compañeros y amigos con quien he coincidido en el último año de trabajo en el CSIC-IDAEA: Eva, Bruno, Bene, Denisse, Meritxell, Eli, Marta, Alba, Anna y Sergi, gracias por aguantarme y escucharme en los buenos y malos momentos (y por esos mojitos). Gracias especialmente a ti Melissa, por transmitirme todos tus

conocimientos sobre los biomarcadores a mi llegada, por recorrer conmigo los campos del delta, por prestarme tu ayuda desinteresada en innumerables ocasiones y sobre todo, gracias por tu amistad.

A todas aquellas personas que habéis sido más que compañeros, incluso más que amigos, que me habéis acompañado durante éstos años como si fueseis mi pequeña familia en Barcelona; porque a pesar de haber llegado sola a ésta ciudad, habéis logrado que no me sienta así ni un solo día. Joana, Juanjo, Blanca, Meli, Eva y Rosa, gracias de todo corazón por compartir conmigo los momentos de alegría y por vuestra compañía y ayuda en los peores momentos.

Gracias a mi gran amiga, y compañera de piso, Bárbara, quien más me ha tenido que sufrir en estos últimos meses. Gracias por dejarme ver la luz en la oscuridad, por sacarme una sonrisa todos los días, por tus ánimos, tu apoyo y por la alegría que transmites.

A mis amigos Natalia, Alberto, Paquito, Jesús, Puentis, Rocío, Ángela y Jose porque con ellos he aprendido que el tiempo y la distancia en la amistad son relativos. Sin vuestra ayuda éste camino habría sido mucho más difícil.

Por último quiero expresar mi agradecimiento a mi familia, a mi madre Victorina por enseñarme el valor del esfuerzo y la responsabilidad, a mi hermana Mari y a mi cuñado Antonio, por confiar siempre en mí y animarme en todo momento. Sin olvidar a mi sobrino Pablo, por las alegrías que me da desde que nació. Gracias a vuestro cariño, comprensión y apoyo incondicional he logrado seguir avanzando hacia mi objetivo en este proceso tan largo y a veces tan difícil. Sin vosotros no habría podido llegar a mi meta y a vosotros os dedico éste trabajo.

El presente trabajo se ha llevado a cabo bajo el soporte de los proyectos MEC-MICINN CTM2007-62436 y CTM2010-18167.

Resumen

La aplicación de pesticidas en el Delta del Ebro (NE de España) durante el periodo de cultivo de arroz se ha asociado a episodios de mortalidad de ostras (*Crassostrea gigas*) que ocurren anualmente durante la primavera. Sin embargo no hay estudios previos que hayan realizado una evaluación directa de los niveles de pesticidas en agua y efectos en las ostras cultivadas en las bahías del Delta del Ebro.

En el presente trabajo de Tesis, se monitorizaron parámetros físico-químicos y contenido de pesticidas en agua, el contenido de metales pesados en ostras y hasta 19 marcadores bioquímicos en ostras transplantadas durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas (de Mayo a Junio) en dos años consecutivos (2008 y 2009) con el objetivo de establecer posibles conexiones entre ellos y con los episodios de mortalidad de las ostras.

Los resultados de los niveles de metales en las ostras son similares a los encontrados en zonas no contaminadas indicando que los metales presentes en el agua de las bahías son bajos. Los patrones de acumulación de metales diferenciaron dos fuentes de contaminación: una procedente de las actividades agrícolas dentro del propio Delta del Ebro para el As, Cu, Zn y otra procedente del río Ebro, relativa a las actividades industriales aguas arriba (Hg y Pb) o al plomo procedente de las actividades cinegéticas (Pb).

Los niveles de pesticidas encontrados en el agua de las bahías, fueron elevados y similares a los encontrados en áreas impactadas por lo que se estudió su relación con las respuestas fisiológicas observadas en las ostras. Las actividades de las colinesterasas analizadas en branquias se mostraron invariables en el tiempo y puntos de muestreo lo que indicó una escasa sensibilidad a la presencia de pesticidas organofosforados y carbamatos en agua. Sin embargo la actividad de la carboxilesterasa en branquias se mostró correlacionada con los residuos de pesticidas organofosforados y carbamatos presentes en agua pudiéndose considerar un buen indicador de exposición a pesticidas anticolinérgicos en ostras.

Las respuestas de los biomarcadores estudiados evidenciaron claras diferencias entre las ostras en los dos años de estudio. En el año 2009 las ostras mostraron sus defensas antioxidantes inalteradas desde principios de Mayo hasta finales de Junio y como consecuencia presentaron mayores daños en los tejidos (medidos como peroxidación de lípidos y niveles de lipofuscina) y mayores tasas de mortalidad. Sin embargo las ostras en 2008, aumentaron sus defensas antioxidantes de Mayo a Junio y presentaron bajos niveles de peroxidación de lípidos, daños en el ADN y bajas tasas de mortalidad.

Algunos pesticidas en agua como la bentazona y el propanil junto con las altas temperaturas y niveles de salinidad se relacionaron con los daños en los tejidos de ostras pero las grandes diferencias entre los dos años y la alta tasa de mortalidad registrada en el año 2009 parecen indicar que además de los factores abióticos podrían estar afectando otros factores como el uso de ostras sensibles a las enfermedades. Resultados obtenidos en el Institut de Recerca de Sant Carles de la Ràpita (IRTA) confirmaron una mayor incidencia de infecciones víricas en ostras en el 2009 lo que apoya la hipótesis de que la combinación de factores abióticos junto con una mayor propensión a las enfermedades fueron las causas de las mortalidades registradas en el 2009.

Publicaciones y participación en congresos

El trabajo realizado en entorno de esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

“Are pesticide residues associated to the rice production affecting oyster production in Delta del Ebro, NE Spain?” V. Ochoa, M.C Riva, M. Faria, M. López de Alda, D. Barceló, M. Fernández Tejedor, A. Roque y C. Barata. *Science of the Total Environment*, 2012; 437:209-218

“Responses of B-esterase enzymes in oysters (*Crassostrea gigas*) transplanted to pesticide contaminated bays from the Ebro Delta (NE, Spain)”. V. Ochoa, M.C. Riva, M. Faria y C. Barata. Aceptado en *Marine Pollution Bulletin*

“Heavy metal content in oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the Ebro Delta in Catalonia, Spain” V.Ochoa, C.Barata y M.C. Riva. En revisión en *Environmental Monitoring Assessment*.

Y a las siguientes presentaciones a congresos:

Oxidative stress biomarkers in common oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the Ebro Delta, Spain. V. Ochoa, M. Faria, C. Barata, A. Roque, MC Riva. Póster. SETAC Europe 20th Annual Meeting: "Science and Technology for Environmental Protection", 23-27 Mayo 2010, Sevilla, España.

Cholinesterase activities in common Oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in the Ebro Delta (Spain): Application to biomonitoring. V. Ochoa, M. Faria, C. Barata y MC Riva. Póster. SETAC Europe 19th Annual Meeting: "Protecting ecosystem health: Racing the Challenger of a globally changing environment". 31 Mayo - 4 Junio 2009, Gotemburgo, Suecia.

Ecotoxicological studies related to pesticide use in the Ebro River Delta. B. Vallès, V. Ochoa, A. Roque, M. C. Riva. Póster en el XII Congreso Internacional de Toxicología. IUTOX 19-23 Julio 2010 Barcelona.

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACID	Pesticidas ácidos
ADNd	Daños en ADN
ANIL	Anilidas
ANOVA	Análisis de varianza
As	Arsénico
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CAT	Catalasa
CbE	Carboxilesterasa
CBs	Carbamatos
Cd	Cadmio
CDNB	Cloro, 2,4 dinitrobenceno
ChE	Colinesterasas
Cond	Conductividad
CP	Componente Principal
Cu	Cobre
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTNB	Ácido dinitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos, <i>Food and Drug Administration</i>
GPx-Se	Glutación peroxidasa dependiente de Selenio
GPx-T	Glutación peroxidasa total
GR	Glutación reductasa
GS-CDNB	Conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutación
GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación –S-Transferasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hg	Mercurio
HOCl	Ácido hipocloroso

ICM-MS	Espectrofotometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
K_{ow}	Coeficiente de reparto octanol/agua
L. C.	Límite de cuantificación
L. D.	Límite de detección
L^{\cdot}	Radicales lipídicos
LH	Ácido graso poliinsaturado
LIPID	% de lípidos respecto a peso fresco
LMT	Límite máximo de tolerancia
LO^{\cdot}	Radical alcoxil lipídico
LOO^{\cdot}	Radical peroxil lipídico
LOO^{\cdot}	Radicales peroxilos
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
LPF	Lipofuscina
LPO	Peroxidación de lípidos
mcB	Monoclorobamina
MCPA	2-metil-4-clorofenoxiacético
MDA	Malondialdehído
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MXR	Mecanismo de resistencia xenobiótico
n.d.	no detectado
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NMPI	1-metil-2-fenilindol
O_2	Oxígeno
1O_2	Oxígeno singlete
$O_2^{\cdot -}$	Anión superóxido
OH^{\cdot}	Radical hidroxilo
OPs	Organofosforados
p.f.	peso fresco
p.s.	peso seco
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Pb	Plomo
PC	Componente principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Analysis</i>)
PCBs	Bifenilos policlorados
PChE	Propionilcolinesterasa
PET	Polietileno tereftalato

PHU	Fenilureas
PrCh	Propinilcolina
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
SPE-LC-MS/MS	Extracción de fase sólida acoplada a una cromatografía en fase líquida y espectrometría de masas en tándem
SRM	Selected Reaction Monitoring
SS	Sólidos en Suspensión
TBARs	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobartitúrico
TBTs	Compuestos derivados del Tributíl-estaño
TCM	Tiocarbamatos
Tmm	Temperatura media
TMP	1,1,3,3 tetrametoxipropano
TNB	5-tio-2 nitrobenzoato
Tnm	Temperatura mínima media
TRZ	Triazinas
T	Temperatura
Txm	Temperatura máxima media
Zn	Zinc

ÍNDICE

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1. <i>Ecotoxicología</i>	1
1.2. <i>Evaluación del Riesgo Ambiental</i>	1
1.3. <i>Biomarcadores</i>	4
1.3.1. Revisión	4
1.3.2. Biotransformación de xenobióticos	7
1.3.3. Estrés oxidativo	9
1.3.4. Biomarcadores de estrés oxidativo	14
1.3.5. Biomarcadores de daños oxidativos	16
1.3.6. Biomarcadores de neurotoxicidad	18
1.4. <i>Moluscos bivalvos como organismos centinela</i>	19
1.4.1. La Ostra del Pacífico u otrón (<i>Crassostrea gigas</i>) como bioindicador de contaminación de ecosistemas acuáticos	20
1.5. <i>Localización del estudio</i>	24
1.5.1. El Delta del Ebro	24
1.5.2. Contaminación por pesticidas en el Delta del Ebro	25
1.5.3. Contaminación por metales pesados en el Delta del Ebro	27
1.6. OBJETIVOS	31
2. Materiales y Métodos	35
2.1. <i>Diseño de Estudio</i>	35
2.1.1. Población y muestra de estudio	35
2.1.2. Localización espacial del estudio: Puntos de muestreo	36
2.1.3. Localización temporal del estudio: Campañas de muestreo	38
2.2. <i>Metodología para la toma de muestras</i>	38
2.2.1. Toma de muestras de ostra	38
2.2.2. Toma de muestras de aguas	39
2.3. <i>Metodología de análisis de muestras</i>	41
2.3.1. Análisis bioquímico de ostra	41
2.3.2. Análisis de metales en ostra	56
2.3.3. Análisis de parámetros físico-químicos de aguas	56
2.3.4. Análisis de pesticidas en agua	57
2.4. <i>Análisis de datos</i>	57
3. Resultados	63
3.1. <i>Monitorización de los parámetros ambientales del agua en las bahías de Alfacs y Fangar durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas en los arrozales del Delta del Ebro</i>	63
3.1.1. Parámetros fisicoquímicos del agua	63
3.1.2. Niveles de contaminantes presentes en el agua	64
3.2. <i>Monitorización del contenido de metales pesados en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro</i>	67
3.2.1. Concentración de metales en las ostras	67
3.2.2. Patrones de variación del contenido de metales en las ostras	68
3.2.3. Análisis de componentes principales del patrón de acumulación de metales en las ostras	71

3.3. <i>Monitorización de la actividad de las B-esterasas en las ostras cultivadas en las bahías del Delta del Ebro</i>	73
3.3.1 <i>Actividad de la AChE, PChE y CbE durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas en el delta del Ebro</i>	73
3.3.2. <i>Relaciones causales entre los parámetros ambientales y las actividades B-esterasas</i>	76
3.4. <i>Respuestas biológicas de las ostras durante el periodo de aplicación máxima de pesticidas en el Delta del Ebro</i>	79
3.4.1. <i>Monitorización de biomarcadores en ostras cultivadas en el Delta del Ebro</i>	79
3.4.2. <i>Patrones de variación de las respuestas biológicas en ostras transplantadas durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas</i>	79
3.4.3. <i>Mortalidad en ostras</i>	89
3.4.4. <i>Relaciones causales entre variables ambientales y respuestas biológicas</i>	89
4. <i>Discusión</i>	95
4.1. <i>Variación espacio-temporal de los parámetros ambientales del agua en las bahías de cultivo de Crassostrea gigas durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas durante dos años consecutivos</i>	95
4.1.1. <i>Variación espacio-temporal de los parámetros fisicoquímicos del agua</i>	95
4.1.2. <i>Variación espacio-temporal de los niveles de contaminantes en agua y evaluación del estado de contaminación por pesticidas de las bahías.</i>	96
4.2. <i>Contenido de metales pesados en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro</i> ..	98
4.2.1. <i>Evaluación del estado de contaminación por metales en las bahías del Delta del Ebro</i>	98
4.2.2. <i>Evaluación de los patrones de variación de metales en las ostras transplantadas en el Delta del Ebro</i>	100
4.2.3. <i>El Contenido de metales en ostras y el riesgo para la salud humana</i>	101
4.3. <i>Respuestas de las B-esterasas en las ostras cultivadas en las bahías del delta del Ebro durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas</i>	103
4.4. <i>Estudio integrado de las variables ambientales y los biomarcadores de estrés oxidativo en ostra (Crassostrea gigas) cultivada en el Delta del Ebro durante el periodo de aplicación máxima de pesticidas.</i>	106
4.4.1. <i>Biomarcadores de estrés oxidativo en ostras cultivadas en el Delta del Ebro</i>	106
4.4.2. <i>Relación entre las variables ambientales y las respuestas biológicas</i>	108
5. <i>Conclusiones</i>	115
6. <i>Bibliografía</i>	119
7. <i>Apéndice</i>	139

Índice de Tablas

1. Introducción

<i>Tabla 1.1. Principales especies reactivas de oxígeno.....</i>	<i>10</i>
--	-----------

2. Materiales y Métodos

<i>Tabla 2.1. Identificación, localización, coordenadas y principales características de los puntos de muestreo.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 2.2. Fechas de las campañas de muestreo de los dos años de estudio.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 2.3. Fechas de las campañas de muestreo de aguas para el análisis de pesticidas en el año 2008.....</i>	<i>40</i>

3. Resultados

<i>Tabla 3.1. Parámetros físico-químicos del agua determinados en los puntos y periodos de muestreo en los dos años de estudio (2008 y 2009).....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 3.2. Niveles de pesticidas (ng l⁻¹) agrupado por clases de compuestos determinados en las muestras de aguas durante el año 2008.....</i>	<i>65</i>
<i>Tabla 3.3. ANOVA de tres vías para la evaluación de los efectos del año, punto y periodo de muestreo sobre los niveles de metales para las ostras de estudio.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 3.4. ANOVA de dos vías para la evaluación de los efectos del punto y periodo de muestreo sobre las colinesterasas analizadas en branquias y músculo aductor de las ostras transplantadas.....</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 3.5. Comparación de los niveles basales de los biomarcadores analizados en las ostras empleadas para iniciar los trasplantes los dos años de estudio (2008 y 2009).....</i>	<i>80</i>
<i>Tabla 3.6. Respuestas proporcionales a los valores iniciales de los biomarcadores analizados en branquias y glándula digestiva de Crassostrea gigas en el año 2008. .</i>	<i>82</i>
<i>Tabla 3.7. Respuestas proporcionales a los valores iniciales de los biomarcadores analizados en branquias y glándula digestiva de Crassostrea gigas en el año 2009. .</i>	<i>83</i>
<i>Tabla 3.8. ANOVA de tres vías para la evaluación de los efectos del año, punto y periodo en los marcadores de las ostras estudiadas.....</i>	<i>84</i>

4. Discusión

<i>Tabla 4.1. Comparación de la concentración de metales (rango de medias en µg⁻¹ peso seco) en Crassostrea gigas del Delta del Ebro con la concentración en ostras del género Crassostrea de otros lugares.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 4.2. Comparación de resultados obtenidos en el presente trabajo con los rangos de variabilidad y valores medios encontrados en trabajos previos.....</i>	<i>107</i>

6. Apéndice

<i>Tabla A1. Comparación de las concentraciones de pesticidas (ng/L) en dos puntos situados en canales de desagüe del Delta del Ebro según los resultados obtenidos en el estudio simultáneo al presente trabajo realizado por Köck et al., (2010) y en un estudio previo realizado en el 2005.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabla A2. Niveles (en ng/L) de los herbicidas ácidos (Bentazona MCPA, 2,4D y mecoprop), anilidas (alaclor, metolaclor y propanil) y organofosfatos (diazinón, dimetoato, fenitrotión y malatión) presentes en las muestras de agua analizadas en el año 2008.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabla A3. Niveles (en ng/L) de fenilureas (diurón, isoproturón, linurón, clortolurón), tiocarbamatos (molinato) y triazinas (atrazina, simazina, cianizina, disetil atrazina, terbutilazina y deisopropil atrazina) presentes en las muestras de agua analizadas en el año 2008.....</i>	<i>142</i>

Índice de Figuras

1. Introducción

Figura 1.1. Representación esquemática del orden secuencial de respuestas a la exposición de contaminantes dentro del sistema biológico.....	3
Figura 1.2. Esquema del metabolismo xenobiótico.....	9
Figura 1.3. Especies reactivas de oxígeno derivadas del proceso de respiración celular.....	10
Figura 1.4. Producción de ROS consecuencia del Ciclo Redox inducido por la presencia de xenobióticos.....	11
Figura 1.5. Esquema de los agentes pro-oxidantes y antioxidantes.....	13
Figura 1.6. Esquema de la peroxidación de lípidos.....	16
Figura 1.7. Anatomía de <i>Crassostrea gigas</i>	20
Figura 1.8. Ciclo de vida de <i>Crassostrea gigas</i>	21
Figura 1.9. Principales países productores de <i>C. gigas</i>	22
Figura 1.10. Localización del estudio. Delta del Ebro.....	24

2. Materiales y Métodos

Figura 2.1. Bateas de cultivo de ostra del Delta del Ebro.....	35
Figura 2.2. Cultivo de ostras por suspensión en cuerdas.....	36
Figura 2.3. Localización geográfica de los puntos de muestreo de ostra.....	37

3. Resultados

Figura 3.1. Concentración total de los pesticidas analizados en las dos bahías (Alfacs y Fangar) en los cuatro periodos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) del año 2008.....	66
Figura 3.2. Concentración de metales pesados (Media \pm Error estándar, N=5) determinados en <i>Crassostrea gigas</i>	69
Figura 3.3. Representación Bi-plot de los dos componentes principales derivados del PCA realizado con los niveles de metales acumulados en las ostras transplantadas respecto a los niveles iniciales a través de los puntos periodos de muestreo y años..	72
Figura 3.4. Actividad acetilcolinesterasa (AChE), propionilcolinesterasa (PChE) y carboxilesterasa (CbE) analizadas en branquias y músculo aductor de <i>Crassostrea gigas</i> expresadas en nmol/min/mg prot.....	75
Figura 3.5. Representación de los dos componentes principales del ACP realizado con los parámetros físico-químicos estudiados.....	77
Figura 3.6. Relación entre las actividades ChE y CbE en branquias de ostras y los scores del PC1 y del PC2 de las variables ambientales obtenidas en la Figura 3.5....	78
Figura 3.7. Respuesta de los biomarcadores analizados en branquias.....	85
Figura 3.8. Respuesta de los biomarcadores analizados en glándula digestiva.....	86
Figura 3.9. Bi-plots de los scores de los puntos y las cargas (loadings) de las variables para los dos primeros componentes del PCA realizado con las variables biológicas y ambientales del año 2008.....	90
Figura 3.10. Bi-plots de los scores de los puntos y las cargas (loadings) de las variables para los dos componentes principales del ACP realizado con los datos de los dos años de estudio.....	91

6. Apéndice

Figura A1. Resumen meteorológico de los años 2008 y 2009 en el Delta del Ebro ..	139
Figura A2. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en branquias de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2008	143
Figura A3. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en branquias de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2009	144

<i>Figura A4. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2008</i>	145
<i>Figura A5. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2008. Continuación</i>	146
<i>Figura A6. Valores de los biomarcadores (Media \pmError) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2009</i>	147
<i>Figura A7. Valores de los biomarcadores (Media \pmError) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2009. Continuación</i>	148

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Ecotoxicología

La preocupación por los posibles efectos de los contaminantes en los ecosistemas es relativamente reciente. En 1977 se utiliza por primera vez el término de **Ecotoxicología** definiéndolo como “la rama de la toxicología que estudia los efectos tóxicos de origen natural o artificial sobre los seres vivos que constituyen la biosfera” (Truhaut, 1977). Comienza así un interés por la contaminación de ecosistemas que viene acompañado del desarrollo de nuevas técnicas destinadas al análisis y cuantificación de los efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas y la biota.

Los ecosistemas acuáticos se han visto especialmente amenazados en las últimas décadas como consecuencia del incremento de la contaminación en aguas de origen antropogénico derivado de la industria, la agricultura y de origen urbano. En este contexto surge la **Ecotoxicología Acuática**, cuya finalidad es el estudio de los efectos de los contaminantes sobre los organismos acuáticos a diferentes niveles biológicos de organización, desde el nivel molecular hasta nivel de organismo, comunidad y ecosistema (Rand *et al.*, 1995).

No obstante, la mayoría de los estudios de ecotoxicología acuática se han centrado en el seguimiento y control de las fuentes puntuales de contaminación (como los vertidos industriales o urbanos), prestando menor atención a las fuentes de origen difuso debido a la dificultad que supone tanto su identificación como su cuantificación.

Las principales fuentes de contaminación difusa en ecosistemas acuáticos se han relacionado con actividades agrarias y en concreto con la aplicación de productos fitosanitarios de control de plagas y enfermedades, que suponen la emisión de grandes cantidades de agentes contaminantes que tras su aplicación directa en las áreas de cultivo, son reconducidas hasta las aguas superficiales y profundas, pudiendo provocar efectos negativos en diferentes niveles de organización biológica y desequilibrios en los ecosistemas.

1.2. Evaluación del Riesgo Ambiental

Para entender correctamente el concepto de Evaluación de Riesgo Ambiental hay que diferenciar el “*peligro*” (como potencial inherente de algo para producir daño) del concepto de “*riesgo*” (que hace referencia a la probabilidad de se produzca realmente el daño a partir de la exposición al peligro; $\text{Riesgo} = \text{Peligro} \times \text{Exposición}$).

El origen de la Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA) se remonta a 1983 cuando el Consejo Nacional de Investigación Norteamericana (US National Research Council,

Introducción

NRC) en el denominado “Red Book” definió una serie de principios a considerar con el objetivo de determinar si un *peligro* ambiental puede causar daños a las personas expuestas y a los ecosistemas (NRC, 1987).

La *evaluación del riesgo ambiental (ERA)* se define como el proceso de estimación y caracterización (con base científica y cierto grado de certeza) de la posibilidad de que ocurran o hayan ocurrido efectos adversos derivados de las acciones humanas sobre los ecosistemas o sus componentes (Depledge y Fossi, 1994).

La ERA ha adquirido mayor importancia desde que se ha tomado conciencia de que aquellos agentes que no son tóxicos para los humanos pueden provocar efectos dañinos en los ecosistemas (Van der Oost *et al.*, 2003).

El proceso de evaluación de riesgo puede tener una orientación más científica (*análisis del riesgo*) o una orientación más política (*de gestión del riesgo*).

El análisis del riesgo comprende todas o algunas de las siguientes determinaciones: identificación de los peligros, evaluación de los efectos, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo. La gestión del riesgo ambiental, sin embargo, se encarga de buscar medidas reguladoras como solución a los riesgos (Van Leeuwen y Hermens, 1995).

Hoy en día la Evaluación del Riesgo Ambiental constituye la mejor herramienta con base científica para dar soporte a la toma de decisiones en gestión ambiental (Johnston *et al.*, 2002).

Se pueden diferenciar dos tipos de ERA : (I) la *ERA prospectiva* que se realiza mediante métodos de predicción de futuros riesgos derivados de la presencia de contaminantes y (II) la *ERA retrospectiva* en la que se establece la relación potencial entre una fuente contaminante y los efectos ecológicos causados por la exposición de organismos al agente contaminante (Suter, 1993).

El proceso de evaluación del riesgo ambiental consta de dos componentes básicos que son la *caracterización de la exposición* y la *caracterización de los efectos*. Para dicha caracterización se suele seguir un esquema de trabajo que consta de tres fases:

- (I) *Definición del problema*, en la que se analiza toda la información disponible para identificar el agente causante de estrés (de origen químico, físico y/o biológico), las fuentes de emisión, los receptores y los parámetros a estudiar.
- (II) *Análisis del Riesgo*, que se refiere a la caracterización de la exposición (análisis de las fuentes generadoras de estrés, su distribución y exposición del receptor a escala espacial y temporal) y a la caracterización de los efectos (descripción de los efectos producidos por la exposición en los parámetros seleccionados).

- (III) **Caracterización del riesgo:** En la que se integran los resultados de ambas caracterizaciones (exposición y efectos), para determinar si los efectos adversos son o no aceptables.

El proceso de Evaluación del Riesgo Ambiental se complica por la capacidad de algunos agentes contaminantes (y sus derivados) de afectar a varios niveles de organización biológica. Los factores ambientales (contaminantes) que causan efectos dañinos a nivel poblacional son difíciles de observar a nivel de organismo, ya que muchos de estos efectos se manifiestan sólo tras una exposición prolongada en el tiempo. Sin embargo llegados a tal punto los daños ya son irreversibles y ya no hay tiempo para acciones de remediación o de reducción de riesgo (Van der Oost *et al.*, 2003).

Una situación de estrés generada por un contaminante conlleva una cadena de respuestas en diferentes niveles de organización biológica (desde el nivel molecular hasta el ecosistema) tal y como se representa en la Fig. 1.1. (adaptada de Bayne *et al.*, 1985).

Los efectos en niveles altos de organización biológica van siempre precedidos de cambios previos en niveles inferiores de organización, permitiendo el desarrollo de señales de alarma tempranas (biomarcadores) de los efectos tardíos en niveles superiores de organización (Bayne *et al.*, 1985).

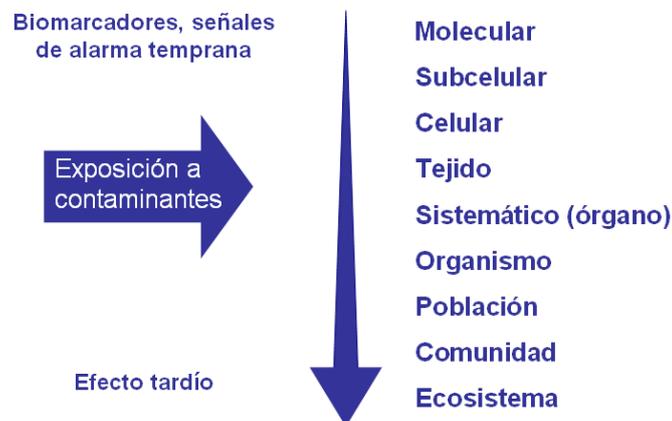


Figura. 1.1. Representación esquemática del orden secuencial de respuestas a la exposición de contaminantes dentro del sistema biológico (adaptado de Bayne *et al.*, (1985))

Introducción

1.3. Biomarcadores

1.3.1. Revisión

1.3.1.1. Concepto de biomarcador

El concepto de biomarcador surge en los años 70 en el contexto de la medicina y es a finales de los 80 cuando comienza a aplicarse en el ámbito del medio ambiente (Depledge y Fossi, 1994; McCarthy y Shugart, 1990; Peakall, 1994; Walker, 1992).

El término de biomarcador, se utiliza en un sentido muy amplio que incluye casi cualquier medida que refleja una respuesta biológica relacionada con el peligro potencial derivado de la exposición de un agente químico, físico o biológico (WHO, 1992).

Más estrictamente los biomarcadores se definen como respuestas biológicas a nivel molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales procedentes de hábitats contaminados como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, que nos informan si el organismo objeto de estudio ha estado expuesto y/o es afectado por sustancias tóxicas, aportando información sobre la magnitud de la respuesta del organismo a la exposición al contaminante (McCarthy y Shugart, 1990).

El estudio de los biomarcadores bioquímicos se basa en la teoría de que la interacción inicial de los contaminantes con los organismos se desarrolla a nivel molecular y celular y por tanto, las respuestas a estos niveles representan medidas sensibles a modo de advertencias tempranas de posibles efectos a nivel individual (Peakall, 1994; Van der Oost *et al.*, 2003). Razón por la que los niveles inferiores de organización se convierten en los más apropiados para el estudio de las relaciones causa-efecto y de los mecanismos de acción de los contaminantes.

1.3.1.2. Tipos de biomarcadores

De acuerdo con la NRC, (1987) y WHO, (1992) los biomarcadores se pueden clasificar en tres tipos:

- **Biomarcadores de exposición:** Se utilizan para identificar y evaluar la exposición a un agente tóxico u otro agente estresante. Indican la presencia de un xenobiótico, los metabolitos derivados de su biotransformación o los productos de su interacción con componentes endógenos (moléculas o células) del organismo expuesto.
- **Biomarcadores de efectos:** Incluyen medidas bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones en tejidos o fluidos corporales de un organismo reconocidas como

consecuencias y/o posibles daños derivados de la exposición a los agentes contaminantes. Están asociados a los mecanismos tóxicos de acción de los contaminantes sobre los organismos expuestos y ayudan a comprender tanto los factores causales del daño como sus consecuencias ecológicas, proporcionando una medida de efecto tóxico.

- **Biomarcadores de susceptibilidad:** Indican la capacidad inherente o adquirida de un organismo a responder a la exposición de un xenobiótico específico. Incluyen tanto factores genéticos como posibles alteraciones en los receptores que podrían alterar la susceptibilidad de un organismo ante la exposición a un determinado contaminante.

En resumen los biomarcadores pueden indicar si un organismo ha estado expuesto a contaminantes (*biomarcadores de exposición*) y/o la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante (*biomarcadores de efecto*).

1.3.1.3. Biomarcadores en la Evaluación del Riesgo Ambiental

El incremento de contaminación de origen antropogénico sucedido en los últimos años ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollo de nuevas técnicas para la identificación, estimación y evaluación comparativa del riesgo supuesto por descargas de contaminantes en el medio ambiente (Cajaraville *et al.*, 2000).

La mayoría de los programas de Evaluación del Riesgo Ambiental en aguas comienzan con monitoreos de variables físicas y químicas que incluyen temperatura, salinidad, concentración de oxígeno, nutrientes y algunos contaminantes químicos como metales pesados que son de fácil medición. Estos monitoreos proporcionan información muy útil en cuanto a niveles de contaminación pero no aportan información sobre los efectos que producen en los organismos ni sobre los posibles daños a nivel de ecosistema.

Los análisis de compuestos químicos de aguas, además, se enfrentan a una serie de dificultades que limitan la detección de los contaminantes presentes ya que están limitados a los compuestos objeto de estudio, la sensibilidad de la metodología aplicada y en la mayoría de ocasiones a muestras puntuales.

Una de las ventajas que ofrece el empleo de biomarcadores es que no se trata de una simple cuantificación de los niveles de contaminantes en el medio sino que nos aportan información sobre los *efectos biológicos* de los contaminantes (Shugart *et al.*, 1992). Los biomarcadores además utilizan el conocimiento de los procesos bioquímicos y fisiológicos que preceden a los cambios visibles en los organismos como indicadores subletales de los primeros estados de toxicidad y patología. Se basan en el hecho de que los efectos en los niveles inferiores de organización

Introducción

biológica (alteraciones a nivel molecular y celular) ocurren de forma más rápida y a concentraciones menores de exposición, que los que se dan en los niveles superiores de organización (efectos a nivel de organismo, comunidad o ecosistema) (McCarthy y Shugart, 1990; Peakall, 1994).

Los biomarcadores son considerados indicadores a corto plazo de efectos adversos a largo plazo, pudiendo ser utilizados como señales de advertencia temprana de posibles riesgos ambientales (van der Oost *et al.*, 2005), permitiendo de este modo la posibilidad de implantar estrategias de biorremediación antes de que se produzcan daños irreversibles en el medio y consecuencias ecológicas (McCarthy y Shugart, 1990).

Organismos internacionales y agencias medioambientales han reconocido que la evaluación del riesgo ambiental por un contaminante no puede estar basada exclusivamente en los análisis químicos de las muestras, ya que estas metodologías no aportan ninguna información sobre dos efectos dañinos de los contaminantes en la biota (Lam y Gray, 2003). Así pues, el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes, en combinación con análisis químicos, se ha convertido en la metodología más relevante para la evaluación de la calidad ambiental.

Los programas de monitoreo se han utilizado internacionalmente en un intento de controlar la presencia de xenobióticos en la naturaleza y evaluar sus posibles impactos. Así, la aplicación de los biomarcadores (como respuestas fisiológicas a xenobióticos en los organismos) en programas de monitoreo se considera especialmente útil para la monitorización de efectos, la evaluación de las tendencias en el tiempo y/o para descubrir nuevas fuentes de contaminación.

1.3.1.4. Ventajas del empleo de biomarcadores en Evaluación del Riesgo Ambiental

El análisis de biomarcadores presenta una serie de ventajas frente al monitoreo químico (McCarthy y Shugart, 1990; van der Oost *et al.*, 2005) destacando:

- (I) Los biomarcadores integran toda una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos derivados de la exposición al contaminante.
- (II) Representan no sólo la exposición sino la biodisponibilidad y toxicidad intrínseca de los contaminantes.
- (III) Los biomarcadores representan también efectos de compuestos que no se bioacumulan o que son rápidamente metabolizados o eliminados pero cuyos metabolitos derivados, a veces son mucho más tóxicos.

- (IV) Se pueden utilizar tanto en campo como en laboratorio. Los ensayos de toxicidad son difícilmente extrapolables a la situación real en el campo debido fundamentalmente a los problemas inherentes a la exposición que es mucho más variable en el campo.
- (V) El uso de biomarcadores permite establecer conexiones entre los ensayos en laboratorio y la situación real en campo ya que las muestras analizadas en el campo proporcionan medidas de los contaminantes que están biológicamente disponibles en el escenario real de exposición.

El uso de los biomarcadores en la evaluación del riesgo ambiental proporciona la integración de toda una serie de mecanismos bio-químicos y fisiológicos que permiten una mayor interpretación holística del daño ambiental, permitiendo priorizar en esquemas de monitoreo y estrategias para la intervención o remediación.

1.3.2. Biotransformación de xenobióticos

La *biotransformación* o metabolismo es el proceso por el que un xenobiótico lipofílico es transformado en otras formas polares de mayor solubilidad en agua y más fácilmente excretables (Lech y Vodick, 1985). Generalmente se trata de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por una serie limitada de enzimas que forman parte de las rutas metabólicas de los organismos.

No obstante, el metabolismo de un compuesto xenobiótico puede resultar beneficioso para el organismo (*detoxificación*) o perjudicial, en otras muchas ocasiones, cuando se generan metabolitos intermediarios más electrofílicos y más tóxicos que los de partida, fenómeno conocido como *activación metabólica* (Buhler y Williams, 1988).

Las enzimas encargadas de la biotransformación se han dividido tradicionalmente en dos subgrupos: las enzimas de Fase I y las enzimas de Fase II (Williams, 1959).

Enzimas de Biotransformación de Fase I: Introducen en el xenobiótico grupos polares (-OH, -COOH, -SH, -NO₂) por oxidación, reducción, hidrólisis o hidratación, resultando un metabolito más hidrofílico y menos activo que será conjugado en la Fase II (Fig 1.2.)

Muchas de estas reacciones de fase I son de monooxigenación donde un átomo de oxígeno del oxígeno molecular (O₂) es transferido al sustrato y el otro es reducido a H₂O. Las más abundantes dependen de citocromos P450 (las denominadas monooxigenasas dependientes del citocromo P450 –CYPs) donde el poder reductor suele proceder del NADPH siguiendo la reacción:

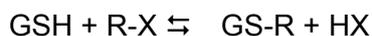
Introducción



Las CYPs comprenden una gran superfamilia de hemoproteínas que metabolizan un amplio rango de sustratos hidrofóbicos endógenos (esteroides, hormonas esteroideas, vitaminas liposolubles, prostaglandinas, ácidos grasos) y exógenos (PAHs, PCBs) (Timbrell, 2001).

Enzimas de Fase II de biotransformación: En la fase II el grupo polar del xenobiótico o su metabolito es conjugado con moléculas endógenas también muy polares (como el glutatión, aminoácidos, ácido glucurónico, grupos sulfato, metilo o acetilo), dando lugar a compuestos menos hidrofóbicos que son más fácilmente excretados (Fig 1.2.).

La enzima de Fase II Glutatión-S-Transferasa (GST, EC 2.5.1.18) cataliza la conjugación del glutatión reducido (MacRae *et al.*, 1989) con diferentes moléculas electrofílicas hidrofóbicas del siguiente modo:



Donde R es un radical alifático, aromático o heterocíclico y X halógeno, sulfato, nitrito o epóxido.

La GST juega un papel clave en la defensa celular frente a daños oxidativos y productos peroxidativos de ADN y lípidos (Van der Oost *et al.*, 2003).

Recientemente se han añadido dos fases más al proceso de biotransformación, son las denominadas **Fase 0 y fase III**, estas fases se llevan a cabo por transportadores de membrana que modulan la entrada y salida, respectivamente de los xenobióticos no modificados o ya metabolizados (Fig 1.2.) (Szakacs *et al.*, 2008).

Éste grupo de transportadores de membrana está relacionado con el denominado mecanismo de resistencia multixenobiótico (MXR) que consiste en una estrategia de defensa para la protección de organismos frente a compuestos endógenos y exógenos mediante su reconocimiento y eliminación directa a través de la membrana y por tanto para la prevención de su acumulación y efectos citotóxicos (Szakacs *et al.*, 2008; Van der Oost *et al.*, 2003).

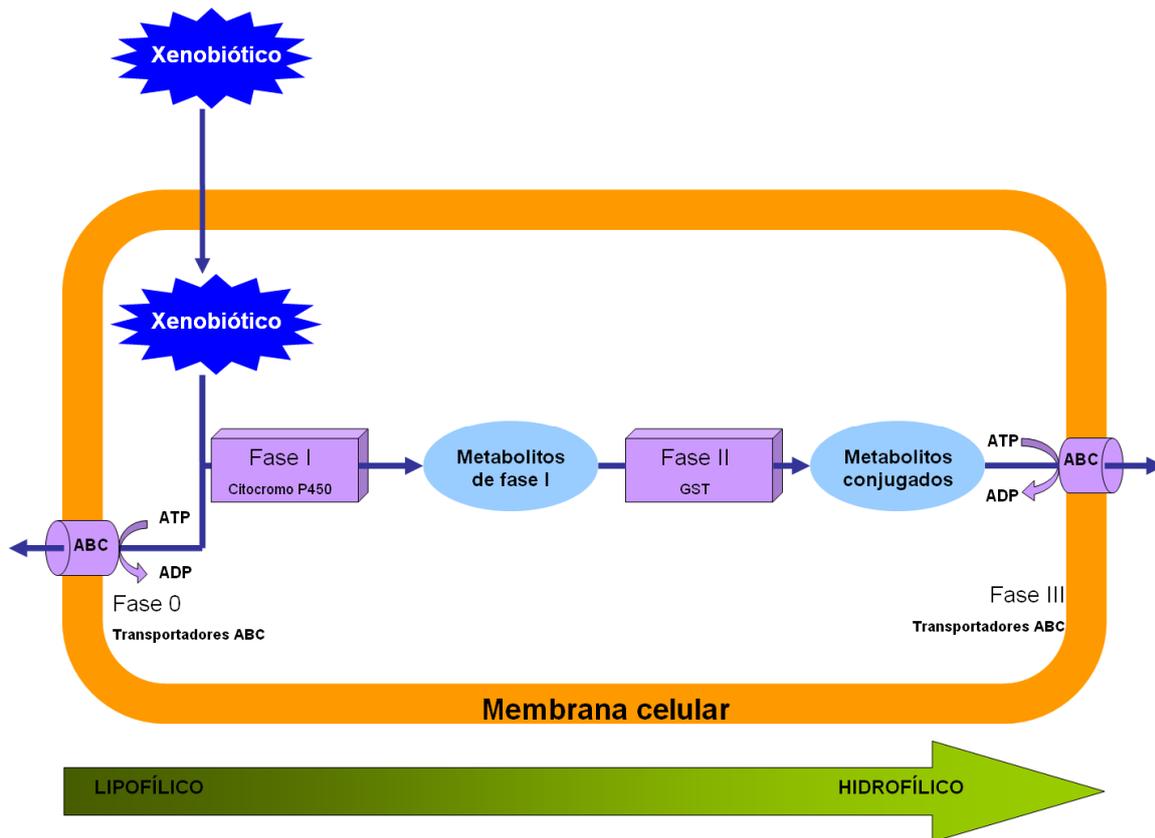


Figura 1.2. Esquema del metabolismo xenobiótico (Faria, 2011).

1.3.3. Estrés oxidativo

1.3.3.1. Especies reactivas de oxígeno

Un radical libre es una molécula (o fragmento de la misma) que ha ganado o perdido un electrón. Al poseer un electrón desapareado en su orbital externo, tiene gran avidez por captar electrones de su entorno o ceder el electrón desapareado.

En los organismos vivos existen moléculas que, sin ser radicales libres, reaccionan con otras moléculas para dar lugar a éstos. Un ejemplo es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que por la reacción de Fenton con metales de transición da lugar al radical hidroxilo (OH^\bullet) que es altamente reactivo.

El conjunto de intermediarios reactivos, parcialmente reducidos y altamente inestables es conocido como *Especies Reactivas de Oxígeno-ROS (Reactive Oxygen Species)* (Vioque-Fernández *et al.*, 2007) (Tabla 1.1.)

Introducción

Tabla 1.1. Principales especies reactivas de oxígeno

Especies Reactivas de Oxígeno (Vioque-Fernández <i>et al.</i> , 2007)	
OH [•]	Radical hidroxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
LO [•]	Radical alcoxil lipídico
LOO [•]	Radical peroxil lipídico
¹ O ₂	Oxígeno singlete
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido

1.3.3.2. Fuentes de ROS

Los ROS se generan de forma *natural* en el **metabolismo aeróbico de las células**.

La mitocondria es la principal fuente de radicales libres dentro de las células.

Los organismos aerobios utilizan la reducción de la forma molecular mayoritaria del oxígeno (O₂) como fuente de energía que se almacena en forma de adenosín trifosfato (Sarkar *et al.*, 2008). Estas moléculas proveen de energía a la mayor parte de los procesos celulares incluyendo reacciones biosintéticas y la división celular.

El proceso de la respiración celular implica la reducción tetravalente del oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O) en la cadena de transporte mitocondrial. Esta reducción se lleva a cabo a través de cuatro pasos de los cuales deriva la formación de *especies reactivas de oxígeno* (Di Giulio *et al.*, 1995; Vioque-Fernández *et al.*, 2007) (Fig.1.3.)

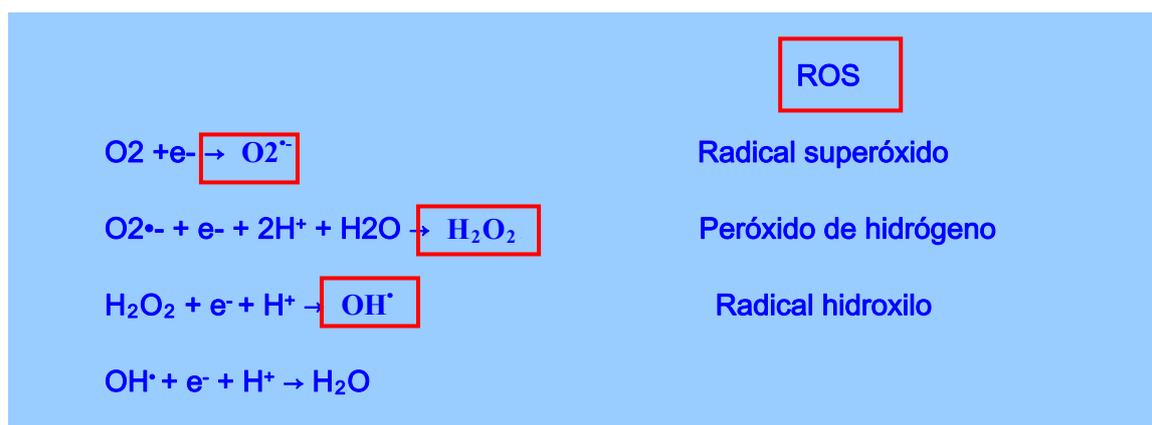


Figura. 1.3. Especies reactivas de oxígeno derivadas del proceso de respiración celular (Vioque-Fernández *et al.*, 2007).

Se estima que entre un 1 y un 3% del oxígeno consumido en la respiración celular es convertido en especies reactivas de oxígeno (Livingstone, 2003). Los xenobióticos constituyen una de las fuentes que generan ROS y otros radicales libres pro-oxidantes de *origen antropogénico* entre los que cabe destacar algunos contaminantes orgánicos (por ejemplo las quinonas, nitroaromáticos, nitroaminas), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los bifenilos policlorados (PCBs), las dioxinas, los metales, contaminantes aéreos (NO_2 , O_3 , SO_2), peróxidos, la radiación-UV y la hipoxia e hiperoxia, entre otros (Di Giulio *et al.*, 1995; Halliwell y Gutteridge, 1999; Stohs y Bagghi, 1995).

Determinados xenobióticos son capaces de inhibir la cadena de transporte de electrones, permitiendo la acumulación de los radicales intermedios, inactivar o reducir las enzimas antioxidantes. Otros xenobióticos como las quinonas, metales de transición y compuestos nitroaromáticos son capaces de inducir estrés oxidativo como resultado de un ciclo redox, con enzimas como la xantina oxidasa y el citocromo P-450 dependiente de NADPH. En este proceso el xenobiótico es reducido por un electrón donado por el NADPH, transformándose en un intermediario o especie reactiva que al intentar recuperar su configuración original transfiere su electrón no apareado al oxígeno, reduciéndolo al anión superóxido (Livingstone, 1991).

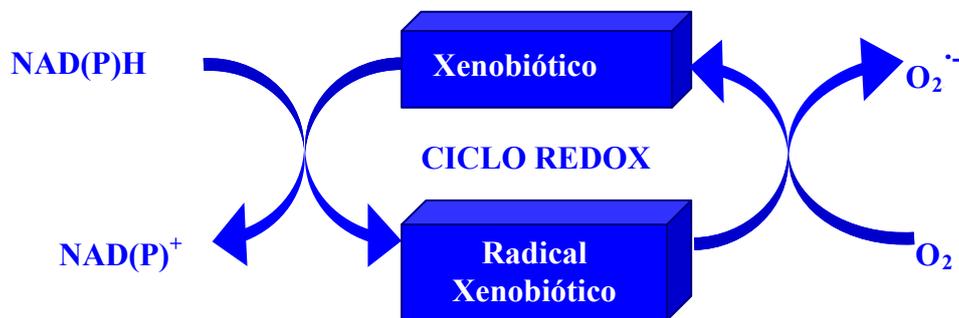


Figura 1.4. Producción de ROS consecuencia del Ciclo Redox inducido por la presencia de xenobióticos

Elevadas dosis de ROS, si no son eliminadas apropiadamente por las defensas antioxidantes de la célula, son capaces de reaccionar con macromoléculas biológicas y producir inactivación de proteínas (y por tanto, enzimas), peroxidación de los lípidos de membrana y daños en el ADN (tales como la hidroxilación, apertura de los anillos y fragmentación), pudiendo incluso llegar finalmente a la muerte celular (Winston y Digiulio, 1991). En el caso de los organismos acuáticos, diversos estudios han demostrado la existencia de un vínculo directo del incremento de producción de ROS y el efecto tóxico derivado de la exposición a contaminantes de origen antropogénico (Di Giulio *et al.*, 1995; Livingstone, 1991; Livingstone, 2003).

Introducción

1.3.3.3. Balance pro-oxidante/anti-oxidante

Los organismos aerobios han desarrollado sistemas de defensa antioxidantes para prevenir o reducir la formación de ROS que incluyen procesos como la inactivación enzimática de compuestos derivados del ciclo redox, metabolismos enzimáticos de ROS que derivan en productos no tóxicos como el agua y el oxígeno molecular, moléculas que secuestran radicales libres y proteínas que se unen a metales de transición que podrían reaccionar con los ROS resultando en especies reactivas de oxígeno más dañinas aún.

Las defensas antioxidantes están formadas por sistemas enzimáticos entre los cuales se encuentra la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) así como por moléculas de bajo peso molecular como la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y el glutatión reducido (Livingstone, 2003; MacRae *et al.*, 1989). También se incluye a proteínas de fase II como el Glutatión S transferasa que conjuga peróxidos orgánicos (Hayes y Pulford, 1995; Ketterer *et al.*, 1983) y metalotioneínas por su capacidad de agregar metales de transición (Amiard *et al.*, 2006) (Fig 1.5).

Una perturbación en el balance entre las condiciones *pro-oxidantes* (producción de radicales libres y agentes prooxidantes) y los mecanismos de defensa *antioxidantes* (o la capacidad antioxidante de un organismo) conduciría al denominado **estrés oxidativo**, condición en la que se incrementa la producción de radicales libres y decrecen los niveles antioxidantes llevando al deterioro y daño potencial a diferentes niveles celulares (Winston y Digiulio, 1991).

Se sabe que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patología de muchas enfermedades humanas como la arteriosclerosis, la fibrosis pulmonar y los daños neurodegenerativos, incluso el cáncer (Halliwell y Gutteridge, 1999)

El análisis y cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños generados por las condiciones de estrés oxidativo en sistemas biológicos se puede usar para la evaluación de los efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes ambientales (Ferreira *et al.*, 2005; Valavanidis *et al.*, 2006).

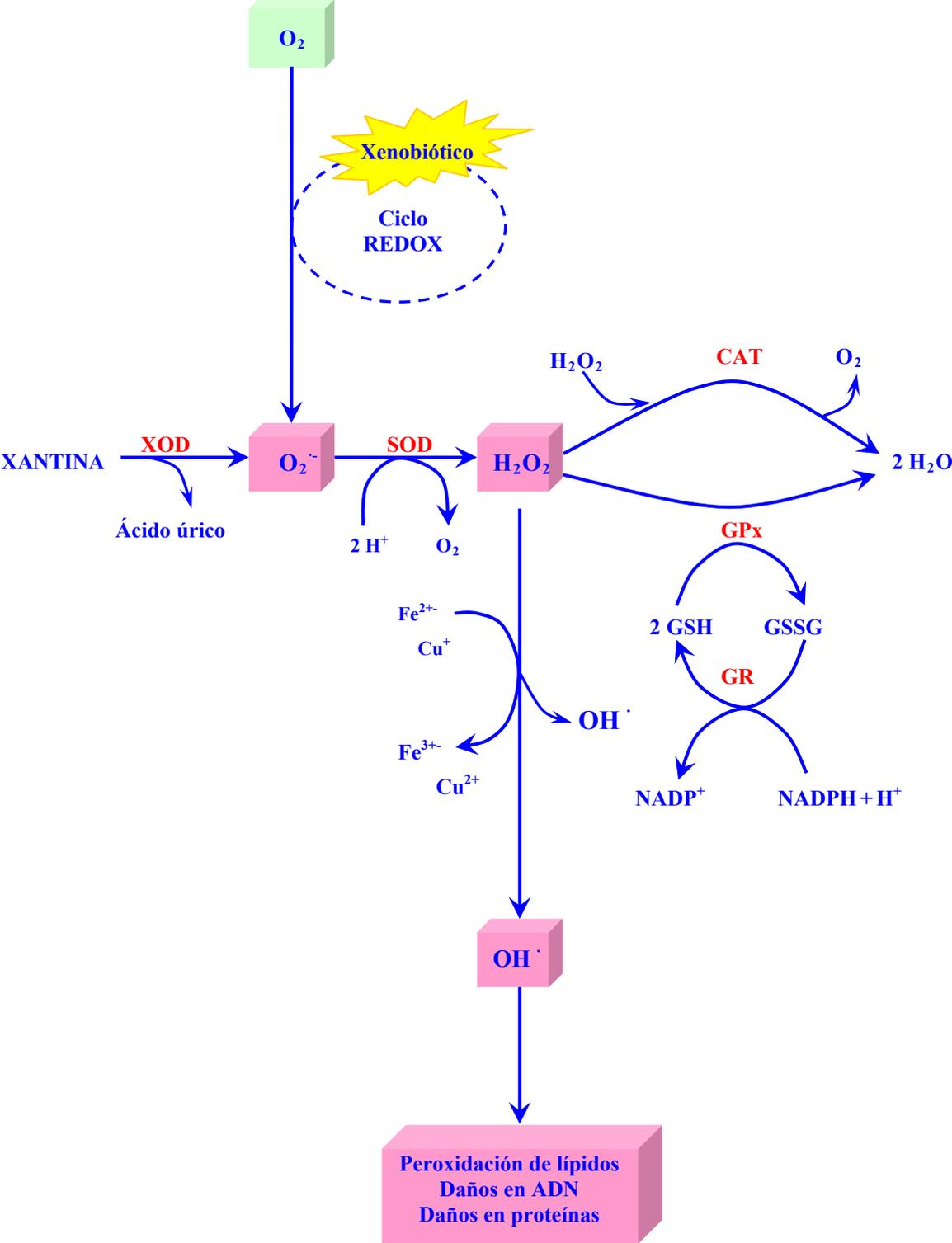


Figura 1.5. Esquema de los agentes pro-oxidantes y antioxidantes

Introducción

1.3.4. Biomarcadores de estrés oxidativo

1.3.4.a. Sistemas enzimáticos antioxidantes

La **superóxido dismutasa** (SOD, EC 1.15.1.1) es una metaloproteína que facilita la dismutación de dos radicales superóxido para formar peróxido de hidrógeno que podrá ser posteriormente eliminado por la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (GPx) (Fig 1.5). Se han identificado dos isoformas de la SOD, una de ellas que se encuentra en el citoplasma y en los nucleolos (Cu/Zn-SOD) y otra de ellas que se encuentra en la matriz mitocondrial (la Mn-SOD) (Stegeman *et al.*, 1992).

La **catalasa** (CAT, EC 1.11.1.6) es un tetrámero que se localiza en orgánulos subcelulares como los peroxisomas y cataliza la descomposición de dos moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2) (Fig 1.5). La CAT está involucrada también en el metabolismo de ácidos grasos (Fridovich, 1978; Stegeman *et al.*, 1992).

La **glutatión peroxidasa** (GP_x, EC 1.11.1.9) se encarga de la detoxificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxidos orgánicos (producidos por ejemplo por la peroxidación lipídica).

La principal GPx conocida en animales es la enzima citosólica tetramérica selenio-dependiente (GPx-Se) que cataliza el metabolismo del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua (H_2O) empleando el GSH como cofactor, mediante la oxidación de la forma reducida del glutatión a su forma oxidada (GSSG) (MacRae *et al.*, 1989) (Fig 1.5).

Otras peroxidases reducen hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes (por ejemplo ROOH a ROH), mecanismo de considerable importancia debido a su función de protección de las membranas frente a la peroxidación (Lawrence y Burk, 1976; Stegeman *et al.*, 1992; Van der Oost *et al.*, 2003).

La actividad de las GPx se encuentra acoplada a la **glutatión reductasa** (GR, EC 1.6.4.2), que cataliza la transformación de la forma oxidada del glutatión (GSSG) a su forma reducida (MacRae *et al.*, 1989) con la consiguiente oxidación del NADPH a $NADP^+$ (Fig 1.5). Por lo que la GR, a pesar de no tratarse estrictamente de una defensa antioxidante como las enzimas mencionadas anteriormente, merece especial atención debido a su importancia en el mantenimiento de la homeostasis GSH/GSSG (Winston y Digiulio, 1991).

La **Glutatión-S-transferasa (GST)** aunque no es una peroxidasa presenta actividad peroxidativa, mediante el empleo de glutatión reducido (MacRae *et al.*, 1989) en la reducción de un amplio rango de hidroperóxidos orgánicos. De ahí su importancia especialmente en los organismos deficientes de selenio (Lawrence y Burk, 1976; Stegeman *et al.*, 1992).

1.3.4.b. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

El **glutati3n reducido** (Y-L-glutamyl-L-cisteinylglycine, GSH) es un trip3ptido compuesto por 3cido glut3mico, ciste3na y glicina. La presencia de ciste3na le confiere un grupo sulfhidrilo (SH) nucle3filo que permite reaccionar con intermediarios electrof3licos.

El GSH participa en una amplia variedad de reacciones de s3ntesis, reducci3n, oxidaci3n, conjugaci3n, etc. y juega un papel muy importante en la defensa celular mediante dos tareas fundamentales de detoxificaci3n: (I) actuando como conjugado de intermediarios electrof3licos, principalmente v3a GST (en la fase II del metabolismo de xenobi3ticos) y (II) como un agente antioxidante (Stegeman *et al.*, 1992). En su funci3n antioxidante el GSH puede actuar como atrapador independiente de radicales libres o como un cofactor para la glutati3n peroxidasa (GPx) que cataliza la transformaci3n de la forma tiol reducida (MacRae *et al.*, 1989) a una forma oxidada (GSSG) donde los dos trip3ptidos est3n unidos por un puente disulfuro.

El GSH es un antioxidante intracelular cr3tico debido a su relativa abundancia y capacidad para ciclar r3pidamente entre la forma reducida (MacRae *et al.*, 1989) y oxidada (GSSG). La mayor parte del glutati3n intracelular se encuentra en su forma reducida (como GSH). El balance entre GSH y GSSG se mantiene a trav3s de un r3pido reciclaje del GSSG a GSH v3a glutati3n reductasa (GR).

Durante periodos de estr3s oxidativo el GSH elimina el exceso de radicales libres intracelulares y por oxidaci3n del grupo tiol de su residuo de ciste3na se oxida a GSSG mediante la acci3n de la GPx. Posteriormente se vuelve a convertir a GSSG v3a glutati3n reductasa (GR) (Fig 1.5).

En condiciones normales, el ratio intracelular entre las formas reducida y oxidada (GSH/GSSG) del glutati3n es muy alto y una alteraci3n en este ratio se considera un indicador de da3o oxidativo (Pastore *et al.*, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003).

Introducción

1.3.5. Biomarcadores de daños oxidativos

Fallos en las defensas antioxidantes para detoxificar el exceso de producción de ROS conducen a una situación de estrés oxidativo que puede desencadenar efectos dañinos a nivel macromolecular y a la pérdida de función celular (Livingstone, 2003). Así, los daños en proteínas y ADN o la peroxidación lipídica (LPO) son considerados índices bioquímicos de daños generados bajo condiciones de estrés oxidativo.

La peroxidación lipídica (LPO) es una consecuencia del estrés oxidativo ampliamente estudiada y conocida. El proceso de peroxidación lipídica (u oxidación de ácidos grasos poliinsaturados) consiste en una oxidación autocatalítica que se inicia con la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-) en el ácido graso poliinsaturado (LH) de las membranas celulares (formadas en su mayor parte por lípidos) para producir radicales lipídicos (L[•]). Estos radicales reaccionan con el oxígeno molecular para producir radicales peróxilos (LOO[•]) que continúan reaccionando con otros lípidos para producir más radicales lipídicos (perpetuando la reacción) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (Gutteridge y Halliwell, 1990; Van der Oost *et al.*, 2003). Las membranas celulares sufren como consecuencia de esta cadena de reacciones una degradación oxidativa.

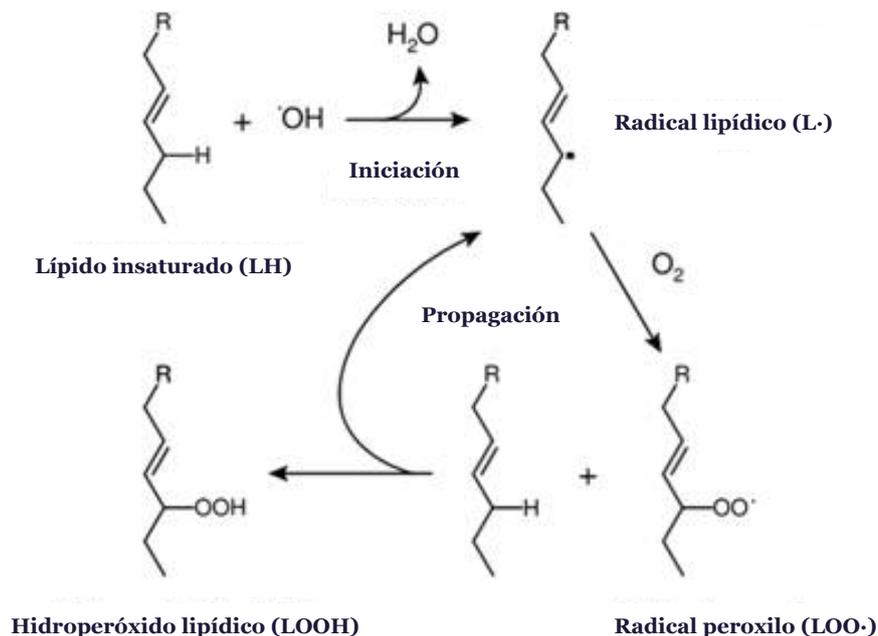


Figura. 1.6. Esquema de la peroxidación de lípidos

El daño oxidativo en lípidos viene causado directamente por los peróxidos o por otros productos derivados de su descomposición más reactivos y tóxicos como son los

epóxidos lipídicos, cetonas y aldehídos siendo el malondialdehído (MDA) el más conocido (Leibovitz y Siegel, 1980). Estos productos secundarios de la LPO son altamente tóxicos siendo capaces de inactivar enzimas, reaccionar con grupos específicos de proteínas e incluso actuar como agentes mutágenos, hecho que puede conducir a la inestabilidad de la membrana (alterando su cohesión, fluidez, permeabilidad, función metabólica) y consecuente daño y muerte celular (Rikans y Hornbrook, 1997).

El **malondialdehído (MDA)** es un producto muy bien caracterizado de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Algunas de las técnicas más comúnmente utilizadas para cuantificar peroxidación lipídica en muestras se basan en el empleo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) que cuantifican los niveles de producción de malondialdehído (Leibovitz y Siegel, 1980).

Debido a la alta tasa de producción de ROS en la cadena de transporte mitocondrial, la mitocondria se encuentra especialmente afectada por el daño oxidativo. La **lipofuscina** es una molécula de desecho celular que resulta principalmente de la oxidación de ácidos grasos en las membranas mitocondriales y su acumulación se emplea también en la cuantificación de los daños en lípidos por estrés oxidativo (Gray y Woulfe, 2005).

Daños en el ADN

El ADN es otro componente celular particularmente susceptible a los daños causados por los ROS (Cerutti, 1985).

La oxidación del ADN tiene su origen en alteraciones químicas provocadas en las bases y azúcares al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el OH. Estas modificaciones químicas provocan alteraciones estructurales del ADN y en muchos casos, la ruptura de la cadena de ADN a través de mecanismos perfectamente definidos (Cadet *et al.*, 1997). Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se pueden producir mutaciones, cáncer o la muerte celular (Cerutti, 1985).

La detección de fragmentos rotos de ADN es un método comúnmente utilizado como bioindicador de estrés oxidativo y genotoxicidad en el organismo, que refleja los daños oxidativos en el ADN que pueden ser causados directamente por sustancias tóxicas, xenobióticos (o sus metabolitos) o indirectamente a través de daños estructurales (Shugart *et al.*, 1992).

Introducción

Daños en las proteínas

Los radicales libres también son capaces de oxidar las cadenas de aminoácidos que forman las proteínas (Stadtman, 1992), provocando alteraciones en su conformación espacial y por tanto en su función. Las proteínas de membrana (canales iónicos, receptores, etc.) y las proteínas estructurales y enzimáticas son objeto de éste tipo de daños.

El proceso de carboxización de las proteínas, debido a su naturaleza irreversible e irreparable, constituye uno de los más importantes daños ocasionados por los ROS (Nystrom, 2005), y su acumulación en tejidos y órganos representa uno de los índices de oxidación de proteínas más estudiados.

1.3.6. Biomarcadores de neurotoxicidad

Las B-esterasas representan un amplio grupo de serina-hidrolasas que incluye las colinesterasas (ChEs) y las carboxilesterasas (CbEs) (van der Oost *et al.*, 2005).

Las colinesterasas (ChEs) son enzimas hidrolasas ubicuas bastante conocidas y definidas (Thompson y Walker, 1994) cuya función fisiológica es eliminar la acetilcolina de la hendidura sináptica.

La Acetilcolinesterasa (AChE EC 3.1.1.7) regula la transmisión del impulso nervioso en vertebrados e invertebrados mediante la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina a colina y ácido acético (Thompson y Walker, 1994; Van der Oost *et al.*, 2003) del siguiente modo:



Su inhibición está directamente relacionada con el mecanismo de toxicidad de los pesticidas organofosforados (OPs) y carbamatos (CBs), a través de la unión reversible o irreversible al sitio catalítico de la enzima y la fosforilación de ésta. Esta inhibición provoca la acumulación de acetilcolina, induciendo una sobrestimulación de las fibras nerviosas y musculares que puede derivar en la parálisis e incluso la muerte. Por lo que el correcto funcionamiento de la AChE es vital para el funcionamiento normal de los sistemas sensoriales y neuromusculares (O'Brien, 1960; Van der Oost *et al.*, 2003). El estudio de la inhibición de la AChE emergió originalmente como una herramienta de diagnóstico en biomedicina, para pasar posteriormente al ámbito de la investigación en campo y laboratorio con vertebrados e invertebrados, como indicador de exposición a insecticidas organofosforados y carbamatos.

Además de la Acetilcolinesterasa (AChE) que utiliza la acetilcolina como substrato específico, se han reconocido otros tipos de ChEs que son esterasas no específicas (o

pseudoesterasas) que son afines a butirilcolina (**Butirilcolinesterasas, BChE**) y a la propinilcolina (**Propionilcolinesterasa, PrChE**) (Sturm *et al.*, 2000; Thompson y Walker, 1994).

La Carboxilesterasa (EC 3.1.1.1, CbE)

La CbE es otro tipo de esterasas dependiente de serina que hidroliza un amplio rango de ésteres endógenos y exógenos (Maxwell, 1992; Parkinson, 1996). Proporcionan protección frente a organofosfatos y carbamatos mediante dos mecanismos: (I) mediante la hidrólisis de los enlaces ésteres de los organofosfatos y carbamatos y (II) mediante la fosforilación estequiométrica con la resultante destrucción del oxón carbamato (Escartín y Porte, 1997; Walker *et al.*, 2001).

La actividad carboxilesterasa (CbE) en moluscos bivalvos presenta una gran sensibilidad a los compuestos organofosforados por lo que se ha reconocido como un importante biomarcador para la evaluación de la exposición de los bivalvos a compuestos neurotóxicos (Escartín y Porte, 1997).

1.4. Moluscos bivalvos como organismos centinela

En los procesos de Evaluación de Riesgo Ambiental la selección correcta de las especies de estudio constituye una parte fundamental a la que hay que prestar especial atención. Ésta selección generalmente responde a las siguientes condiciones:

- La distribución y naturaleza del contaminante
- La importancia ecológica y económica
- Abundancia y susceptibilidad
- Existencia de trabajos previos
- Sensibilidad

Los organismos acuáticos que habitan o se cultivan en ríos y en las zonas costeras están constantemente expuestos a una amplia variedad de contaminantes de origen antropogénico (procedentes de la industria, agricultura o efluentes urbanos). Como consecuencia, estos organismos han desarrollado mecanismos de defensa frente a la contaminación de xenobióticos basados en la biotransformación y detoxificación de estos compuestos. Estas circunstancias les convierten en indicadores potenciales de la contaminación de las zonas donde habitan y por tanto en organismos idóneos para ser utilizados como organismos centinela. Así pues, las respuestas bioquímicas en moluscos bivalvos se han utilizado en múltiples estudios mediante el estudio de biomarcadores que permiten evaluar el impacto de actividades antropogénicas en el medio (Cajaraville *et al.*, 2000; Zanette *et al.*, 2006; Zanette *et al.*, 2008).

Introducción

Debido a su naturaleza sésil, su alimentación filtradora y su bajo metabolismo los bivalvos son capaces de concentrar contaminantes en sus tejidos hasta llegar a niveles muy por encima de los presentes en el medio donde habitan (se han encontrado niveles 10^2 a 10^5 superiores respecto a la concentración en agua; Sunila, 1987). Presentan una amplia distribución debido a la condición osmoconformista de los moluscos (Pierce y Greenber, 1972). Los bivalvos en particular, pueden ser extremadamente eurihalinos debido a su capacidad para cerrar las valvas ante cambios de salinidad (Davenport, 1985; Willmer, 1978).

Todas estas propiedades convierten a los moluscos bivalvos en uno de los grupos de organismos acuáticos más estudiados en programas de biomonitorización en áreas contaminadas por metales pesados, aguas residuales, pesticidas y compuestos orgánicos (Akcha *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2002; Camusso *et al.*, 2001; Lafontaine *et al.*, 2000; Lionetto *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 1999; Najimi *et al.*, 1997; Regoli y Principato, 1995; Ricciardi *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2001; Viarengo y Canesi, 1991; Walker y Livingstone, 1992; Zanette *et al.*, 2006), así como en estudios toxicológicos (Binelli *et al.*, 2006; Corsi *et al.*, 2003; Monserrat *et al.*, 2002; Valbonesi *et al.*, 2003).

1.4.1. La Ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) como bioindicador de contaminación de ecosistemas acuáticos

1.4.1.a. Características generales de *C.gigas*

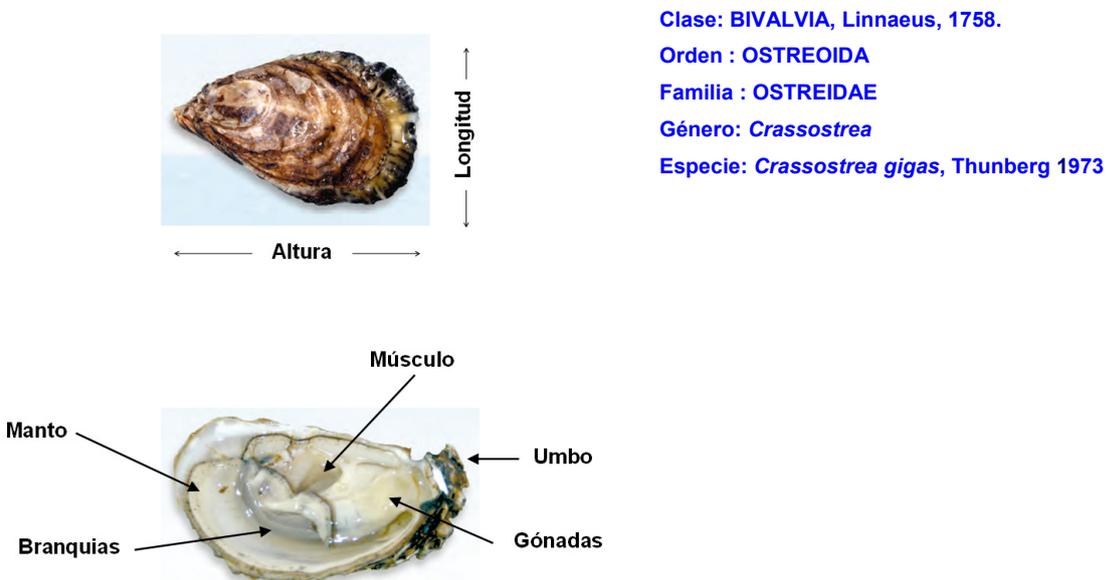


Figura 1.7. Anatomía de *Crassostrea gigas*

Es una especie estuarina, de naturaleza sésil con preferencia por sustratos firmes (desde la zona intermareal hasta profundidades de 40m), aunque también puede

encontrarse en fondos arenosos y lodosos. Su rango óptimo de salinidad es de 20-25 ‰ aunque puede sobrevivir a salinidades inferiores a 15 ‰ y superiores a 44 ‰ (Nell y Holliday, 1988). Por otro lado tolera un amplio rango de temperaturas que van desde -2 a 35°C (FAO©, 2005). La ostra es hermafrodita protándrico y en la fase juvenil se encuentran mayoritariamente como machos aunque más adelante en su ciclo pueden transformarse en hembras. La proporción de machos y hembras en su fase adulta depende principalmente de la disponibilidad de alimento, siendo mayor la proporción de hembras cuando hay buena disponibilidad de alimento y mayor proporción de machos cuando escasean los alimentos (por ejemplo en situaciones de hacinamiento) (FAO©, 2005).

Las condiciones óptimas para el inicio de la gametogénesis son de 10°C y salinidades entre 15 y 32 ‰. El desove ocurre a temperaturas superiores a los 20°C. Las hembras (de unos 8-15cm) producen entre 50 y 200 millones de huevos en un solo desove. Las larvas son planctónicas y se distribuyen a través de la columna de agua (Fig, 1.8.).

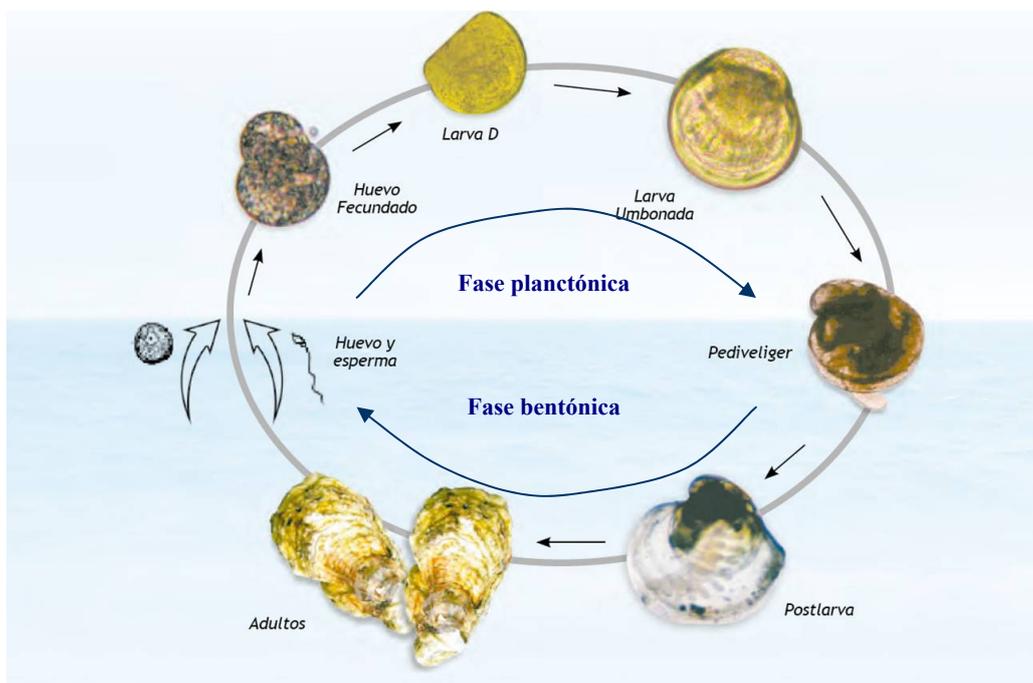


Figura. 1.8. Ciclo de vida de *Crassostrea gigas*

Entra en la fase bentónica en su estado de pedivelígera y utiliza su pié larval en búsqueda de una ubicación apropiada para fijarse cuando alcanza unas 300-340 µm, adhiriéndose permanentemente al sustrato mediante la secreción de un cemento en la glándula del pié. Este proceso suele durar unas dos – tres semanas dependiendo de la temperatura del agua, la salinidad y la disponibilidad de alimentos. Una vez asentados los ostrones se transforman en juveniles. La tasa de crecimiento es muy rápida cuando

Introducción

se dan condiciones óptimas de temperatura, salinidad y alimento, y alcanzan su tamaño de mercado entre los 18 y 30 meses (FAO©, 2005).

Presenta una amplia distribución llegando a ser la ostra más cultivada de todo el mundo (Zanette *et al.*, 2008) (Fig 1.9.)

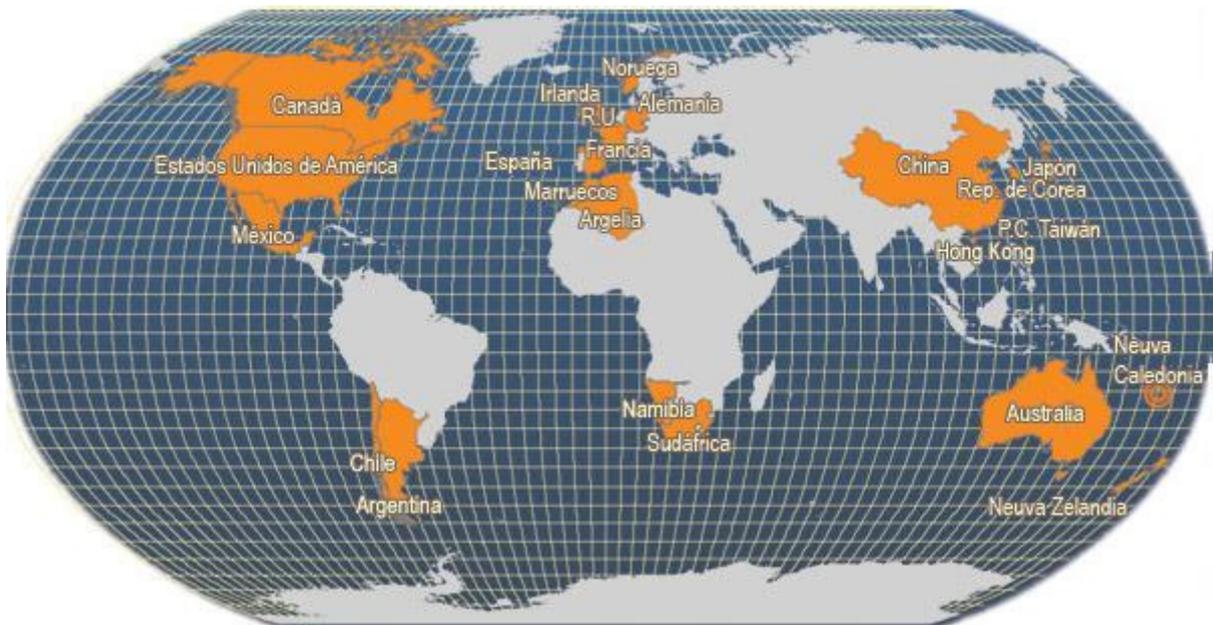


Figura. 1.9. Principales países productores de *C. gigas* (extraído de www.fao.org)

Su naturaleza sésil y filtradora mantiene a la ostra en constante contacto con los contaminantes que puedan coexistir en el agua donde habita.

Su amplia distribución, su importancia ecológica y económica junto con su sensibilidad potencial a los contaminantes presentes en el medio donde habita (por su naturaleza sésil y filtradora) convierten a la ostra en un organismo idóneo para la monitorización de contaminantes en costas y estuarios.

Existen numerosos trabajos previos de monitoreo con ostra - *C. gigas* (Buisson *et al.*, 2008; Geffard *et al.*, 2001; Geffard *et al.*, 2002; Luna-Acosta *et al.*, 2010; Luna-González *et al.*, 2008; Shulkin *et al.*, 2003; Zanette *et al.*, 2008) junto con estudios dedicados al análisis de respuestas bioquímicas a contaminantes particulares y/u otros factores ambientales (Anguiano *et al.*, 2010; Bocquené *et al.*, 1997; Buisson *et al.*, 2008; Collin *et al.*, 2011; Damiens *et al.*, 2004; Zanette *et al.*, 2011).

1.4.1. b. El problema de la mortalidad masiva de *C. gigas*

El cultivo de la ostra se enfrenta anualmente a un grave problema derivado de la mortalidad masiva que se dan en las poblaciones juveniles durante los meses más cálidos del año. La relevancia tanto ecológica como económica de estos hechos ha derivado en un especial interés por su estudio en las últimas décadas. Los episodios de alta mortalidad se repiten anualmente coincidiendo con periodos de elevadas temperaturas del agua, bajo oxígeno disuelto y alta productividad primaria propios de los meses cálidos (primavera-verano).

El primer episodio del que se tiene constancia data de 1945 en la costa Pacífica japonesa y se denominó “mortalidad de verano”. En aquel momento se concluyó que la mortalidad fue debida a un “desorden fisiológico y una perturbación metabólica derivada de la sobremaduración de las gónadas y un desove masivo bajo altas temperaturas y condiciones de eutrofización (Koganezawa, 1974). Desde entonces se han observado episodios de mortalidad de ostras en Japón, EEUU, Francia, Irlanda, Reino Unido, Italia, Portugal y España.

Las causas de la mortalidad masiva de la ostra aún no se han aclarado con certeza pero varios estudios apuntan a una combinación de una serie de factores de riesgo entre los que se incluyen las temperaturas elevadas del agua (Brown y Hartwick, 1988; Gouletquer *et al.*, 1998), descenso de oxígeno disuelto en el agua (Cheney *et al.*, 2000), descensos de salinidad (Brown y Hartwick, 1988; Luna-González *et al.*, 2008; Nell y Holliday, 1988), alteraciones fisiológicas y metabólicas (Maurer y Comps, 1986; Mori, 1979; Perdue *et al.*, 1981; Soletchnik *et al.*, 2005), procesos de sobremaduración de gónadas (Perdue *et al.*, 1981), eutrofización, (Cho y Kim, 1977; Malham *et al.*, 2009) y causas de origen patogénico (Cheney *et al.*, 2000; Cho y Kim, 1977; Lacoste *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2002). También existe una variabilidad genética demostrada en *C. gigas* de diferentes orígenes, en cuanto a su capacidad de resistencia frente a infecciones patógenas y mortalidad (Soletchnik *et al.*, 2005).

Considerando todo esto conjuntamente, los estudios indican que la mayor parte de la mortalidad masiva de la ostra no se puede explicar por un único factor, sino que más bien se trata de la combinación de parámetros ambientales (abióticos) y bióticos (genéticos, fisiológicos e inmunológicos) (Soletchnik *et al.*, 2005).

Introducción

1.5. Localización del estudio

1.5.1. El Delta del Ebro

El Delta del Ebro (Fig. 1.10.) está situado al noreste de España y al sur de Cataluña y se trata de una estructura dinámica y compleja originada a partir de los sedimentos aluviales transportados por el río Ebro hasta su desembocadura.

El Delta es un ecosistema de gran valor natural y económico. Está constituido por una superficie de 32.000 ha emergidas de las cuales un 25% (7.736 ha) están protegidas como Parque Natural desde 1986. Se considera la segunda zona húmeda española en importancia para las aves acuáticas (Mañosa *et al.*, 2001). La Directiva de Hábitats de la Unión Europea ha catalogado como Lugar de Interés Comunitario los espacios de Interés Natural del delta (unas 11.500 ha) (Damasio *et al.*, 2010), pasando a formar parte de la red Natura 2000, establecida con el fin de garantizar la conservación de los hábitats naturales más destacados del continente.

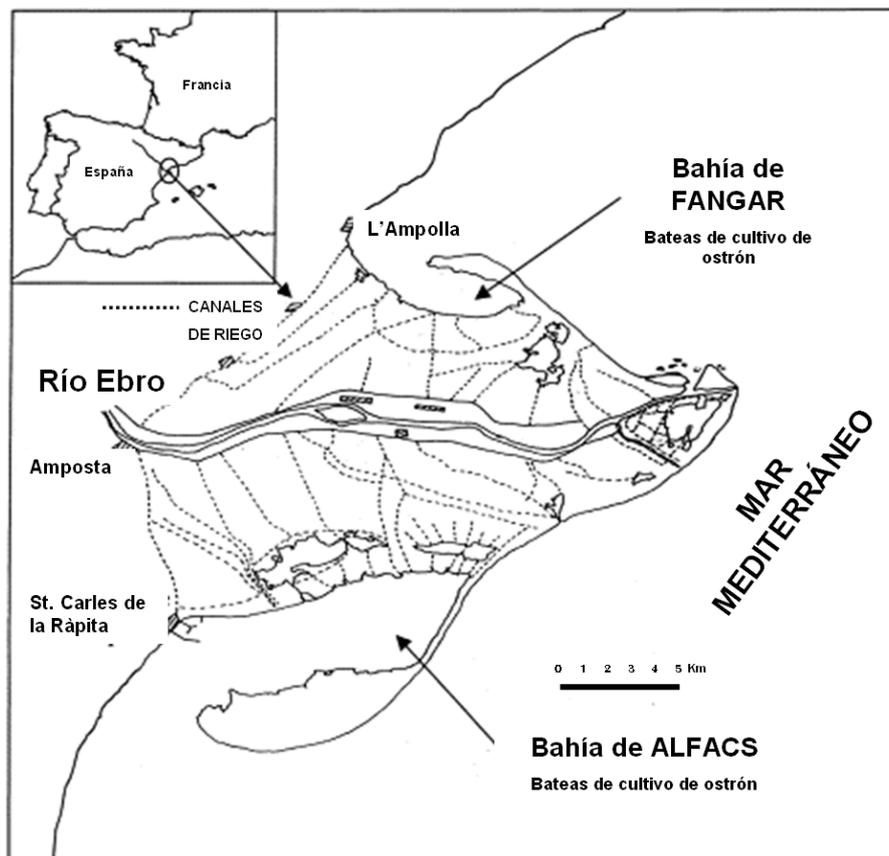


Figura 1.10. Localización del estudio. Delta del Ebro

Al mismo tiempo, un 73% de la superficie total del delta (unas 23.500 ha) está dedicada a la actividad agrícola, que constituye la principal actividad económica de la

zona, destacando el cultivo de arroz, que ocupa una extensión de 21.600 ha y alcanza las 113.500 toneladas de arroz al año (Köck *et al.*, 2010).

La segunda actividad económica de la zona es la maricultura que se desarrolla en las dos bahías que componen el delta (Fangar, al norte y Alfacs al sur) (Fig. 1.10.) Se cultiva mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y ostra (*Crassostrea gigas*) alcanzando una producción de 3000 toneladas anuales (Ramón *et al.*, 2005). Existen 166 bateas fijas entre las dos bahías, cubriendo un 1,8% y un 6.5% de la superficie total de las bahías Alfacs y Fangar respectivamente. La importancia de la agricultura y maricultura en la zona queda reflejada en la distribución de su población activa con un 70% dedicada a la agricultura y un 15% a la maricultura (Köck *et al.*, 2010).

1.5.2. Contaminación por pesticidas en el Delta del Ebro

La gran presión antropogénica que soporta el Delta del Ebro por la explotación comercial de sus importantes recursos naturales ocasiona frecuentemente problemas entre los agricultores, la maricultura y la preservación de sus comunidades naturales.

La actividad agrícola en el Delta del Ebro implica el uso de una gran cantidad de pesticidas. Para el cultivo de arroz se utilizan más de 25 productos fitosanitarios entre los que destacan herbicidas de la familia de las triazinas, fenilureas, anilidas; insecticidas organofosforados y piretroides así como fungicidas de la familia de triazoles, imidazoles y benzimidazoles (Barata *et al.*, 2007; Mañosa *et al.*, 2001; Terrado *et al.*, 2006).

A los anteriores pesticidas hay que añadir la presencia de otros contaminantes de origen industrial procedentes del río Ebro y/o que forman parte de las formulaciones de pesticidas (coadyudantes) entre los cuales destacan metales (Hg, Cd, As, Pb), compuestos organoclorados como los DDTs, hexaclorobenceno, lindanos, PCBs, así como detergentes (Nonifenol) y otros compuestos organoestánicos (TBTs) (Mañosa *et al.*, 2001). El cultivo de arroz, por otra parte, requiere un aporte constante de agua para asegurar las inundaciones del campo de cultivo. La implantación de este tipo de agricultura en el delta ha supuesto la modificación del sistema hidrológico del curso bajo del río, mediante la instalación de una densa red de canales que cubre todo el Delta (Escartín y Porte, 1997). Existen dos canales principales a ambos lados del río que transportan el agua 30km hasta los campos de cultivo de arroz. De estos dos canales principales emerge una red de canales de riego que conducen el agua hasta los cultivos. El agua procedente de los cultivos es recogida a través de canales de drenaje (hay tres canales de drenaje en cada hemidelta) que conducen el agua directamente al mar.

Introducción

El periodo de apertura de canales de riego y drenaje (entre Abril y Noviembre) (Escartín y Porte, 1997) que permite la circulación del agua desde el río hasta el mar, coincide con la aplicación de fitosanitarios en el ciclo del cultivo de arroz con predominio de pesticidas e insecticidas entre Abril y Junio, durante el periodo de presiembrar, siembra, emergencia y crecimiento y la aplicación de fungicidas durante la espigación en julio y agosto. Esta red de canales juega, por tanto, una función clave en el transporte de los pesticidas desde los campos de cultivo hasta las bahías.

Es por todo ello que el Delta del Ebro se convierte en un sistema extremadamente complejo desde el punto de vista ambiental al que hay que añadir una marcada temporalidad en la entrada de pesticidas asociados al ciclo de arroz, que podrían afectar no sólo a los ecosistemas naturales (lagunas, aguas marinas y estuarinas) sino también a las prácticas de maricultura que se desarrollan en las bahías.

En los últimos años, la maricultura desarrollada en la zona ha sufrido grandes pérdidas de producción provocada por la mortalidad masiva de la ostra durante los periodos de aplicación de pesticidas en los arrozales, lo que ha despertado la sospecha de la posible toxicidad del agua procedente de los cultivos.

Se han realizado estudios ecotoxicológicos sobre las poblaciones de moluscos y crustáceos en el Delta del Ebro así como en organismos transplantados que ponen en evidencia la fuerte presión antropogénica que sufre el Delta del Ebro. Hay estudios que demuestran una fuerte inhibición de las acetilcolinesterasas en mejillones coincidiendo con el período de máximo uso de pesticidas (Escartín y Porte, 1997), una inducción del metabolismo y estrés oxidativo en crustáceos, moluscos (Barata *et al.*, 2007; Damasio *et al.*, 2010; Escartín y Porte, 1997); y aves (Barata *et al.*, 2010) y fenómenos de masculinización en gasterópodos (Solé *et al.*, 1998). No obstante hasta la fecha no se ha podido demostrar con certeza la vinculación directa entre los pesticidas aplicados en el Delta del Ebro y la mortalidad masiva anual que sufre la ostra cultivada en la zona.

Los pesticidas utilizados en los campos de cultivo y transportados a través de la red de canales de riego y drenaje se diluyen al llegar a la costa, por lo que los organismos que habitan o se cultivan en las áreas costeras están expuestos a bajas concentraciones de éstos (Terrado *et al.*, 2006). De los más de 25 productos fitosanitarios que se utilizan en el cultivo de arroz, los herbicidas tienden a permanecer disueltos en la fase acuosa mientras que muchos insecticidas y otros productos clorados se encuentran también en la fase particulada y por tanto pueden acumularse en el sedimento y/o organismos. Sin embargo, a excepción de los compuestos clorados y metales, la mayoría de los pesticidas son poco bioacumulables ya sea por su bajo coeficiente de reparto octanol/agua (K_{ow}) (herbicidas) y/o por su baja

persistencia en el ambiente y/o en los organismos (son degradados rápidamente por los mismos). Por ello su biodisponibilidad se determina en base a los niveles analizados en la columna de agua (fase particulada y disuelta), sedimento, muestras biológicas (metales, organoclorados) y el uso de biomarcadores de exposición específicos para los mismos (inhibición de la actividad colinesterasa). Estudios previos han demostrado la presencia de bajas concentraciones de diversos compuestos tóxicos en los tejidos de los moluscos bivalvos cultivados en estas bahías, siendo el fenitrotión y malatión los plaguicidas organofosforados mayoritarios (Barceló *et al.*, 1991; Escartín y Porte, 1997; Köck *et al.*, 2010; Solé *et al.*, 2000).

1.5.3. Contaminación por metales pesados en el Delta del Ebro

Las actividades antropogénicas son una de las principales fuentes de contaminación por metales pesados en ambientes acuáticos (Rodríguez *et al.*, 2008). Debido a su naturaleza no-biodegradable y su larga vida media, los metales pesados tienen un alto potencial de acumulación en sedimentos y de bioacumulación en la biota, siendo biomagnificados a través de las cadenas tróficas (Nadal *et al.*, 2008). Los metales provocan efectos potencialmente perjudiciales en la calidad de los productos agrícolas, la fauna, el medio y la salud humana, incluso a bajas concentraciones (Suárez-Serrano *et al.*, 2010).

Las ostras se han usado frecuentemente para la determinación de los niveles de contaminación por metales en ecosistemas costeros (Fromme *et al.*, 2009; Giesy y Kannan, 2001; Houde *et al.*, 2011; Kannan *et al.*, 2005; Kontreczky *et al.*, 1997; Páez-Osuna y Marmolejo-Rivas, 1990; Páez-Osuna *et al.*, 2002; Schuhmacher y Domingo, 1996). Su ciclo de vida relativamente largo y su naturaleza sedentaria y filtradora las condiciona para bioacumular metales, pudiendo sufrir efectos biológicos adversos (Sumpter y Jobling, 1995). Estos motivos junto con la gran importancia tanto ecológica y económica de las ostras (Schuhmacher y Domingo, 1996), las convierten en un organismo idóneo para estudiar la contaminación metálica.

La cuenca del río Ebro ha sufrido grandes modificaciones a través de la agricultura, tanto históricamente como en la actualidad, que junto con las diversas actividades industriales han contribuido al incremento de contaminación por metales pesados en el río Ebro y su delta (Mañosa *et al.*, 2001). Desde principios del siglo XX lleva en funcionamiento una importante fábrica industrial en Flix, en la parte baja del Ebro (a 95 Km aguas arriba del Delta del Ebro). Su largo periodo de operación sumado a la construcción de una presa alrededor de 1960 próxima a la planta, tuvo como resultado una acumulación de 200.000-360.000 toneladas de residuos industriales en el cauce

Introducción

del río. Los sedimentos, altamente contaminados, están compuestos por una mezcla de metales pesados (cadmio, arsénico, cobre, cromo, selenio y plomo y especialmente mercurio) (Bosch *et al.*, 2009). Los contaminantes originados en Flix se transportan aguas abajo por el Río Ebro hasta su delta situado a 90 Km (Navarro *et al.*, 2009). El estado de contaminación por metales pesados del Delta del Ebro está muy bien documentado, particularmente en lo relativo a los metales presentes en aguas dulces y hábitats marinos (Fernández-Sanjuan *et al.*, 2010; Lavado *et al.*, 2006; Mañosa *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2009; Suárez-Serrano *et al.*, 2010).

El cultivo de arroz es una importante fuente de contaminación difusa de metales y otros contaminantes derivados de la aplicación de pesticidas y fertilizantes (Mañosa *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2008; Terrado *et al.*, 2007) y junto con el plomo derivado de las actividades cinegéticas constituyen las principales fuentes de contaminación en el Delta del Ebro (Mañosa *et al.*, 2001). Se ha demostrado la presencia de grandes cantidades de perdigones de plomo (del rango de <8900 a 2.661.000 perdigones por hectárea) en los primeros 20 cm de sedimentos como resultado de la práctica intensiva de caza de aves acuáticas en el delta (Mateo *et al.*, 1997).

Por otro lado, el río Ebro transporta residuos industriales, agrícolas y domésticos que son responsables de la contaminación externa del Delta del Ebro, que suponen la entrada de grandes cantidades de metales pesados en este área protegida (Castillo *et al.*, 2009; Mañosa *et al.*, 2001). Existen recientes evidencias de que algunos metales como el As, Cd y Hg están presentes en grandes cantidades en la biota procedente de la parte baja del Río Ebro y su delta (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007; Suárez-Serrano *et al.*, 2010).

Las actividades de maricultura desarrolladas en el Delta del Ebro bajo este escenario, hace necesario el desarrollo de herramientas de monitoreo efectivas para evaluar la exposición de los bivalvos cultivados a los metales en las bahías del delta.

La mayoría de los estudios de contaminación por metales desarrollados en la zona se han limitado al estudio del agua, los sedimentos, lombrices, peces, aves y organismos marinos próximos al área deltaica (Fernández-Sanjuan *et al.*, 2010; Lavado *et al.*, 2006; Mañosa *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2009; Suárez-Serrano *et al.*, 2010). Sin embargo, ninguno de los estudios anteriormente mencionados se ha realizado directamente en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro.

OBJETIVOS

1.6. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo principal de la presente Tesis es evaluar los factores que determinan la mortalidad de la ostra (*Crassostrea gigas*) cultivada en el Delta del Ebro, durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas en los arrozales del Delta y en las condiciones tradicionales de cultivo, mediante el análisis de una batería de biomarcadores en diferentes tejidos de la ostra.

Objetivos específicos

- Realizar un monitoreo y/o compilación de los parámetros físico-químicos y de los residuos de pesticidas presentes en el agua que puedan influir en el estado fisiológico de las ostras para identificar patrones de variación espacial (entre las dos bahías donde se cultiva la ostra tradicionalmente) y temporal (durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas; Mayo- Junio).
- Monitorizar el contenido de metales pesados en ostras cultivadas en el Delta del Ebro para determinar patrones de variación, identificar posibles fuentes de origen y evaluar el posible riesgo para su consumo humano.
- Determinar la actividad de las B-esterasas en las ostras y evaluar sus respuestas frente a la presencia de pesticidas organofosforados y carbamatos en el agua de las bahías.
- Monitorizar las respuestas de una batería de marcadores bioquímicos durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas (Mayo-Junio) durante dos años consecutivos y determinar patrones de variación espacio-temporal.
- Evaluar la vinculación entre el contenido de metales en ostras, parámetros físico-químicos y niveles de contaminantes en agua y las respuestas biológicas para de este modo identificar factores ambientales que afecten a la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y Métodos

2.1. Diseño de Estudio

Se elaboró un diseño experimental destinado a la monitorización de parámetros físico-químicos del agua, análisis químicos y respuestas bioquímicas en *C. gigas* en las bateas donde se cultiva habitualmente en el Delta del Ebro para su uso comercial. El experimento se realizó dos años consecutivos coincidiendo con el periodo de aplicación de pesticidas en los arrozales del Delta del Ebro

Se contó con la colaboración del *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)* que nos prestó sus instalaciones en Sant Carles de la Ràpita para poder desarrollar las operaciones de muestreo.

2.1.1. Población y muestra de estudio

Con el objetivo de obtener una muestra representativa de la población de *C. gigas* cultivada habitualmente en las dos bahías del Delta del Ebro se seleccionó a uno de los principales proveedores de la ostra cultivada en la zona para comprar los ejemplares. DeltiMussel© (www.deltimussel.com) nos proporcionó ejemplares de ostras de un tamaño medio de 60-70 mm de longitud cuyas semillas eran procedentes de Arcachón (en la Costa Atlántica Francesa).

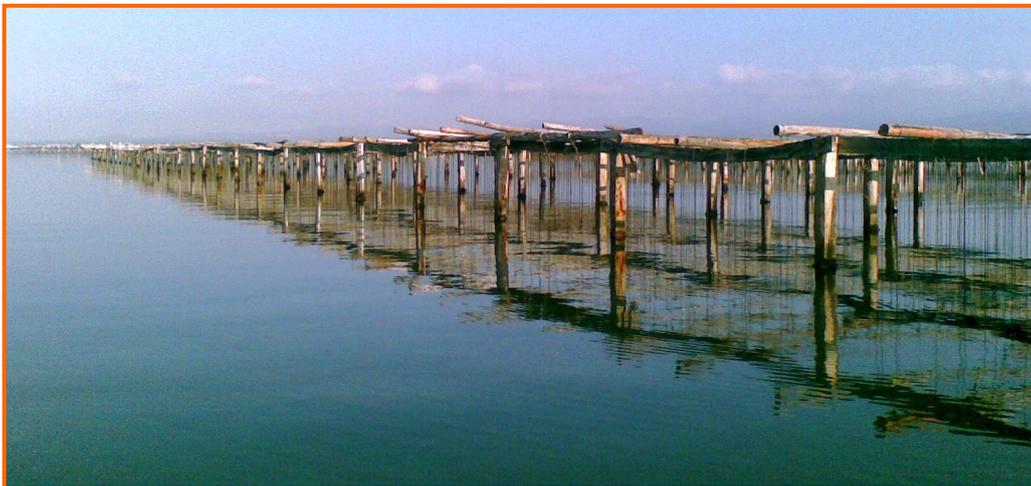


Figura 2.1. Bateas de cultivo de ostra del Delta del Ebro

A continuación se sometió a los ejemplares de estudio a una fase de depuración durante dos semanas en las instalaciones del IRTA (Institut De Recerca I Tecnologia Agroalimentàries) en acuarios de 40 L con agua natural filtrada, temperatura (20°C) y aireación constantes, tras la cual, se tomaron una serie muestras previas a la disposición en las bateas de cultivo.

Materiales y Métodos

Por último se procedió al sistema habitual de *cultivo por suspensión en cuerdas*, en el que las ostras fueron insertadas con cemento en cuerdas de 2m de longitud y colgadas en las bateas de cultivo, de tal modo que las ostras quedaban suspendidas de las bateas y sumergidas en el agua hasta su recolección (en éste caso hasta su muestreo) (Fig 2.1 y Fig 2.2). En 2008 se colgaron un total de ~520 ejemplares (~130 por punto de muestreo) y en el 2009 se colgaron ~280 ejemplares (~70 por punto de muestreo).



Figura 2.2. Cultivo de ostras por suspensión en cuerdas

2.1.2. Localización espacial del estudio: Puntos de muestreo

Se seleccionaron 4 puntos de muestreo situados en 4 bateas de cultivo, dos puntos por cada una de las bahías donde se cultiva habitualmente la ostra comercial en el Delta del Ebro. (Fig 2.3). En la Tabla 2.1 se representan las coordenadas y características de los puntos de muestreo seleccionados.

En la bahía Fangar, al norte del Delta, se situaron dos puntos de muestreo: uno de ellos, más próximo al canal de drenaje que trae agua procedente de los campos de cultivo del hemi-delta norte y el otro localizado en una balsa más alejada de la desembocadura de dicho canal (Fig 2.3.B).

En la bahía Alfacs, al sur del Delta del Ebro, se situaron los otros dos puntos de muestreo. En este caso también se localizó uno de los puntos próximo a la desembocadura del canal de drenaje procedente del hemidelta-sur y otro punto más distanciado del canal. (Fig 2.3.C).

Tabla 2.1. Identificación, localización, coordenadas y principales características de los puntos de muestreo

Bahía	Punto	Coordenadas	Características
ALFACS	A1	40°37'18.74"N 0°39'35.00"E	Punto situado en la bahía de Alfacs, cercano a la desembocadura del canal principal del hemidelta sur
	A2	40°37'1.11"N 0°37'34.88"E	Punto situado en la bahía de Alfacs, más alejado de la desembocadura del canal principal del hemi-delta sur
FANGAR	F1	40°46'31.55"N 0°44'30.76"E	Punto situado en la bahía de Fangar, cercano a la desembocadura del canal principal del hemi-delta norte
	F2	40°46'17.71"N 0°45'59.94"E	Punto situado en la bahía de Fangar, más alejado de la desembocadura del canal principal del hemi-delta sur

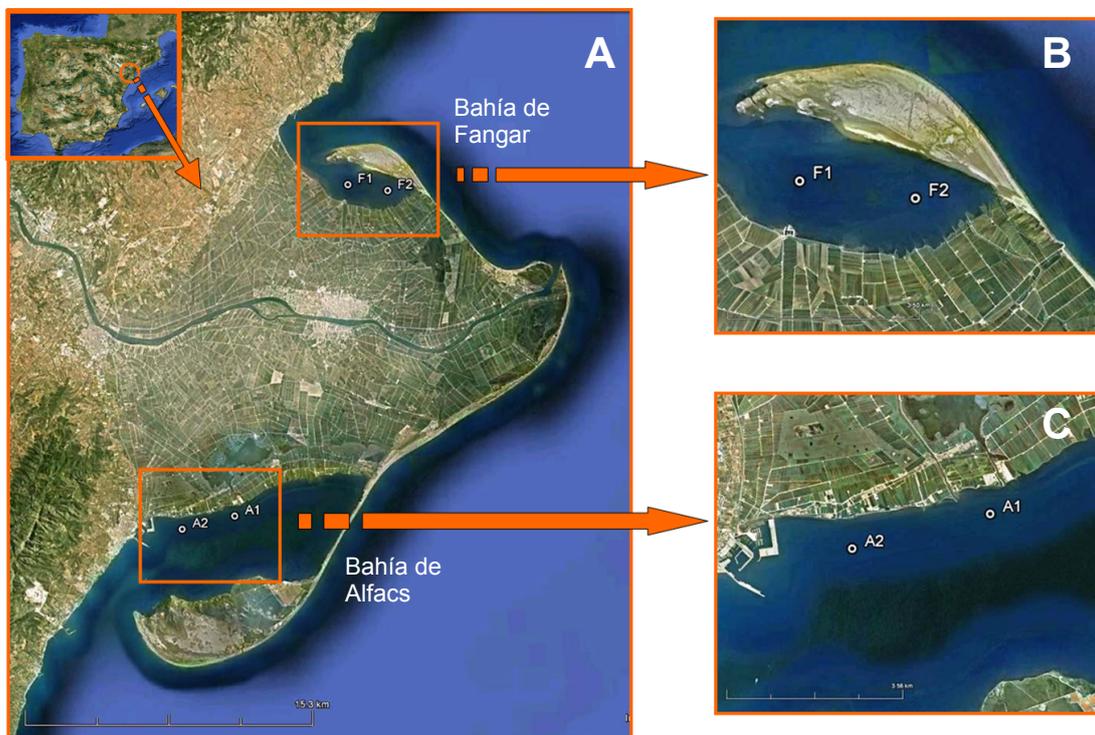


Figura 2.3. Localización geográfica de los puntos de muestreo de ostra (A) Delta del Ebro al Noreste de la Península Ibérica. Bahías donde se cultiva la ostra: Bahía de Fangar, al norte y bahía de Alfacs, al sur. (B) Ampliación de la bahía Fangar y puntos de muestreo situados en ésta F1 y F2. (C) Ampliación de la bahía Alfacs y los puntos de muestreo situados en ésta A1 y A2.

2.1.3. Localización temporal del estudio: Campañas de muestreo

La selección de los momentos de muestreo se realizó en base al periodo de aplicación de pesticidas en los arrozales del Delta del Ebro y a la apertura de los canales de riego y drenaje (entre finales de abril y finales de junio).

En el año 2008 se realizaron 4 campañas de muestreo (T1, T2, T3 y T4) separadas entre sí por periodos aproximados de dos semanas. En el año 2009 se realizaron 2 campañas de muestreo (T1 y T4) separadas entre sí por un periodo de tiempo de aproximadamente cuatro semanas.

En ambos años se tomaron muestras antes de su disposición en las bateas de cultivo. (T0/2008 y T0/2009). En la tabla 2.2 se representan las fechas exactas de cada muestreo.

Tabla 2.2. Fechas de las campañas de muestreo de los dos años de estudio.

CAMPAÑAS DE MUESTREO			
Año		Fecha	Puntos
2008	T0/2008	21-abr-08	
	T1	05-may-08	A1, A2 , F1 ,F2
	T2	23-may-08	A1, A2 , F1 ,F2
	T3	02-jun-08	A1, A2 , F1 ,F2
	T4	16-jun-08	A1, A2 , F1 ,F2
2009	T0/2009	04-may-09	
	T1	11-may-09	A1 , A2
	T1	18-may-09	F1, F2
	T4	15-jun-09	A1 , A2
	T4	22-jun-09	F2*

*Las ostras correspondientes al punto F1 en la campaña T4 habían desaparecido en el momento del muestreo. Se sospecha que fueron sustraídas.

2.2. Metodología para la toma de muestras

2.2.1. Toma de muestras de ostra.

Cada año de estudio se muestrearon 23 ostras iniciales previo al transplante (T0/2008 y T0/2009) para considerar los niveles basales de los biomarcadores y metales de estudio, y el tamaño inicial de los organismos.

En las cuatro campañas de muestreo del 2008 se recogieron un total de ~320 ostras (~20 por punto y campaña). En el 2009 se recogieron un total de ~140 ostras (~20 por punto y campaña, salvo en el último muestreo (T4) del punto F1 que no se pudieron recoger las muestras porque habían sido sustraídas).

Las ostras se recogieron con un tamaño aproximado de ~70-90 mm de longitud y se muestrearon de forma uniforme a lo largo de la longitud de la cuerda, es decir, se muestrearon aproximadamente 7 ostras de cada altura de la cuerda (7 ostras de la parte superior, 7 de la parte intermedia y 7 de la parte más profunda). Los ejemplares muestreados se transportaron refrigerados (a 4°C) hasta las instalaciones del IRTA en Sant Carles de la Ràpita donde se procedió a su manipulación.

De los 20 organismos recogidos en cada punto y campaña, la mitad (15) se destinaron al análisis de biomarcadores y 5 de ellos para el análisis de metales.

Se extrajeron los tejidos (branquias, glándula digestiva y músculo aductor) de 15 replicados en cada punto y campaña de muestreo para el análisis de biomarcadores. La manipulación de los organismos se realizó siempre a una temperatura de 4°C. Una vez extraídos los tejidos éstos fueron congelados con nitrógeno líquido para ser después almacenados a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras de ostras destinadas al análisis de metales (la parte blanda de 5 organismos enteros por punto y campaña) se guardó individualmente en viales de plástico a -20°C. Tanto la determinación de biomarcadores como la preparativa de las muestras para análisis de metales se realizaron en el laboratorio CRIT-UPC, Terrassa.

2.2.2. Toma de muestras de aguas

Para el análisis de los *parámetros fisicoquímicos* se recogieron 2 litros de agua en botellas de PET (polietileno tereftalato) en cada punto y campaña de muestreo, en el mismo momento que se recogían las muestras de ostra (Tabla 2.2.). Las muestras se mantuvieron refrigeradas (a 4°C) desde el momento de recogida hasta que fueron analizadas 24 horas más tarde en el laboratorio.

El *análisis de pesticidas* de las muestras de agua proceden de un trabajo simultáneo realizado por Köck *et al.*, (2010). en el que se recogieron muestras de 3 litros en cada muestreo en los puntos situados en ambas bahías cada 2-3 días coincidiendo con nuestro periodo de estudio (Mayo- Junio de 2008) Las fechas concretas de cada muestreo para cada bahía se representan en la Tabla 2.3. Dicho estudio, ya publicado, forma parte de un estudio más amplio que abarca además de los puntos de muestreo situados en las bahías otra serie de puntos de muestreo situados en los canales del Delta del Ebro. Las muestras se recogieron en botellas de vidrio ámbar y se transportaron refrigeradas (4°C) hasta el laboratorio. Posteriormente las muestras fueron filtradas mediante filtros de fibra de vidrio de 0.45µm de tamaño de poro (Whatman, Maidstone, Reino Unido) para eliminar los sólidos en suspensión presentes

Materiales y Métodos

y almacenadas protegidas de la luz a -20°C hasta su posterior análisis. Desafortunadamente las muestras de agua del año 2009 se perdieron accidentalmente y sólo se pudieron analizar los pesticidas presentes en las muestras de agua del año 2008.

Tabla 2.3. Fechas de las campañas de muestreo de aguas para el análisis de pesticidas en el año 2008. En cada fecha se recogieron muestras de agua en cada punto de las dos bahías (Alfacs y Fangar) salvo en las fechas marcadas con (*) que sólo se muestreó en la bahía de Alfacs.

Periodo de muestreo	Fecha
T1	24/04/2008
	28/04/2008*
	02/05/2008
	05/05/2008
T2	08/05/2008*
	13/05/2008
	15/05/2008
	19/05/2008
	22/05/2008
T3	26/05/2008
	29/05/2008
	02/06/2008
T4	05/06/2008
	09/06/2008
	12/06/2008

2.3. Metodología de análisis de muestras

2.3.1. Análisis bioquímico de ostra

I. Optimización

Antes de los análisis bioquímicos fue necesaria la *optimización* de las metodologías utilizadas para cada tejido analizado (glándula digestiva, branquias y músculo aductor) de *C. gigas*. El objetivo de la optimización era asegurar que nuestros ensayos de determinación de la actividad enzimática, contenido en GSH, daños en ADN y peroxidación lipídica se encontraran dentro del rango lineal correspondiente a los estándares de calibración, la concentración enzimática respecto a la velocidad de reacción y la velocidad de reacción respecto al tiempo.

II. Homogeneización y extracción de fracción S9

El proceso de *homogeneización* se realizó en tampón fosfato 0.1M pH 7.4 a 4°C, conteniendo KCl 150 mM y 1 mM EDTA mediante un PolyTron® PT 1200E.

Cada muestra, una vez descongelada (manteniéndola en hielo para evitar cambios bruscos de temperatura), se limpiaba con tampón de homogeneización y se secaba en papel absorbente para proceder a su pesado.

Una vez pesadas, las muestras se homogeneizaron con tampón de homogeneización en una proporción 1:5 (es decir, 5ml de tampón de homogeneización por cada gramo de tejido) en branquias y glándula digestiva y a una proporción 1:30 (30 ml de tampón por cada gramo de tejido) en músculo aductor. El proceso se realizó en intervalos de 10 segundos, manteniendo la muestra en hielo en todo momento para evitar subidas de temperatura que pudieran dañar la actividad enzimática.

De los homogeneizados procedentes de glándula digestiva y branquias se separaron las alícuotas destinadas a la determinación de los daños en el ADN, que se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

A continuación se obtuvo la *fracción S9* de los homogeneizados para el análisis del resto de biomarcadores. La fracción S9 contiene el citosol y los microsomas de las células donde se desarrolla la mayor parte de la actividad enzimática relacionada con las fases I y II del metabolismo de xenobióticos. Para su obtención se sometió a los homogeneizados a una centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos. Las fracciones (sobrenadante) se dividieron en alícuotas para cada uno de los biomarcadores a analizar y se conservaron a -80°C hasta el momento su análisis.

Materiales y Métodos

III. Análisis de biomarcadores

Se analizó una batería de biomarcadores para cada tejido:

- AChE, PChE, CbE en músculo aductor
- GSH, GR, GST, SOD, CAT, GPx-Se, GPx.-Total, LPO, ADNd, lipofuscina y contenido de lípidos en glándula digestiva
- AChE, PChE, CbE, GSH, GR, GST, SOD, CAT, LPO y ADNd en branquias

Se analizaron 10 replicados de ostra por cada punto y campaña de muestreo en los dos años de estudio.

Todos los análisis bioquímicos de las muestras se realizaron por triplicado o cuadruplicado en el espectrofotómetro de microplaca de 96 pocillos Synergy HT-BioTek ® a excepción de la catalasa que se determinó por triplicado en el espectrofotómetro UV-visible de cubeta SUPER-Aurius ®

III.a. Determinación de proteína total

El contenido total de proteína en cada fracción fue determinado de acuerdo al método Bradford (Bradford, 1976) usando **γ -Globulina** de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) como proteína estándar. El método está basado en el cambio en el espectro visible del colorante Bradford (azul de Coomassie G-250, Sigma-Aldrich) al unirse a las proteínas, monitorizado mediante la lectura de absorbancia a 570nm.

La cantidad de proteína total en las muestras se estimó por extrapolación a partir de la curva estándar realizada con γ -Globulina a concentraciones de 0.2; 0.04; 0.1; 0.2 y 0.4 mg/ml de proteína.

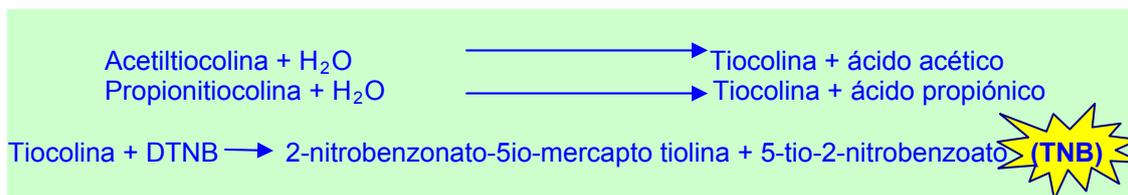
El ensayo se desarrolló tal y como se describe a continuación:

Ensayo para la determinación de proteína total:	
Reactivos	Volumen
Muestra* o Estándar **	10 μ l
Reactivo Bradford diluido 1:4 en agua u.p.	250 μ l
<i>15 min. de agitación en oscuridad</i>	
<i>Lectura de absorbancia a 570 nm</i>	
*Muestra diluida 150 veces para la fracción S9 y 200 veces para los homogeneizados	
**Estándar de γ -Globulina	

III.b. Cuantificación de la actividad Esterasa

La actividad de las esterases se determinó en la fracción S9 de músculo y branquias mediante espectrofotometría, midiendo el aumento de absorbancia a 405nm ($\epsilon=13.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) provocado por la reacción del DTNB con la tiocolina liberada por las

esterasas, que genera el anión 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que se monitoriza a 405nm según la reacción:



Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y pH 7.4, usando acetilcolina (ACh) yodada, propionilcolina (PrCh) clorada y S-Fenil-tioacetato como sustratos para la acetil-, propionil- y carboxilesterasas según la metodología descrita por Ellman *et al.*, (1961).

En el análisis se utilizaron los reactivos:

- Tampón fosfato 0,1M de pH 7.4 (a 20°C).
 - K₂HPO₄ 0,1M (Sigma-Aldrich)
 - KH₂PO₄ 0,1M (Sigma-Aldrich)
- Acetilcolina yodada, (Sigma-Aldrich), solución de 60.6mM en agua ultra pura.
- Propionilcolina clorada, (Sigma-Aldrich), solución de 60.6mM en agua ultra pura.
- Fenil-S.-tioacetato, (Sigma-Aldrich), solución de 18mM en agua ultra pura.
- Ácido 5,5'-ditriobis-2nitrobenzoico (DTNB), (Sigma-Aldrich), solución de 12mM en tampón fosfato.
- Ácido 5,5'-ditriobis-2nitrobenzoico (DTNB), solución de 0.495mM en tampón fosfato.

Para la determinación de las actividades de la acetilcolinesterasa y la propionilcolinesterasa se prepararon mezclas de reacción de 20ml de volumen (para cada microplaca completa, donde se analizaban 24 muestras con 4 replicados cada una) del siguiente modo:

Mezcla de reacción	
Reactivos	Volumen
ACh 60.6mM* o PrCh 60.6mM**	1 ml
DTNB 12mM	0.840 ml
Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (a 20°C).	18.16 ml

*Para la determinación de la Acetilcolinesterasa

**Para la determinación de la Propionilcolinesterasa

Materiales y Métodos

En cada pocillo de la microplaca se añadieron los siguientes reactivos en el orden y las cantidades y concentraciones que se indican a continuación:

Ensayo para la Acetilcolinesterasa y Propionilcolinesterasa:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	100µl	
Mezcla de reacción	200µl	
- ACh 60.6mM o PCh 60.6mM		2mM
- DTNB 12 mM		0.33mM
- Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (a 20°C)		

*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total de 4mg/ml en músculo aductor y branquias de ostra

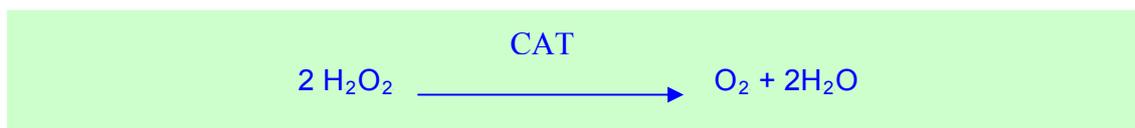
Ensayo para la Carboxilesterasa:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	50µl	
DTNB 0.495mM	200µl	0.33mM
<i>Incubar 5 minutos en agitación y protegido de la luz</i>		
Fenil-S-tioacetato, 18mM	50µl	3mM

*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total de 4mg/ml en músculo aductor y branquias de ostra

La actividad de la acetilcolinesterasa, la propionilcolinesterasa y la carboxilesterasa se cuantificó en la fracción S9 de músculo aductor y branquias de ostra diluida para una concentración proteica de 4 mg/ml. La monitorización de la actividad de las tres enzimas se realizó cuantificando el incremento de absorbancia a 405nm durante 15 minutos. Los resultados de actividad se sometieron a una normalización basada en el contenido total de proteína, expresando finalmente los resultados en nmol/ min/ mg de proteína.

III.c. Cuantificación de la actividad Catalasa

La actividad Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) se determinó por el método descrito por Aebi, (1974) basado en la siguiente reacción:



Reactivos:

- Tampón fosfato 80mM pH 6.5 a 20°C.
- Peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (Sigma-Aldrich) 150mM diluido en tampón fosfato.

El ensayo se realizó a temperatura ambiente y por triplicado para cada muestra, añadiendo los reactivos directamente en la cubeta de cuarzo y agitando suavemente por inversión, tal y como se describe a continuación:

Ensayo para la catalasa:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Tampón fosfato 80 mM	630µl	
Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	200µl	52.5mM
Muestra	20µl	

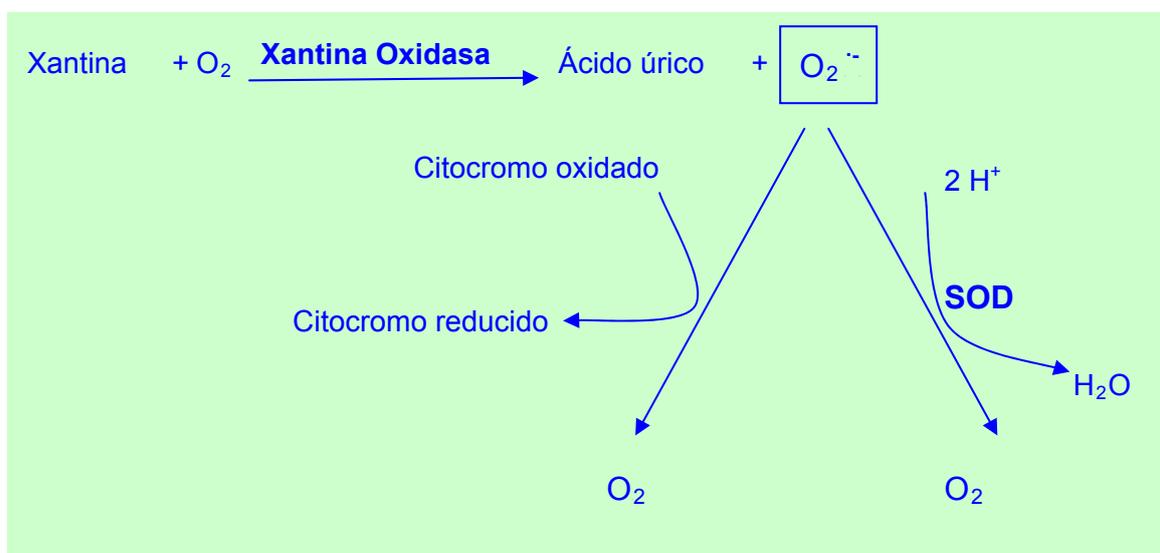
*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total 0.8 mg/ml para branquias y de 1 mg/ml para glándula digestiva de ostra

La reacción se inicia por la adición de la muestra. La actividad se monitoriza mediante el descenso de absorbancia a 240nm por la desaparición de H₂O₂ (coeficiente de extinción de 40 M⁻¹ cm⁻¹) durante un tiempo total de un minuto. Los resultados se expresaron en µmol/min/mg proteína.

III.d. Cuantificación de la actividad Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad superóxido dismutasa se determinó de forma indirecta, a partir del grado de inhibición de la reducción del *Citocromo c* por O₂⁻ en la reacción xantina oxidasa/xantina según Mc CordyFridovich (1969).

En la reacción intervienen la xantina y la xantina oxidasa como un generador de superóxidos y que controlan la velocidad de reacción. En ausencia de SOD, los radicales reaccionan en la reducción del Citocromo c. En presencia de SOD, ésta compite con el Citocromo c por el anión superóxido del siguiente modo:



Materiales y Métodos

Así pues, la actividad de la SOD se determinó de forma indirecta a partir de la monitorización a 550nm durante 2 minutos de la reducción de Citocromo c.

Las unidades de SOD se cuantificaron a partir de una curva patrón generada con una solución madre de SOD de 1.5 U/ml purificada de la que se hicieron diluciones seriadas con tampón fosfato 50 mM, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, obteniéndose las siguientes concentraciones: 0.25U/ml, 0.5U/ml, 0.75U/ml; 1U/ml; 1.25U/ml y 1.5 U/ml de SOD.

Para el análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato 50mM pH 7,8 a 20°C, con 0.1mM de EDTA.
- Citocromo c (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.06mM disuelto en tampón fosfato.
- Xantina (Sigma-Aldrich) 0.14mM disuelto en tampón fosfato.
- Xantina Oxidasa (XOD) (Sigma-Aldrich) 0.01U/ml en tampón fosfato.
- Superóxido dismutasa estándar (SOD) (Sigma-Aldrich) a 1.5U/ml en tampón fosfato.

Para los ensayos se realizaron mezclas de reacción para media microplaca en la que se analizaban 12 muestras con 4 réplicas cada una (10ml):

Mezcla de reacción para la SOD

Reactivos	Volumen
Tampón fosfato 50mM pH 7.8 (a 20°C), 0.1mM de EDTA	5ml
Citocromo c (0.06mM)	2,5ml
Xantina (0.14mM)	2.5ml

Para el ensayo se procedió tal y como se describe a continuación:

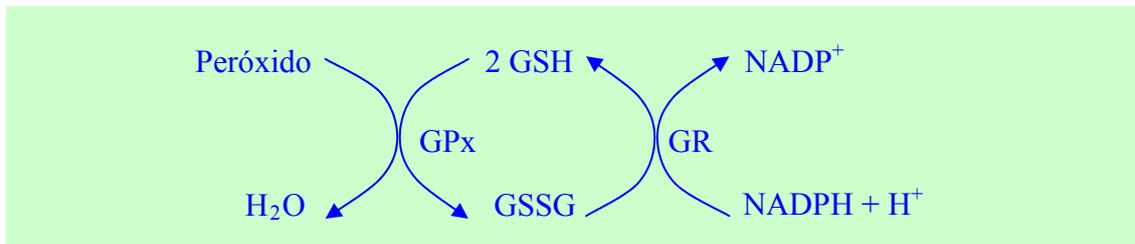
Ensayo para la SOD:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Estándar (SOD) o muestra	50µl	
Mezcla de reacción	200µl	
-Citocromo C		0.01mM
-Xantina		0.023mM
-Tampón fosfato 50mM pH 7.8		
Xantina oxidasa (XOD)	20µl	0.0017U/ml

*muestra diluida 300 veces para branquias de ostra y 800 veces para glándula digestiva de ostra en tampón de homogeneización.

Los blancos, sin SOD, se tomaron como referencia para el 100% de la actividad sirviendo como base para calcular la actividad remanente de los patrones de la curva y en las muestras de análisis. Los resultados se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína total en reacción y se expresaron como U/mg prot total.

III.e. Cuantificación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad GPx se determinó según el método de Pagliay Valentin (1967) modificado por Lawrence Burk (1976) y adaptado a lector de microplaca de 96 pocillos, basándose en la siguiente reacción:



La actividad GPx se cuantificó a partir del descenso en la concentración de NADPH (monitorizado a 340 nm) que se consume durante el proceso de generación de GSH a partir del glutatión oxidado (coeficiente de extinción de 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹).

La actividad **GPx total** se determinó utilizando hidroperóxido de cumeno (CHP) como sustrato, mientras que la actividad **GPx dependiente de selenio** se determinó usando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como sustrato y ácido sódico (NaN₃) para bloquear la enzima catalasa que también usa el peróxido de hidrógeno como sustrato, consiguiendo así la medida específica de la actividad GPx dependiente de selenio (GPx-Se).

Para el análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato 0.1M , pH 7.4 (20 °C)
- Glutatión reducido (Sigma-Aldrich) 12mM diluido en tampón fosfato
- NADPH 0.72mM, sal tetrasódica riqueza 98% (Sigma-Aldrich) diluido en tampón fosfato.
- Glutatión reductasa (GR) 12 U/ml (Sigma-Aldrich) diluida en tampón fosfato
- Hidroperóxido de cumeno (CHP) 18mM (Sigma-Aldrich) diluido en metanol:tampón fosfato a una relación (1:5).
- Na N₃, 6mM (Sigma-Aldrich) diluido en tampón fosfato.
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 1.2mM (Sigma-Aldrich) diluido en tampón fosfato.

Materiales y Métodos

Para cada una de las dos determinaciones (GPx total y GPx–Se) se realizaron las siguientes mezclas de reacción:

Mezcla de reacción para la GPx total (7 ml, para 12 muestras y 4 replicados)

Reactivos	Volumen
Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (a 20°C).	4.5ml
GSH 12mM	2.5ml

Mezcla de reacción para la GPx-Se (6.5 ml, para 12 muestras y 4 replicados)

Reactivos	Volumen
Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (a 20°C).	1.5ml
NaN ₃	2.5ml
GSH 12mM	2.5ml

Procediendo del siguiente modo para cada ensayo:

Ensayo para la GPx total:

Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	10µl	
Mezcla de reacción	140µl	
-Tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 a 20°C		
- GSH 1mM		2mM
NADPH 0.72mM	50µl	0.12mM
GR 12U/ml	50µl	2 U/ml
<i>5 minutos en agitación en oscuridad</i>		
CHP 18mM	50µl	3mM

*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total 10mg/ml en glándula digestiva y 8 mg/ml branquias de ostra

Ensayo para la GPx-Se:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	20µl	
NADPH 0.72mM	50µl	0.12mM
GR 12U/ml	50µl	2 U/ml
Mezcla de reacción	130µl	
- Tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 a 20°C		
- NaN ₃		1mM
- GSH 12mM		2mM
<i>5 minutos en agitación en oscuridad</i>		
H ₂ O ₂ 1.2mM	50 µl	3mM
**muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total 10mg/ml en glándula digestiva y 8 mg/ml branquias de ostra		

La actividad se monitorizó en los dos casos (GPx-Total y GPx-Se) a partir del descenso de absorbancia a 340 nm durante 2 minutos. Los resultados se expresaron en nmol/ min/mg de proteína total en el ensayo.

III.f. Cuantificación de la actividad Glutación Reductasa (GR)

La actividad Glutación Reductasa se determinó según el método descrito por Carlberg y Mannervik, (1985) adaptado al lector de microplaca de 96 pocillos.

La actividad GR se mide monitorizando la oxidación del NADPH (a 340nm) consumido por la GR para la reducción del glutatión oxidado (GSSG) según la reacción:



Para el análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato 0.1 M , pH 7.4 (20 °C)
- Glutatión oxidado (GSSG) 10mM disuelto en tampón fosfato
- NADPH 1mM disuelto en tampón fosfato.

Para la determinación de la actividad GR se realizaron mezclas de reacción de 10 ml para media microplaca en la que se analizaban 12 muestras con 4 réplicas cada una tal y como se describe a continuación:

Mezcla de reacción (10 ml)

Reactivos	Volumen
GSSG 10mM	1 ml
NADPH 1mM	1 ml
Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (a 20°C).	18 ml

Materiales y Métodos

El ensayo se llevó a cabo del siguiente modo:

Ensayo de la GR:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	100 μ l	
Mezcla de reacción	200 μ	
- GSSG 10mM		0.67mM
- NADPH 1mM		0.067mM

*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total de 1 mg/ml en glándula digestiva y branquias.

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado para cada muestra y la actividad se monitorizó a partir del descenso de absorbancia a 340 nm durante 5 minutos. El cálculo de la actividad se realizó usando el coeficiente de extinción de la GR ($6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y los resultados se expresaron en nmol/ min/mg de proteína total en el ensayo.

III.g. Cuantificación del contenido del glutatión reducido

La determinación del glutatión reducido se realizó en base a la metodología que desarrolló Carlberg y Mannervik (1985) como alternativa a la técnica cromatográfica (HPLC), que consiste en añadir monoclorobamina (mCB) y GST a cada muestra. La GSH presente en las células forma el complejo fluorescente GSH-mCB, que se monitoriza mediante fluorimetría usando una longitud de onda de excitación/emisión de 360nm:640nm, tras la incubación durante una hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Para el análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato 0.1M , pH 7.4 (20 °C)
- Glutatión-S-Transferasa (GST) 6 U/ml (Sigma-Aldrich) diluido en tampón fosfato
- MCB (monoclorobimana) 0.5mM (Fluka) Diluido primero en DMSO a una concentración stock de 5mM y a partir de ésta diluido en tampón fosfato para una concentración ce 0.5mM.
- GSH 1mM (Sigma-Aldrich diluido en tampón fosfato).

Se construyó una curva patrón bajo las mismas condiciones a partir de la solución madre de GSH 1mM de la que se realizaron diluciones seriadas con tampón fosfato para las siguientes concentraciones estándar: 2 μ M, 8 μ M, 16 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M.

El contenido de GSH total se obtuvo por extrapolación en la curva estándar y los resultados se expresaron como nml/g de peso fresco.

Para el ensayo se procedió tal y como se describe a continuación:

Ensayo para la determinación del contenido de GSH:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	50 μ l	
Tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 (20°C)	140 μ l	
MCB 0.5 mM	60 μ l	0.1 mM
GST 6 U/ml		1 mM

*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de proteína total 5 mg/ml en glándula digestiva y branquias

III.h. Cuantificación de la actividad de la glutatión –S-transferasa (GST)

La actividad GST se cuantificó según el método descrito por Habig *et al.*, (1974) basado en la determinación espectrofotométrica de la conjugación del GSH con el cloro-2,4 dinitrobenceno (CDNB) catalizada por la glutatión-S-Transferasa según la reacción:



La formación del conjugado 2,4-dinitrofenil-S-glutatión (GS-CDNB) se evaluó mediante la monitorización del incremento de absorbancia a 340nm durante 5 minutos. El cálculo de la actividad se determinó usando el coeficiente de extinción molar de la GST de $9.6\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ y los resultados se expresaron como nmol/min/mg prot.

Para el análisis se utilizaron los siguientes reactivos:

- Tampón fosfato 0,1M de pH 7.4 (a 20°C)
- Glutatión reducido (GSH, sigma-Aldrich) 5mM
- CDNB (Cloro, 2,4 dinitrobenceno) (Sigma- Aldrich) 20mM

Se realizaron mezclas de reacción de 15ml para media microplaca en cada ensayo, donde se analizaban 12 muestras con 4 réplicas del siguiente modo:

Mezcla de reacción para la GST

Reactivos	Volumen
GSH (5mM)	3,104 ml
CDNB (20mM)	0,776 ml
Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 (a 20°C), 0.1 mM de EDTA	11.12 ml

Materiales y Métodos

Y para cada ensayo se procedió del siguiente modo:

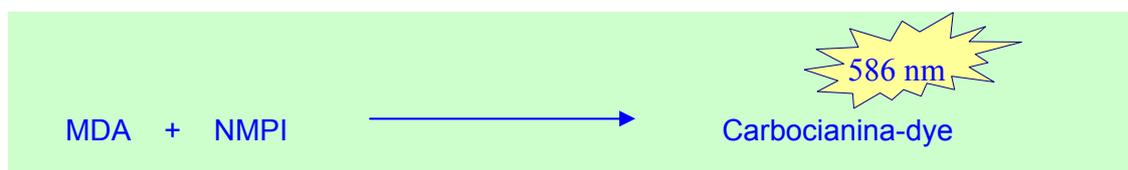
Ensayo para la GST:		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	10 µl	
Mezcla de reacción	290 µl	
-GSH		1mM
-CDNB		1mM
-Tampón fosfato 0.1M pH 7.4 a 20°C		

*muestra diluida en tampón de homogeneización para una concentración de 2mg/ml en branquias y 4 mg/ml en glándula digestiva

III.i. Determinación de peroxidación de lípidos (LPO)

Los daños por peroxidación de lípidos se determinaron de acuerdo a Esterbauer *et al.*, (1991). Los peróxidos lipídicos derivados de los ácidos grasos insaturados son inestables y se descomponen en una serie de compuestos entre los que están incluidos el malondialdehído (MDA), que ha utilizado frecuentemente como indicador de peroxidación lipídica.

El ensayo está basado en la reacción del reactivo 1-metil-2-fenilindol (NMPI) con MDA a 45°C, que da lugar a un cromóforo que absorbe a 586 nm del siguiente modo:



La reacción se lleva a cabo en condiciones ácidas (HCl) y añadiendo un agente antioxidante (BHT) La peroxidación lipídica se mide en las muestras en base a la absorbancia medida a 586nm frente a una solución estándar sometida al mismo tratamiento.

La peroxidación lipídica en las muestras de branquias y glándula digestiva de las ostras se midió sobre la fracción S9, para lo que se utilizaron los siguientes reactivos:

- BHT 1% (Sigma-Aldrich) diluido en etanol
- NMPI; N-metil-2-fenil-indol 7.72 mM (Sigma-Aldrich) diluido en acetonitrilo y metanol en proporción (1:3)
- HCl al 37%

- TMP (1,1,3,3 *tetrametoxipropano*) (Sigma-Aldrich) 100mM diluido en tampón, como solución stock.
 - TMP 10 μ M partiendo de la solución stock de TMP 100mM, diluida 100 veces en agua ultra pura. Con el que se elaboran las siguientes concentraciones estándar 0.25 μ M, 0.5 μ M; 1 μ M y 2 μ M

El ensayo se realizó por cuadruplicado para cada muestra en base a la absorbancia medida a 586 nm frente a la solución estándar de TMP, de modo que el contenido de MDA de cada muestra se estimó por extrapolación a partir de la curva estándar y los resultados finales fueron expresados en nmol/g de tejido fresco.

Para el ensayo se procedió del modo que se describe a continuación:

Ensayo para LPO en fracción S9		
Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra* ó estándar (TMP)	200 μ l	
N-metil-2-fenil-indol 7.72 mM	650 μ l	5mM
<i>Agitar en vórtex</i>		
HCl al 37%	150 μ l	5.55%
BHT 1%	12 μ l	0.012%
<i>Incubar a 45 °C durante 40 minutos</i>		
<i>Poner en hielo</i>		
<i>Centrifugar[†] a 15.000 x g durante 10 minutos a 4°C</i>		
<i>Extraer sobrenadante[†] y leer absorbancia a 586nm</i>		
*muestras de branquias de ostra diluidas para una concentración de 8 mg/ml		
[†] La centrifugación sólo se realizó en las muestras no en los estándar		

III.j. Determinación del porcentaje de lípidos

Para calcular el % de lípidos respecto al peso fresco se realizó una extracción del contenido lipídico de la glándula digestiva de la ostra.

La extracción de lípidos se realizó según Folch *et al.*, (1957) tal y como se describe a continuación utilizando los siguientes reactivos:

- Cloroformo/Metanol en una relación 2:1
- BHT al 1% diluido en Cloroformo/Metanol (2:1)
- KCl al 0.88%

Metodología de extracción de lípidos

Reactivos	Volumen
Muestra*	500µl
Cloroformo: metanol (2:1)	5ml
<i>Homogeneizar con polytron manteniendo en hielo</i>	
<i>Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos</i>	
<i>Descartar sobrenadante</i>	
KCl 0.88%	1ml
<i>Agitar en Vórtex</i>	
<i>Centrifugar 2500 rpm durante 10 min</i>	
<i>Descartar el exceso de agua y metanol (sobrenadante)</i>	
<i>Deshidratar el extracto de lípidos mediante N₂ líquido</i>	
<i>Determinar el peso seco del extracto de lípidos</i>	
<i>Resuspender los lípidos en C/M (2:1) para una concentración de 4 mg/ml</i>	

* Homogeneizado de glándula digestiva a una relación 1:2.5 (0.4 g/ml)

III.k. Determinación de Lipofuscina.

La lipofuscina es un pigmento fluorescente derivado de la oxidación de ácidos grasos. Fue determinada por fluorescencia en el extracto de lípidos de acuerdo a Mourentey Díaz-Salvago, (1999) y Sukhotin *et al.*, (2002), usando una longitud de onda de excitación/emisión de 360/460nm.

El ensayo se realizó por triplicado en los extractos de lípidos diluidos en Cloroformo/Metanol (2:1) para una concentración de 0.003 mg/ml tal y como se describe a continuación:

Ensayo para la determinación de Lipofuscina:

Reactivos	Volumen	Concentración en reacción
Muestra*	300 µl	0.003mg/ml
<i>Lectura de fluorescencia a $ex=360\text{ nm}$ y $em=460\text{ nm}$</i>		

*Extracto de lípidos ya diluida a la concentración de análisis

Los niveles de lipofuscina fueron expresadas como unidades de fluorescencia relativa por mg de lípidos.

III.l. Determinación de daños en el ADN (ADNd)

Los daños en el ADN se cuantificaron de acuerdo a Lafontaine *et al.*, (2000) mediante el ensayo de precipitación alcalina (Olive, 1988) según el cual cuando las células son lisadas mediante SDS y seguidamente se añade KCl se forma un precipitado que puede ser recogido por una centrifugación de baja velocidad y que contiene el ácido

nucleico estrechamente ligado a la proteína. Sin embargo, cuando el ADN se encuentra dañado se libera de la proteína y permanece en el sobrenadante después de la centrifugación. De modo que la proporción de fragmentos de ADN que permanece en el sobrenadante representa una medida de los daños en el ADN.

A los fragmentos de ADN presentes en el sobrenadante se añadió el colorante Hoesch dye y se cuantificó el complejo resultante por fluorescencia usando una longitud de onda de excitación/emisión de 360/450 nm.

Se utilizó ADN estándar procedente de timo de vaca para la recta de calibración y la determinación de los fragmentos dañados de ADN de la muestra realizó por extrapolación. Finalmente los resultados se expresaron como μg de ADN dañado por g equivalente de peso fresco de tejido.

Se utilizaron los siguientes reactivos para el análisis:

- Tampón fosfato 0.1 M , pH 7.4 (20 °C)
- SDS (2%) conteniendo 50mM de NaOH, 10mM de TIS y 10 mM EDTA, pH 8.3
- KCl 0.12M disuelto en agua
- Hoesch dye (bisBenzimida H 33258, Fluka.) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diluido en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4 (20°C)
- ADN estándar 1 mg/ml (Ácido desoxirribonucleico de timo de ternera, tipo1, fibras, Sigma) en tampón fosfato.

Se procedió del siguiente modo:

Ensayo para la determinación de los daños en ADN:	
En eppendorf	
Reactivos	Volumen
Muestra*	50 μl
SDS (2%) , 50mM de NaOH, 10mM de TRIS y 10mM EDTA	500 μl
<i>Agitar en vórtex</i>	
KCl 0.12 M	500 μl
<i>Agitar en vórtex</i>	
<i>Incubar a 60°C durante 10 minutos</i>	
<i>Enfriar en hielo durante 15 minutos</i>	
<i>Centrifugar a 8.000 x g durante 4 minutos a 4°C</i>	
<i>Extraer sobrenadante</i>	
En microplaca:	
Sobrenadante	50 μl
Hoesch dye 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	200 μl
<i>Lectura de fluorescencia a $\text{ex}=360 \text{ nm}$ y $\text{em}=460 \text{ nm}$</i>	
<small>*homogeneizado sin diluir en branquias y diluido dos veces en glándula digestiva</small>	

2.3.2. Análisis de metales en ostra

Se realizó en primer lugar una **liofilización** de las muestras de ostra para eliminar el contenido de agua en sus tejidos mediante un equipo de Telstar (modelo CRYODOS). Se analizó el contenido de metales de 5 animales completos y liofilizados para cada punto y campaña de muestreo siguiendo los métodos descritos por Barata *et al.*, (2005). La metodología de análisis de metales en muestras biológicas incluye una etapa previa de digestión ácida. Por lo que cada muestra de ostra, previamente liofilizada, fue sometida a un proceso de **digestión** en ácido nítrico ultra puro y peróxido de hidrógeno por microondas (ETHOS 900).

Se digirieron porciones de ~0.15 gr. de cada muestra liofilizada (triturada y homogeneizada para que contuviese restos de todos los órganos y tejidos que componían la muestra de ostra original). El equipo de digestión constaba de un rotor con 10 vasos de teflón de modo que en cada serie se digerían 9 muestras y un blanco (sin tejido). En el proceso se empleó un programa de cinco etapas, una primera etapa de 2 minutos a 250 vatios, una segunda de 1 minuto sin potencia (0 vatios), una tercera de 5 minutos a 400 vatios, una cuarta a 600 vatios y una quinta etapa de 4 minutos a 500 vatios de potencia, tomándose la temperatura de 200 °C como temperatura de control durante todo el proceso.

Tras el proceso de digestión se dejaron enfriar las muestras y se añadieron 45mL de agua desionizada (Milli-Q). Las muestras se conservaron en viales de poliestireno a 4°C hasta su análisis.

Los niveles de **Zn, Cu, Cd, Hg, Pb y As** fueron determinados en las muestras digeridas mediante el modelo Elan 6000 del equipo Perkin Elmer de espectrofotometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICM-MS) según Barata *et al.*, (2005) en el Servicio Científico Técnico de la Universidad de Barcelona. Se analizó un blanco por cada 9 muestras para monitorizar la señal residual. Los límites de detección y cuantificación (L.D y L.C.) se calcularon a partir de las mediciones en los blancos.

2.3.3. Análisis de parámetros físico-químicos de aguas

En cada punto y campaña de muestreo se midieron *in situ* la **temperatura, el oxígeno disuelto, el pH y la conductividad** mediante un WTW Multi 340i portátil (Wissenschaftlitch-Technische Werkstätten [GMBH], Weilheim, Alemania).

Con las muestras de agua tomadas en el campo se determinaron los **sólidos en suspensión** en el laboratorio de acuerdo a métodos estándar (ASTM, 1998) mediante el filtrado con bomba de vacío de un volumen conocido de agua empleándose filtros

de microfibras de vidrio Whatman® de 0.7 µm de tamaño de poro previamente tarados. Posteriormente se secaron los filtros en una estufa a 60°C y el contenido de materia suspendida se obtuvo por diferencia entre el peso seco del filtro antes y después de filtrar el agua.

2.3.4. Análisis de pesticidas en agua

Los pesticidas presentes en el agua fueron analizados siguiendo la metodología descrita por Kampioti *et al.*, (2005) y Kuster *et al.*, (2008) mediante *extracción de fase sólida acoplada a una cromatografía en fase líquida y espectrometría de masas en tándem* (SPE-LC-MS/MS).

El proceso de **extracción** se realizó con la ayuda de un procesador automático *en continuo* de extracción en fase sólida Prospekt-2 (Spark Holland, Emmen, Países Bajos) configurado para grandes volúmenes de muestra.

En el proceso de extracción se usaron cartuchos de Resina GP Hysphere y cartuchos PLRP-s dependiendo de los pesticidas a extraer. En ambos casos tras la carga de las muestras, los cartuchos fueron lavados con 1mL de agua y eluidos con la fase móvil cromatográfica.

La **separación** se realizó por cromatografía líquida (Suárez-Serrano *et al.*, 2010) mediante una columna capilar de Purospher STAR RP-18e (125 x 2mm, 5µm de diámetro de partícula) de Waters Alliance 2690 (Milford, MA, USA) y un gradiente de acetonitrilo/agua como fase móvil.

La **detección** MS/MS se realizó en el modo SRM (*selected reaction monitoring*) añadiendo dos transiciones SRM por compuesto mediante un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Quattro de Micromass (Manchester, Reino Unido).

En total se midieron los siguientes pesticidas en agua: seis triazinas (atrazina, simazina, cianizina, desetil atrazina, terburilazina, deisopropil atrazina), cuatro fenilureas (diurón, isoproturón, linurón, clorotolurón) cuatro organofosfatos (diazinón, dimetoato, fenitrotión, malatión), un tiocarbamato (molinato) y cuatro herbicidas ácidos (mecropop, 2,4 D, bentazona y MCPA).

2.4. Análisis de datos

Durante las campañas de muestreo se llevó un registro de la **mortalidad** de las ostras en los diferentes puntos de muestreo, para expresar finalmente los resultados como % de mortalidad.

El **análisis estadístico** del conjunto de resultados obtenidos se realizó a partir de cuatro bases de datos generadas a partir de todos los resultados obtenidos en el trabajo:

Materiales y Métodos

- Base de datos de los análisis bioquímicos realizados en las muestras de branquias, músculo aductor y glándula digestiva de los 10 replicados por punto y campaña de muestreo en los dos años de estudio.
- Base de datos de metales acumulados en ostras (de 5 replicados por cada punto y campaña de muestreo de cada año).
- Base de datos de análisis de pesticidas encontrados en el agua de cada bahía y cada campaña de muestreo en el 2008.
- Base de datos de parámetros físico-químicos de aguas en cada punto y campaña de muestreo de los dos años de estudio.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa de IBM SPSS Statistics versión 19.

Se realizó una transformación logarítmica de los datos, previa al análisis estadístico, para cumplir con las condiciones de normalidad y homocedasticidad de varianzas (Zar, 1996).

En lo relativo al contenido de metales en ostras; las diferencias entre a los puntos y periodos de muestreo relativas a los niveles iniciales de metales dentro de cada año de estudio, se analizaron mediante un ANOVA de una vía y a continuación un análisis de comparación múltiple de Dunnett. El efecto del punto, periodo de muestreo y año en el contenido de metales fue analizado con una ANOVA de tres vías. Debido al diseño de muestreo descompensado (en el año 2009 se realizaron sólo dos periodos de muestreo y en el punto F1 sólo se pudo realizar el primer muestreo), los análisis quedaron restringidos al periodo inicial y final de muestreo (T1 y T4) y a los tres puntos en los que se disponían estos dos periodos de muestreo en año 2009 (A1, A2 y F2). Para identificar las fuentes de variabilidad en los niveles de metales en las ostras muestreadas a través de los puntos, periodos y años se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, Principal Component Analysis) con las respuestas proporcionales relativas a los valores iniciales.

El efecto del punto y el periodo de muestreo sobre las B-esterasas analizadas en músculo y branquias se analizó mediante un ANOVA de dos vías y a continuación un test de comparación múltiple de Tukey. Se realizó un análisis de correlación de Pearson para explorar las relaciones entre los parámetros físico-químicos del agua y las actividades B-esterasas. Para evitar un número excesivo de falsas correlaciones significativas debido a las correlaciones inherentes entre las variables fisicoquímicas, se realizó un análisis de correlación bi-variante comparando las actividades B-

esterasas con los *scores* de los Componentes Principales. Los *scores* se obtuvieron a partir de un Análisis de Componentes Principales (PCA) de las variables fisicoquímicas.

La comparación entre los niveles basales al inicio de los transplantes T0 de los biomarcadores analizados en glándula digestiva y branquias de los dos años de estudio se realizó mediante un análisis T-Student. Dado que la mayoría de los biomarcadores estudiados reflejaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles basales de los dos años de estudio, los efectos del año, punto y periodo de muestreo sobre los biomarcadores estudiados en glándula digestiva y branquias se analizaron a partir de las respuestas relativas a los valores iniciales (% de variación respecto a niveles iniciales) mediante una ANOVA de tres vías. De nuevo, debido a la descompensación del diseño de muestreo anteriormente explicada, se consideraron sólo dos periodos de muestreo (T1 y T4) y tres puntos (A1, A2 y F2).

Para explorar las relaciones entre los efectos biológicos en los años 2008 y 2009 y las variables ambientales estudiadas se llevaron a cabo dos Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*): uno de ellos con los datos del año 2008 que incluyó los residuos de pesticidas en agua y otro análisis realizado con los dos años de estudio, sin incluir los pesticidas ya que no se disponían de éstos datos en el año 2009. Estos dos análisis se realizaron con el objetivo de evaluar si los pesticidas presentes en el agua contribuyen o no a las respuestas biológicas observadas.

RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Monitorización de los parámetros ambientales del agua en las bahías de Alfacs y Fangar durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas en los arrozales del Delta del Ebro.

3.1.1. Parámetros fisicoquímicos del agua

Los parámetros físico químicos del agua (temperatura, conductividad, oxígeno, pH y sólidos en suspensión) se monitorizaron los dos años del trabajo durante el periodo de estudio (inicios de mayo – finales de junio) en los cuatro puntos de muestreo. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros físico-químicos del agua determinados en los puntos y periodos de muestreo en los dos años de estudio (2008 y 2009)

Año	Bahía	Punto	Periodo	Fecha	T (°C)	Conductividad (mS/cm)	Oxígeno (%)	pH	Sólidos en suspensión (mg/L)
2008	ALFACS	A1	1	05-may	21.23	539	90.1	8.09	25.1
			2	23-may	18.55	514	79.7	8.09	23.3
			3	02-jun	20.87	495	85.9	7.96	21.8
			4	16-jun	22.46	493	87.2	8.10	16.4
		A2	1	05-may	21.05	541	85.2	8.04	24.5
			2	23-may	18.60	519	81.4	8.07	22.1
			3	02-jun	21.60	508	85.9	8.00	23.8
			4	16-jun	22.49	488	91.3	8.16	19.5
	FANGAR	F1	1	05-may	21.37	441	98.9	8.40	19.2
			2	23-may	18.76	396	119.5	8.19	22.3
			3	02-jun	20.78	498	97.1	8.06	22.4
			4	16-jun	22.14	481	93.2	8.26	18.0
		F1	1	05-may	22.41	487	92.6	8.35	24.7
			2	23-may	18.80	368	112.1	8.26	21.4
			3	02-jun	22.03	501	111.4	8.10	20.1
			4	16-jun	22.98	514	95.2	8.07	19.3
2009	ALFACS	A1	1	11-may	20.51	618	107.7	8.06	21.0
			4	15-jun	23.30	590	95.2	8.18	1.80
		A2	1	11-may	20.40	607	102.9	8.05	24.8
			4	15-jun	24.30	588	96.4	8.20	2.70
	FANGAR	F1	1	18-may	21.48	582	107.0	8.10	5.20
			4	22-jun	24.61	544	93.4	8.48	4.50
		F2	1	18-may	20.49	621	106.8	8.18	7.80
			4	22-jun	24.34	577	87.8	8.39	8.50

La temperatura del agua registró valores entre 18.5 y 23°C en el año 2008 y entre 20.4 y 24.6°C en el año 2009. En ambos años se observó un incremento de temperatura de

Resultados

Mayo a Junio, acompañado de un descenso de los niveles de oxígeno. Los valores de conductividad del agua muestran un leve descenso de Mayo a Junio que se repite los dos años de estudio en la bahía de Alfacs. La bahía de Fangar, sin embargo muestra un ascenso de conductividad del agua en el año 2008 y un descenso en el año 2009.

Los sólidos en suspensión mostraron valores similares entre puntos de muestreo y bahías, siendo mucho más bajos en el año 2009.

El pH del agua se mostró estable en el tiempo y sin diferencias apreciables entre puntos ni bahías durante los dos años de estudio.

3.1.2. Niveles de contaminantes presentes en el agua

Los resultados de los contaminantes presentes en el agua de las bahías proceden de un estudio simultáneo realizado en el año 2008 en los mismos puntos de muestreo (Köck *et al.*, 2010). Desafortunadamente no se disponen de datos relativos a los contaminantes presentes en las bahías en el año 2009.

Los pesticidas analizados incluyen seis triazinas (atrazina, simazina, cianizina, desetilatrazina, terbutilazina, deisopropilatrazina), cuatro fenilureas (diurón, isoproturón, linurón, clortolurón) cuatro organofosfatos (diacinón, dimetoato, fenitrotión y malatión) una anilida (propanil), dos cloracetanilidas (alaclor, metaloclor) un tiocarbamato (molinato) y cuatro herbicidas ácidos (mecropop, 2,4 D, bentazona y MCPA). Los resultados del análisis de cada una de las muestras se encuentran en las tablas A2 y A3 del Apéndice. En la tabla 3.2. se representa un resumen de los resultados agrupando los datos por tipos de pesticidas e indicando la frecuencia de detección, el mínimo y el máximo de las concentraciones observadas para cada grupo de pesticidas en los dos puntos de cada bahía.

Los resultados indican la presencia de 18 de los 22 pesticidas analizados al menos en una de las muestras analizadas. Dos fenilureas (linurón y clortolurón) y dos triazinas (cianizina y deisopropil atrazina) fueron los únicos contaminantes que no se detectaron en ninguna de las muestras.

De entre los grupos de compuestos analizados los herbicidas ácidos, los organofosforados y triazinas son los encontrados con mayor frecuencia y mayor concentración en el agua de las bahías. Los pesticidas organofosforados (principalmente fenitrotión y malatión) (Tabla A2 del Apéndice) alcanzaron niveles de hasta $0.4 \mu\text{g l}^{-1}$ en la bahía de Alfacs. Los niveles de residuos de triazinas alcanzan en la bahía de Alfacs niveles de $0.3 \mu\text{g/l}$ en Mayo.

En la figura 3.1 se representan gráficamente la concentración total de pesticidas en cada campaña de muestreo y para las dos bahías de estudio.

Tabla 3.2. Niveles de pesticidas (ng l⁻¹) agrupado por clases de compuestos determinados en las muestras de aguas durante el año 2008. Para abreviar sólo se muestran las medias, máximos y frecuencia de detección por cada bahía y periodo de muestreo.

	ALFACS											
	T1			T2			T3			T4		
	Media	Max	Det. (%)	Media	Max	Det. (%)	Media	Max	Det. (%)	Media	Max	Det. (%)
Herbicidas Ácidos	91.4	227.6	100	177.7	274.1	100	182.1	228.4	100	326.3	411.9	100
Anilidas y Cloroacetanilidas	11.9*	46.1	25	24.7	77.4	60	32	56.4	100	104.5	190.5	100
Organofosfatos	16.3	32.5	100	125.4	402.2	100	28.6	51.8	100	37.5	109.7	100
Fenilureas	5.8	17.1	50	9.5	17.2	80	13	29	67	12	18.2	100
Tiocarbamatos	9.7	23.1	50	80.1	154.8	80	39.2	60.8	100	67.2	128	100
Triazinas	88.6	240.6	100	166.4	305.8	100	23.9*	70.7	33	4.4	6.4	100

	FANGAR											
	T1			T2			T3			T4		
	Media	Max	Det. (%)	Media	Max	Det. (%)	Media	Max	Det. (%)	Media	Max	Det. (%)
Herbicidas Ácidos	367.6	526.7	100	200.7	317.4	100	197.8	246.5	100	404.2	500.4	100
Anilidas y Cloroacetanilidas	49.1*	146.4	33	< L.D	-	0	43.2	86.4	100	202.6	360.8	100
Organofosfatos	44.3	73.2	100	53	207.6	100	72.9	147.2	100	23.4	61.6	100
Fenilureas	28.8	40.6	100	13.8	26.8	60	13.8	20.1	100	10	17.5	67
Tiocarbamatos	97.5	156.7	67	168.1	274.9	100	108.3	189.1	100	41.7	50.1	100
Triazinas	78.2	119.4	100	50.9	80.9	100	17.6	47.8	67	3.5	6.6	67

*Casos en los que sólo se encontró una muestra por encima del límite de detección.

Resultados

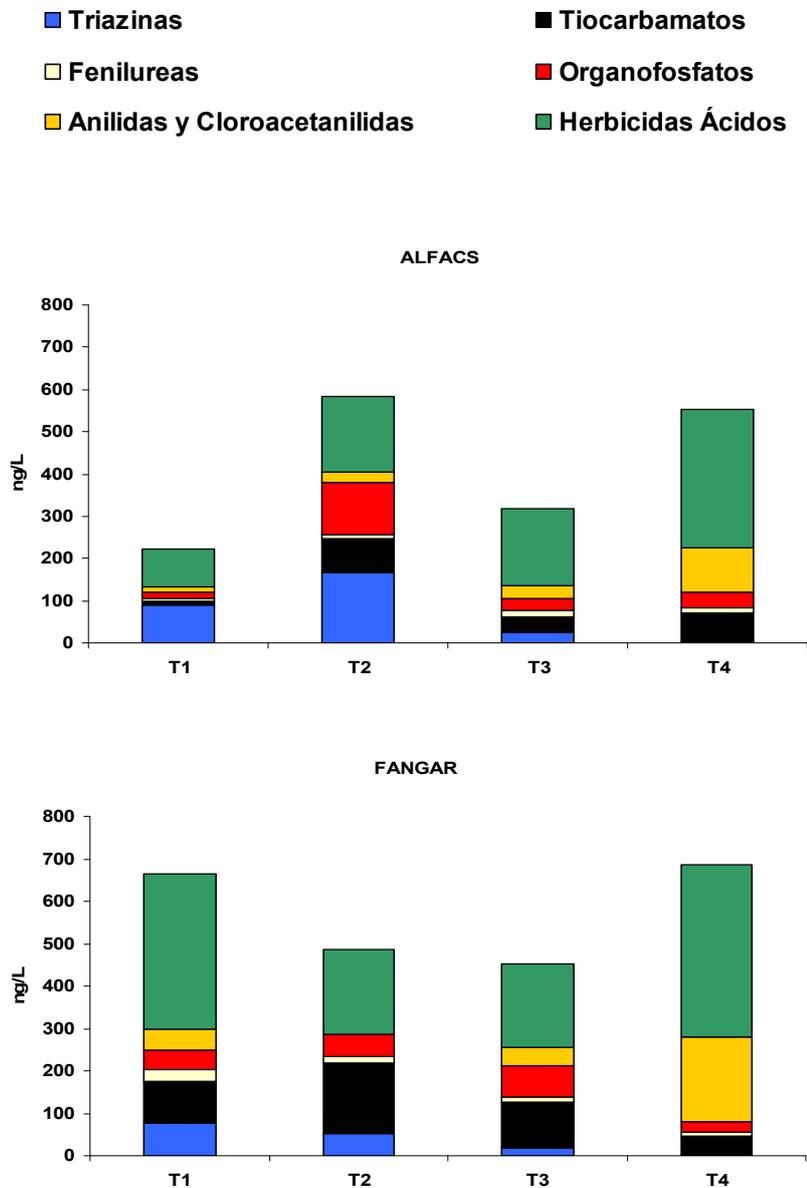


Figura 3.1. Concentración total de los pesticidas analizados en las dos bahías (Alfacs y Fangar) en los cuatro periodos de muestreo (T1, T2, T3 y T4) del año 2008. Las fechas que se corresponden con cada periodo muestreo están indicadas en la Tabla 2.3 de Materiales y Métodos.

La Figura 3.1. indica que la concentración total de pesticidas fue similar entre ambas bahías salvo en el primer periodo de muestreo (T1) en el que la concentración total en la bahía de Fangar fue 3 veces superior a la de Alfacs (en su mayor parte, consecuencia del mayor contenido de herbicidas ácidos). Ambas bahías alcanzaron niveles aproximados de 600 ng/L al final del periodo de estudio (Junio).

Los pesticidas mayoritarios de ambas bahías fueron los herbicidas ácidos (principalmente bentazona y MCPA) (Tabla A2 del Apéndice) que suponen casi el 50% del total de pesticidas encontrados. Los tiocarbamatos se encontraron más presentes en la bahía de Fangar y los pesticidas organofosforados alcanzaron las mayores concentraciones en el segundo periodo de muestreo (T2) de la bahía de Alfacs. Los niveles del resto de pesticidas analizados variaron a lo largo del estudio de forma similar en ambas bahías, mostrando una mayor presencia de triazinas (principalmente bentazona y MCPA) (Tabla A3 del Apéndice) en los primeros periodos de muestreo (T1 y T2) y una mayor proporción de anilidas (en su mayor parte propanil) (Tabla A2 del Apéndice) en los dos últimos periodos de muestreo (T3 y T4). Las fenilureas apenas representan el 1-2 % del total de pesticidas encontrados en las bahías del Delta del Ebro.

3.2. Monitorización del contenido de metales pesados en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro

3.2.1. Concentración de metales en las ostras

Los metales analizados se encuentran por encima de los límites de detección (de Hg: 0.06; Pb: 0.03; Cd: 0.03; As: 0.001; Cu: 0.2 y Zn: 1.7 en $\mu\text{g g}^{-1}$ ps) en todas las muestras de ostra analizadas.

En la Figura 3.2 se representan los resultados de concentración de los metales pesados (Media \pm error estándar; n=5) en las ostras iniciales (previo al trasplante) de cada año de estudio y en las ostras transplantadas en cada punto y periodo de muestreo de los dos años de estudio.

Resultados

3.2.2. Patrones de variación del contenido de metales en las ostras

Para comparar la concentración de metales en las ostras transplantadas en cada punto y muestreo, con el contenido inicial de metales en las ostras previo a los trasplantes se realizó un ANOVA de una vía y a continuación un análisis *post hoc* de Dunnet. Los resultados de dicho análisis se encuentran representados en la Fig 3.2. e indican que los niveles de Hg y Pb disminuyen respecto a los niveles iniciales (T0) en las ostras transplantadas, siendo este descenso mucho más acusado en los puntos localizados en la bahía de Alfacs en el año 2009. Los niveles de Cd descendieron en mayor grado en los puntos situados en Fangar en el año 2008. Por el contrario los niveles de As aumentaron en las ostras transplantadas en Alfacs, siendo tal efecto mayor en el año 2009. Los patrones de acumulación de los metales esenciales Cu y Zn indican que estos metales descendieron sólo en un punto de muestreo situado en la bahía de Fangar en el 2008.

Para evaluar si el patrón de acumulación de metales en ostra variaron en años consecutivos durante el periodo de estudio y los lugares de muestreo se realizó una ANOVA de tres vías sobre el contenido de metales relativo al valor inicial de cada año. Este análisis se limitó a tres sitios (A1, A2, F2) y dos periodos (T1, T4) para obtener un diseño balanceado (ver sección 2.4 para mayor explicación). Los resultados del ANOVA están representados en la Tabla 3.3 e indican efectos significativos ($p < 0.05$) del punto, del periodo de muestreo o de su interacción (punto x periodo) sobre los metales no esenciales (Hg, Pb, Cd y As). Los efectos del factor año por sí sólo o de su interacción con el punto o el periodo de muestreo también fueron significativos ($P < 0.05$) para Hg, Pb, Cd y As. En definitiva, los patrones de acumulación respecto al contenido inicial (T0) de metales en ostras variaron a través de los puntos y periodos de muestreo y en menor medida entre años (Fig 3.2.).

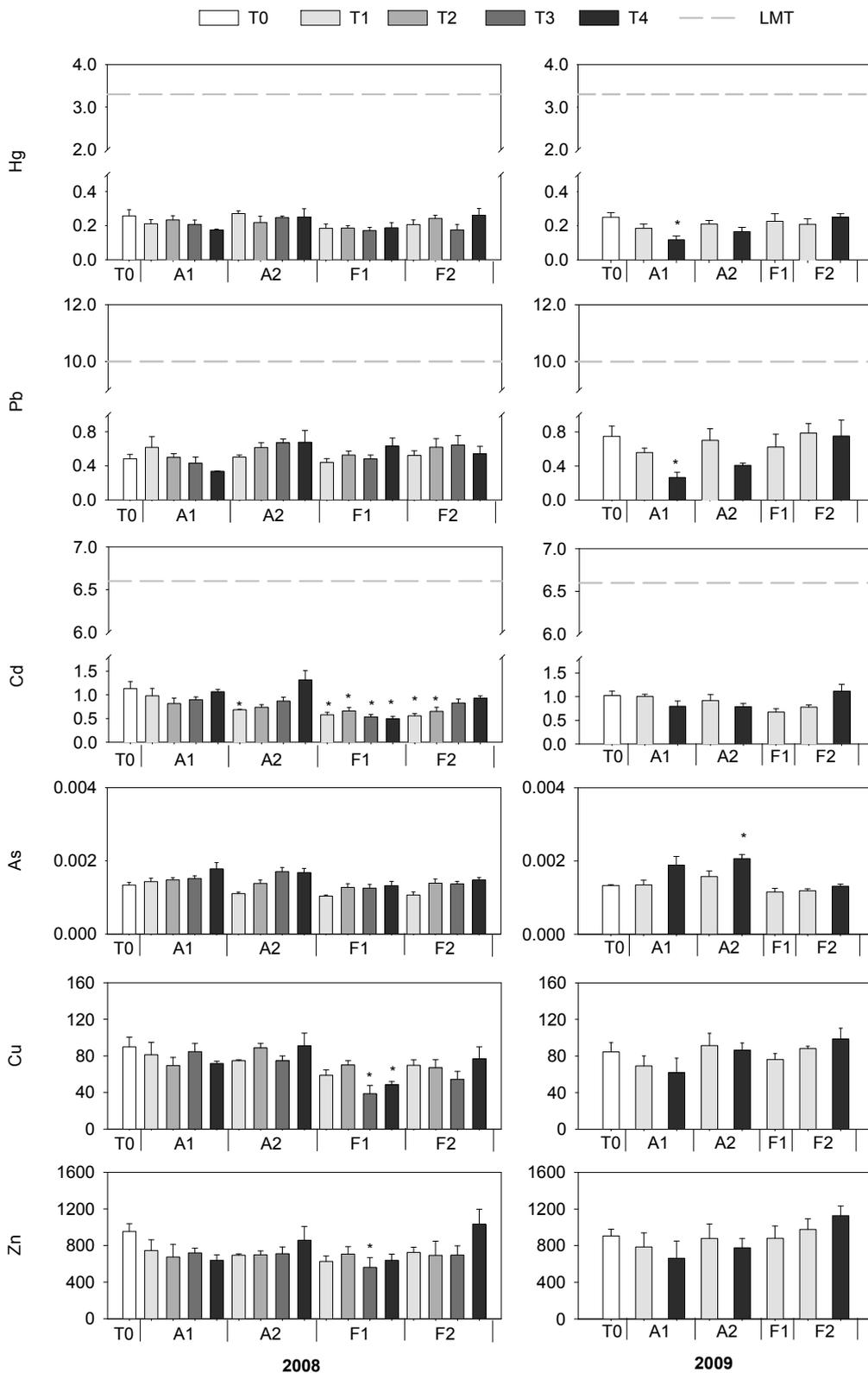


Figura 3.2. Concentración de metales pesados (Media ± Error estándar, N=5) determinados en *Crassostrea gigas* (µg g⁻¹ p.s.). A1 y A2 representan los puntos localizados en la bahía de Alfacs y F1 y F2 representan los puntos situados en Fangar. Las barras en blanco indican la concentración de metales pesados en las ostras utilizadas para iniciar los trasplantes cada año. Las barras grises-negras indican la concentración de metales en las ostras transplantadas a través de los puntos y los periodos y los años. * Indica diferencias significativas (P<0.05) respecto a los niveles iniciales dentro de cada año según una ANOVA de una vía seguida de un análisis *post hoc* de Dunnet. La línea discontinua indica los máximos límites de tolerancia (LMT) para Hg, Pb y Cd en bivalvos asumiendo un 85% de contenido en agua.

Resultados

Tabla 3.3. ANOVA de tres vías para la evaluación de los efectos del año, punto y periodo de muestreo sobre los niveles de metales para las ostras de estudio. Para simplificar sólo se representan los grados de libertad (gl), el coeficiente (F) de Fisher y los niveles de significancia (P)

	Punto (P)			Tiempo (T)			Año (A)			PxT			PxA			PxTxA					
	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P			
Hg	2,44	4.32	0.019	1,44	1.2	0.278	1,44	5.96	0.019	2,44	3.68	0.033	2,44	1.45	0.246	1,44	0.8	0.376	2,44	0.23	0.798
Pb	2,45	6.7	0.003	1,45	9.02	0.004	1,45	0.03	0.856	2,45	4.42	0.018	2,45	3.05	0.057	1,45	3.84	0.056	2,45	0.96	0.392
Cd	2,44	1.74	0.188	1,44	9.04	0.004	1,44	0	0.958	2,44	5.33	0.008	2,44	4.07	0.024	1,44	11.31	0.002	2,44	1.84	0.171
As	2,45	9.94	<0.001	1,45	33.64	<0.001	1,45	2.9	0.096	2,45	0.59	0.56	2,45	4.06	0.024	1,45	0.78	0.382	2,45	1	0.376
Cu	2,39	2.35	0.108	1,39	0,00	0.959	1,39	0.02	0.888	2,39	0.7	0.502	2,39	2.11	0.135	1,39	0.32	0.577	2,39	0.09	0.914
Zn	2,40	3.35	0.045	1,40	0.04	0.847	1,40	0.08	0.78	2,40	1.46	0.245	2,40	0.53	0.595	1,40	0.85	0.363	2,40	0.01	0.993

3.2.3. Análisis de componentes principales del patrón de acumulación de metales en las ostras.

El patrón de variación de la acumulación de metales queda mejor explicado por el análisis de componentes principales (PCA) realizado con los niveles de metales acumulados respecto a los niveles iniciales (datos porcentuales). Los resultados de dicho análisis generaron dos componentes principales que explican un total de un 66.2% de la varianza de los datos. En la Figura 3.3. se realiza una representación *Bi-plot* con estos dos componentes. Dicha representación, en primer lugar, separa los metales esenciales (Cu, Zn) de los no esenciales (Pb, Hg, As, Cd) otorgando cargas (*loadings*) positivas y altas para Cu y Zn en la componente PC1 y situando ambos metales cercanos uno del otro.

Los niveles acumulados de Pb y Hg tienen cargas (*loadings*) positivas y altas para PC2, mientras que el As tiene cargas (*loadings*) negativas y altas para el mismo componente principal. Los niveles de Cd se situaron entre los metales esenciales y el As.

La localización de los *scores* de los puntos de muestreo en la representación *Bi-plot* identificó un patrón de acumulación opuesto para Pb, Hg y As. El Pb y el Hg descienden en las ostras transplantadas en Alfacs, mientras que el As aumenta en dicha bahía. Cd, Zn y Cu, por otro lado tienden a descender en los puntos situados en Fangar (Figura 3.3).

Resultados

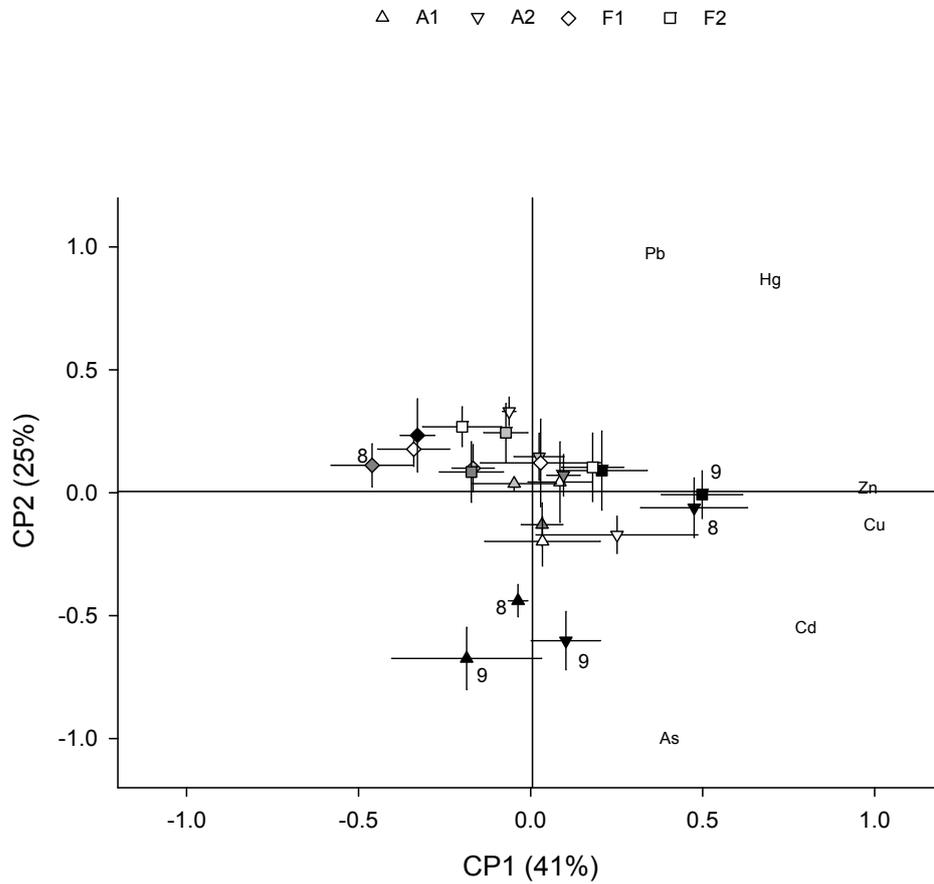


Figura 3.3. Representación Bi-plot de los dos componentes principales derivados del PCA realizado con los niveles de metales acumulados en las otras transplantadas respecto a los niveles iniciales a través de los puntos periodos de muestreo y años. Los *scores* están representados como Media \pm Error estándar (N=5). Los símbolos en blanco, gris, gris oscuro y negro indican las muestras tomadas desde principios de Mayo a finales de Junio respectivamente (T1-T4). Para simplificar sólo se marcaron los años de los *scores* extremos (con 8 para el 2008 y 9 para el 2009).

3.3. Monitorización de la actividad de las B-esterasas en las ostras cultivadas en las bahías del Delta del Ebro

3.3.1 Actividad de la AChE, PChE y CbE durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas en el delta del Ebro

La actividad de las dos colinesterasas (acetilcolinesterasa, AChE y propionilcolinesterasa, PChE) y de la carboxilesterasa (CbE) analizadas en branquias y músculo aductor de *Crassostrea gigas* se representa en la Figura 3.4.

Las tres enzimas analizadas se encontraron presentes en ambos tejidos y se localizaron predominantemente en las branquias mostrando actividades hasta 8 veces mayores en el caso de las colinesterasas y 6 veces mayores en el caso de la carboxilesterasa en branquias que en músculo aductor.

La variación espacial y temporal de la actividad B-esterasa en *Crassostrea gigas* se analizó mediante una ANOVA de dos vías junto con un test de comparación múltiple de Tukey, cuyos resultados se representan en la Tabla 3.4 y la Figura 3.4. Los resultados indican diferentes patrones de respuesta entre los puntos y los periodos de muestreo para cada tejido analizado.

El tiempo fue el factor más importante a la hora de explicar la variabilidad de los datos, afectando a la actividad de la AChE y de la PChE en el músculo aductor y a la CbE de branquias. La AChE y PChE analizada en músculo aductor varía de forma paralela a lo largo del tiempo de estudio en los diferentes puntos de muestreo, mostrando un ligero descenso de actividad de Mayo a Junio (Figura 3.5).

En la mayoría de los casos no se aprecian diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los puntos de muestreo a excepción de una mayor actividad encontrada en las ostras transplantadas en el punto F2 con respecto al resto de puntos de muestreo (Figura 3.4). La interacción entre los dos factores de estudio (punto x tiempo) no mostró efectos significativos ($p < 0.05$) en ninguna de las tres enzimas analizadas.

Resultados

Tabla 3.4. ANOVA de dos vías para la evaluación de los efectos del punto y periodo de muestreo sobre las colinesterasas analizadas en branquias y músculo aductor de las ostras transplantadas. Para simplificar sólo se representan los grados de libertad (gl) el valor de la (*F*) del coeficiente de Fisher y los niveles de significancia (*P*)

Branquias	Punto			Tiempo			Interacción		
	gl	<i>F</i>	<i>P</i>	Gl	<i>F</i>	<i>P</i>	gl	<i>F</i>	<i>P</i>
AChE	3,133	3.157	0.027	3,133	1.305	0.276	9,133	1.156	0.328
PChE	3,134	2.176	0.094	3,134	0.589	0.623	9,134	0.853	0.569
CbE	3,136	2.527	0.06	3,136	6.624	<0.001	9,136	0.731	0.68
Músculo aductor									
AChE	3,133	0.319	0.811	3,133	2.94	0.036	9,133	0.669	0.735
PChE	3,134	0.707	0.549	3,134	3.039	0.031	9,134	0.912	0.517
CbE	3,132	1.048	0.373	3,132	1.204	0.311	9,132	0.382	0.942

Resultados

3.3.2. Relaciones causales entre los parámetros ambientales y las actividades B-esterasas

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para evaluar las relaciones entre los parámetros fisicoquímicos del agua y las actividades enzimáticas. Para evitar un número elevado de falsas correlaciones debido a las correlaciones inherentes entre las variables fisicoquímicas, se realizó a priori un análisis de componentes principales de las variables físico-químicas del agua y posteriormente un análisis de correlaciones bivariantes comparando las actividades enzimáticas con los scores de los Componentes Principales. Para minimizar el número de variables presentes en el PCA, los pesticidas del agua se agruparon en seis clases según Köck (2010) del siguiente modo: organofosfatos (diazinón, dimetoato, fenitrotión, malatión), triazinas (atrazina, simazina, dianizina, desntilatrazina, deisopropilatrazina) fenilueras (diurón, isoproturón, linurón, clorotolurón), el tiocarbamato molinato, anilidas y cloracetanilidas (alaclor, metolaclor, propanil) y herbicidas ácidos (mecoprop, 2,4 D, MCPA).

El análisis de PCA tuvo como resultado cuatro componentes que explican el 90% de la varianza. La representación gráfica en los ejes de los dos principales componentes indica que el PCA estuvo determinado por cargas (*loadings*) positivas de los pesticidas ácidos y negativas para las triazinas y los sólidos en suspensión (Figura 3.5). El PC2 estuvo principalmente afectado por cargas positivas de los tiocarbamatos y pesticidas organofosforados y negativas para la conductividad. Los análisis de correlación evidenciaron un coeficiente de Pearson significativo ($P < 0.05$, $n = 16$) y positivo para las actividades de AChE y PChE en branquias con el PC 1 (0.55 y 0.54, respectivamente) y negativo y significativo (-0.66 ; $P < 0.05$; $n = 16$) de la CbE de branquias con el PC2 (Figura 3.6).

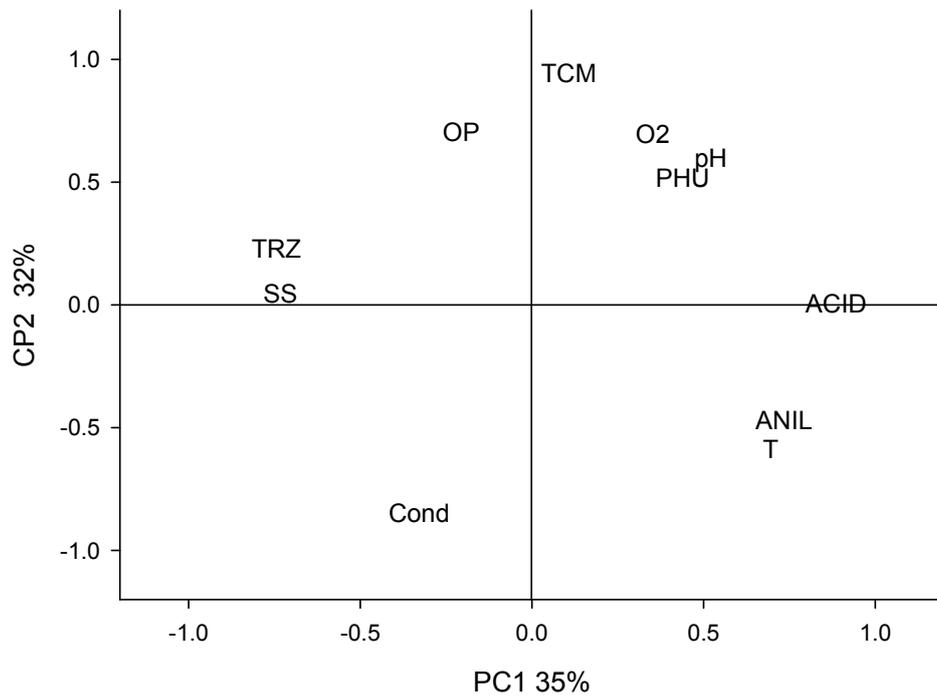


Figura 3.5. Representación de los dos componentes principales del PCA realizado con los parámetros físico-químicos estudiados. SS, T, O₂, pH, Cond son respectivamente sólidos en suspensión, temperatura, oxígeno disuelto, pH y conductividad. TRZ, TCM, PHU, ACID y ANIL son respectivamente: triazinas, tiocarbamatos, fenilureas, herbicidas ácidos y anilidas

Resultados

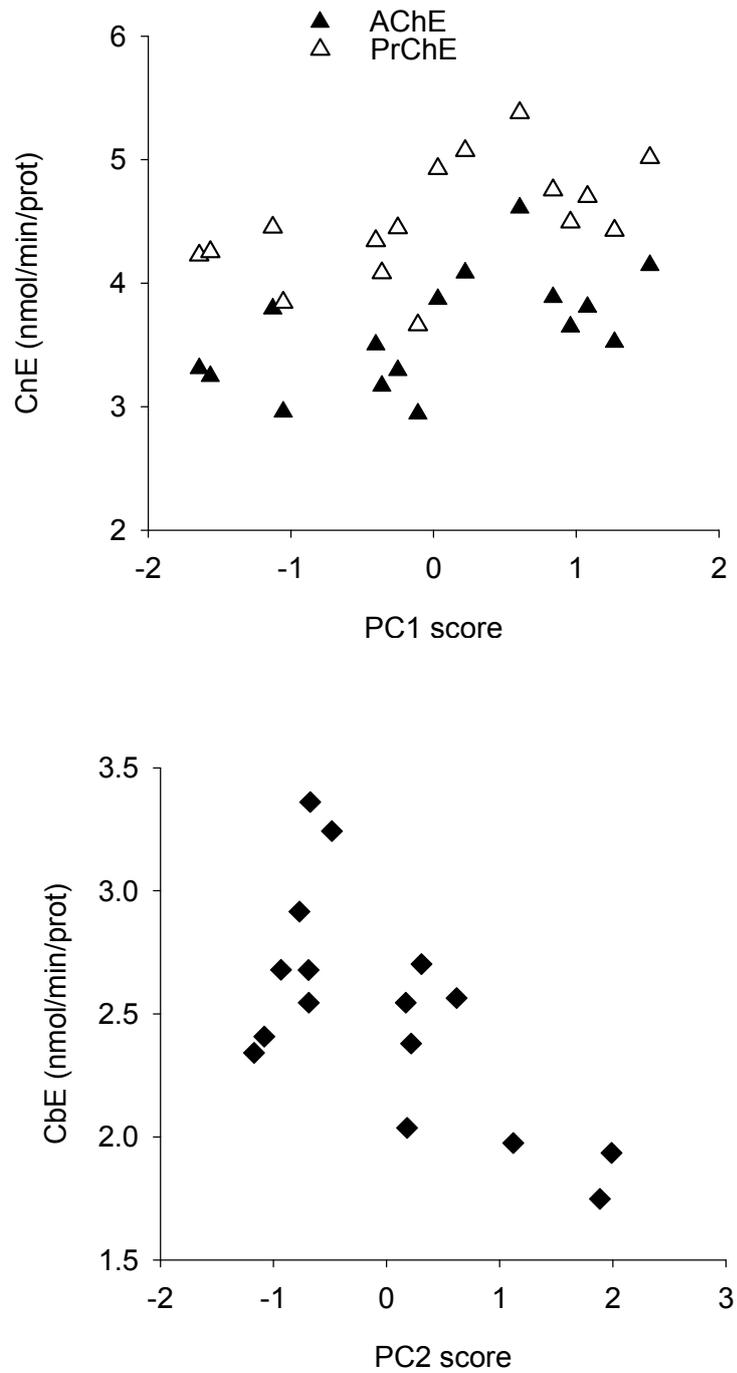


Figura 3.6. Relación entre las actividades ChE y CbE en branquias de ostras y los scores del PC1 y del PC2 de las variables ambientales obtenidas en la Figura 3.5

3.4. Respuestas biológicas de las ostras durante el periodo de aplicación máxima de pesticidas en el Delta del Ebro

3.4.1. Monitorización de biomarcadores en ostras cultivadas en el Delta del Ebro

Además del análisis de las B-esterasas en músculo y branquias presentados en el apartado anterior, se analizó toda una batería de biomarcadores de estrés oxidativo en la glándula digestiva y branquias tanto en las ostras iniciales (previo al trasplante) como en las ostras transplantadas en cada punto de muestreo y en los sucesivos periodos de muestreo durante los dos años de estudio. Su finalidad tal como se explica en el apartado 1.6 fue la de determinar efectos biológicos nocivos de los pesticidas y otros factores ambientales en la ostra durante el periodo de estudio. Para este fin se determinaron las actividades y niveles de acetilcolinesterasa (AChE), glutatión (GSH), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidación de lípidos (LPO) y daños en ADN en branquias y glutatión (GSH), glutatión reductasa (GR), glutatión-S-transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa total (GPxT) y dependiente de selenio (GPx-Se), peroxidación de lípidos(LPO), Lipofuscina (LPF), y daños en ADN en glándula digestiva. Los resultados originales de dichos análisis se representan en las Figuras A2-A7 del Apéndice.

3.4.2. Patrones de variación de las respuestas biológicas en ostras transplantadas durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas

Se realizó un análisis T-Sudent para comparar los niveles basales de los biomarcadores analizados en los dos años de estudio. Los resultados de dicho análisis se encuentran representados en la Tabla 3.5. Los resultados indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles basales de ambos años de estudio en la mayoría de los biomarcadores (14 de los 19 biomarcadores analizados).

En lo que respecta a los biomarcadores analizados en branquias, la actividad inicial de la CAT y los niveles iniciales de LPO son entre 1.5 y 2 veces superiores en el año 2008 que en el siguiente año de estudio, mientras que la actividad inicial ChE, GST, SOD y los daños iniciales en el ADN son 1- 2 veces superiores en el año 2009. El contenido en GSH y la actividad GR son los únicos biomarcadores de las branquias que no presentan diferencias significativas entre los niveles iniciales de ambos años.

Resultados

Tabla 3.5. Comparación de los niveles basales de los biomarcadores analizados en las ostras empleadas para iniciar los trasplantes los dos años de estudio (2008 y 2009). El asterisco (*) en la columna encabezada con "t" indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre años tras un análisis T-Student. La actividad colinesterasa (ChE), glutatión reductasa (GR), glutatión-S- transferasa (GST), glutatión peroxidasa total (GPxT) y dependiente de selenio (GPx Se) están expresadas en nmo/min/mg prot, la actividad catalasa (CAT) está expresada en $\mu\text{mol/min/mg prot}$, la superóxido dismutasa (SOD) en U/mg prot, los niveles de glutatión (GSH) en nmol/g p.h. y los niveles de daños en las cadenas de ADN como $\mu\text{g DNA/g p.h.}$ Las unidades para la peroxidación de lípidos (LPO), lipofuscina (LPFs) y niveles de lípidos (LIPID) son nmol MDA/g p.f., unidades arbitrarias de fluorescencia/ μg lípido y % de peso fresco respectivamente.

Branquias	2008			2009			t
	N	Media	Error	N	Media	Error	
AChE	8	1.7	0.3	10	3.2	0.3	*
GSH	8	73.3	3.2	9	77.9	6.8	
GR	8	2.9	0.3	10	4.2	0.7	
GST	7	15.1	1.8	9	42	5.9	*
SOD	8	13.4	1	8	16.8	1.1	*
CAT	8	186.8	23.8	10	99.3	8.3	*
LPO	7	6.2	0.6	10	4	0.3	*
ADN	5	1667.7	27.1	10	2619	180.5	*
Glándula Digestiva							
GSH	8	66	6.4	9	128.7	9.1	*
GR	9	5.3	0.5	9	8.6	0.7	*
GST	8	11.2	1.1	7	22.4	1.5	*
SOD	8	14.7	1.1	9	27.1	2.8	*
CAT	9	93.1	5.2	9	302.9	34.5	*
GPxSe	7	4.3	0.5	8	3.1	0.4	
GPxT	7	11.8	0.6	9	11	0.8	
LPO	8	31.1	11.7	6	6.9	0.9	*
LPFs	4	915.7	58.5	6	482.7	21.8	*
ADN	8	1282.2	92.2	9	1821.3	197.7	*
LIPID	8	0.9	0.07	6	0.9	0.06	

En el caso de la glándula digestiva a excepción de la actividad GPx y el contenido de lípidos el resto de biomarcadores analizados muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los niveles iniciales registrados en los dos años de estudio. En concreto, la actividad inicial de la GSH, GR, GST y SOD y los daños basales en el ADN son del orden de 1.5-2 veces superiores en el año 2009 y la actividad CAT es hasta 3 superior en el 2009. Los niveles iniciales de peroxidación lipídica y de lipofuscina, sin embargo, son respectivamente 4.5 y 2 veces superiores en el año 2008.

Debido a las diferencias entre los niveles basales de los años 2008 y 2009, las comparaciones de las respuestas biológicas en las ostras transplantadas en los dos años de estudio se realizaron en base a las respuestas proporcionales a los valores iniciales de cada año (% de variación respecto a valores iniciales).

En las Tablas 3.6. y 3.7 se representan las respuestas de todos los biomarcadores analizados en branquias y glándula digestiva de las ostras para cada punto y campaña de muestreo en los dos años de estudio (como respuestas proporcionales a los valores iniciales). En dichas tablas también se incluye los resultados de los ANOVAs de una vía donde se comparan los valores de cada biomarcador en ostras transplantadas en cada lugar y muestreo con su valor inicial (las diferencias significativas se encuentran representadas con asteriscos en la Tabla 3.6 y 3.7.) Se observa que en el 2008 los niveles/actividades de GSH, GST en branquia; GR, GST y CAT en glándula digestiva variaron más respecto al valor inicial. Lo mismo se observó en el 2009 para GST en branquia y LPO, LPF en glándula digestiva.

Un estudio más exhaustivo de estas diferencias se realizó mediante un ANOVA de tres vías. Desafortunadamente, debido al desequilibrio en el diseño de muestreo, el análisis de varianza se tuvo que realizar considerando los dos años de muestreo (2008 y 2009), dos periodos de muestreo (T1 y T4) y tres puntos (A1, A2 y F2). Esto se debe a que en el año 2009 los periodos de muestreo se restringieron a dos (T1 y T4) y en el mismo año (2009) en el punto F1 sólo se pudo realizar un muestreo (T1). En la Tabla 3.8. se representan los resultados de dicho análisis de varianza.

Los patrones de respuesta espacial y temporal quedan reflejados en las figuras 3.7. y 3.8. donde se realiza una representación gráfica de los resultados de los biomarcadores (como respuestas proporcionales a los valores iniciales) para los tiempos T1 y T4 de los puntos A1, A2 y F2.

[Nota: Los resultados originales de los biomarcadores se encuentran en el apéndice (Figuras A2-A7)].

Resultados

Tabla 3.6. Respuestas proporcionales a los valores iniciales de los biomarcadores analizados en branquias y glándula digestiva de *Crassostrea gigas* en el año 2008. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los valores iniciales tras un ANOVA y un análisis *post hoc* de Dunnet están indicadas con un asterisco.

2008 Branquias																									
Punto	Periodo	ChE			GSH			GR			GST			SOD			CAT			LPO			ADN		
		N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error
A1	1	10	1.18	0.18	8	0.76	0.07 *	10	1.17	0.10	10	5.64	0.58 *	8	0.84	0.06 *	8	0.76	0.06	8	1.02	0.09	6	0.97	0.09
	2	10	1.19	0.22	6	0.96	0.08	10	1.28	0.06	9	5.33	0.53 *	10	0.99	0.07	8	0.78	0.12	10	1.02	0.11	8	1.04	0.08
	3	10	1.10	0.15	8	0.73	0.11 *	10	1.43	0.15	7	6.87	0.82 *	9	1.09	0.12	8	0.73	0.06	10	0.85	0.07	7	0.96	0.09
	4	10	1.19	0.24	8	0.86	0.11	6	1.19	0.03	9	6.72	0.61 *	9	0.98	0.07	7	1.03	0.15	10	0.85	0.06	8	1.01	0.08
A2	1	9	1.28	0.16	8	1.10	0.11	8	1.32	0.10	10	4.81	0.61 *	9	0.97	0.07	7	0.80	0.12	9	0.89	0.12	7	0.92	0.02
	2	8	1.05	0.23	7	0.97	0.11	8	1.18	0.06	7	4.01	0.25 *	8	1.09	0.07	7	0.78	0.12	9	0.86	0.08	5	0.96	0.09
	3	10	1.10	0.25	9	0.83	0.14 *	9	1.14	0.12	9	7.48	0.67 *	9	1.10	0.09	8	1.04	0.18	8	0.86	0.09	7	0.98	0.06
	4	9	1.33	0.27	9	0.79	0.08 *	9	1.37	0.16	8	5.93	0.65 *	8	0.99	0.10	8	0.79	0.05	8	0.98	0.10	7	0.95	0.09
F1	1	9	1.29	0.11	9	1.01	0.13	10	0.91	0.09	7	2.09	0.14	10	0.87	0.06	9	0.89	0.08	9	0.93	0.09	8	0.94	0.04
	2	8	1.17	0.16	9	0.77	0.08 *	9	0.94	0.13	8	3.08	0.56	10	0.92	0.11	8	0.81	0.12	9	0.90	0.09	6	0.84	0.05
	3	9	1.18	0.10	10	0.90	0.12	10	0.91	0.10	10	3.97	0.54 *	9	0.81	0.07	5	1.01	0.06	9	0.99	0.11	6	1.15	0.03
	4	9	1.19	0.36	8	1.03	0.10	8	1.38	0.14	7	4.71	0.51 *	9	0.93	0.09	9	1.09	0.07	10	1.03	0.09	8	0.95	0.04
F2	1	10	1.07	0.30	8	1.16	0.12	9	1.07	0.12	10	2.70	0.47	10	1.03	0.08	8	0.97	0.14	9	0.80	0.15	8	1.00	0.08
	2	10	1.32	0.14	9	0.94	0.06	10	0.95	0.09	8	2.48	0.29	10	0.96	0.08	8	1.05	0.12	10	0.82	0.07	8	0.78	0.05
	3	8	1.45	0.21	7	0.75	0.05 *	9	1.20	0.08	8	3.90	0.34 *	8	0.90	0.05	5	0.96	0.06	10	0.97	0.07	6	0.92	0.02
	4	10	1.11	0.23	8	0.90	0.09	8	1.40	0.09	9	4.53	0.36 *	7	1.03	0.06	9	1.09	0.06	10	0.96	0.09	6	0.96	0.05

2008 Glándula digestiva																																		
Punto	Periodo	GSH			GR			GST			SOD			CAT			GPXTot			GPXse			LPO			LPF			ADN			LIPID		
		N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error			
A1	1	10	0.96	0.14	7	1.94	0.06 *	8	1.05	0.08	9	1.14	0.06	10	0.95	0.12	8	0.90	0.08	8	0.88	0.06	7	0.93	0.08	10	0.82	0.06	7	0.89	0.06	7	1.48	0.16
	2	8	1.11	0.06	10	2.19	0.12 *	9	1.20	0.10	8	1.21	0.07	10	1.28	0.12	8	0.85	0.11	8	0.85	0.09	10	1.36	0.24	10	1.00	0.14	10	1.32	0.10	10	1.05	0.09
	3	9	1.12	0.16	10	2.57	0.18 *	7	1.43	0.13 *	9	1.20	0.09	8	1.36	0.04 *	8	1.00	0.13	8	0.81	0.08	9	0.77	0.12	10	1.08	0.06	10	1.27	0.12	9	0.79	0.13
	4	8	1.57	0.16 *	10	2.19	0.23 *	10	1.67	0.14 *	10	1.07	0.07	10	1.37	0.09 *	8	0.96	0.12	8	0.94	0.05	9	0.56	0.09	9	1.00	0.09	9	1.42	0.18	9	1.15	0.15
A1	1	9	1.13	0.11	8	2.54	0.09 *	9	1.24	0.14	8	1.04	0.04	9	1.14	0.10	8	0.99	0.07	8	0.84	0.07	9	0.99	0.19	10	0.84	0.07	7	0.83	0.05	9	1.12	0.13
	2	7	1.23	0.17	9	2.16	0.23 *	7	1.29	0.14	8	1.07	0.08	9	1.30	0.11	8	0.84	0.04	8	0.81	0.08	9	0.76	0.10	10	1.17	0.12	10	1.33	0.08	9	1.02	0.11
	3	9	1.13	0.17	10	2.26	0.17 *	10	1.38	0.12	8	1.13	0.05	9	1.46	0.09 *	8	1.00	0.10	8	0.87	0.04	7	1.13	0.27	7	1.32	0.14	9	1.33	0.18	7	1.15	0.18
	4	8	1.25	0.06	10	2.20	0.19 *	10	1.58	0.13 *	8	1.23	0.07	10	1.92	0.16 *	8	0.88	0.11	8	0.86	0.07	6	0.73	0.13	9	1.11	0.14	10	1.36	0.07	6	1.16	0.23
F1	1	8	0.85	0.04	9	2.27	0.20 *	8	1.14	0.16	7	1.01	0.07	9	1.53	0.14 *	8	0.86	0.07	8	0.91	0.07	8	1.39	0.23	9	0.87	0.12	10	1.23	0.15	8	1.35	0.13
	2	10	1.12	0.08	9	2.24	0.20 *	8	1.23	0.10	8	1.04	0.06	9	1.29	0.14	8	0.86	0.07	8	0.90	0.06	9	0.96	0.10	9	1.00	0.06	10	1.19	0.14	9	0.96	0.10
	3	8	1.27	0.07	9	2.36	0.19 *	9	1.59	0.08 *	8	1.08	0.03	8	1.33	0.12	8	0.85	0.13	6	0.81	0.05	7	0.71	0.12	7	1.03	0.05	8	1.64	0.09 *	7	0.98	0.17
	4	9	1.38	0.09 *	8	2.45	0.15 *	8	1.93	0.13 *	9	1.16	0.06	10	1.91	0.16 *	5	0.85	0.03	8	0.88	0.07	9	1.67	0.28	8	1.00	0.10	8	1.40	0.08	9	1.57	0.16
F2	1	8	1.19	0.16	8	2.23	0.20 *	8	0.93	0.08	8	1.18	0.07	10	1.79	0.13	8	0.86	0.06	8	0.83	0.07	9	1.40	0.27	8	0.95	0.08	8	1.11	0.13	9	1.38	0.12
	2	10	0.79	0.12	9	2.09	0.19 *	9	1.06	0.10	7	0.87	0.04	10	1.06	0.10	8	0.83	0.12	8	0.81	0.06	9	1.16	0.31	8	1.11	0.13	9	1.16	0.18	9	1.05	0.18
	3	10	1.28	0.12	10	2.16	0.18 *	7	1.68	0.14 *	7	0.97	0.08	9	1.52	0.15 *	8	0.82	0.06	8	0.83	0.07	10	0.72	0.14	8	0.96	0.05	9	1.48	0.18	10	1.22	0.14
	4	10	1.79	0.14 *	10	2.15	0.16 *	10	2.16	0.18 *	8	1.10	0.01	8	2.01	0.12 *	8	0.84	0.05	6	0.97	0.02	10	1.14	0.19	10	1.22	0.11	10	1.31	0.08	10	1.16	0.16

Tabla 3.7. Respuestas proporcionales a los valores iniciales de los biomarcadores analizados en branquias y glándula digestiva de *Crassostrea gigas* en el año 2009. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los valores iniciales tras un ANOVA y un análisis *post hoc* de Dunnet están indicadas con un asterisco.

2009 Branquias																																		
Punto	Periodo	ChE			GSH			GR			GST			SOD			CAT			LPO			ADN											
		N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error									
A1	1	10	1.18	0.10	10	1.07	0.09	10	0.76	0.11	10	3.02	0.30 *	10	1.20	0.11	9	0.96	0.07	9	1.34	0.09	9	0.89	0.08									
	4	9	0.98	0.06	7	1.01	0.03	9	1.04	0.06	10	1.95	0.24 *	10	1.48	0.09 *	10	0.91	0.07	9	1.07	0.10	9	1.04	0.03									
A2	1	9	0.90	0.08	10	1.22	0.12	10	0.75	0.07	10	2.92	0.25 *	8	1.16	0.09	10	1.06	0.10	10	1.29	0.14	9	0.93	0.04									
	4	8	0.92	0.03	10	1.30	0.17	10	0.91	0.07	10	2.06	0.26 *	7	1.39	0.11 *	8	0.86	0.05	10	1.00	0.15	9	1.06	0.06									
F1	1	7	1.11	0.06	10	0.96	0.09	9	0.96	0.05	6	1.47	0.06	8	1.21	0.04	9	1.00	0.08	9	1.16	0.06	10	1.00	0.07									
F2	1	9	1.20	0.06	10	1.12	0.11	8	0.80	0.09	10	1.87	0.12 *	9	1.21	0.08	10	1.01	0.08	10	1.28	0.13	10	1.02	0.06									
	4	10	1.14	0.08	8	1.16	0.11	10	0.90	0.14	10	1.58	0.12	7	1.31	0.08	8	0.79	0.04	7	0.86	0.06	10	1.03	0.05									
2009 Glándula digestiva																																		
Punto	Periodo	GSH			GR			GST			SOD			CAT			GPXTot			GPXse			LPO			LPF			ADN			LIPID		
		N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error	N	Media	Error			
A1	1	7	0.87	0.03	10	1.13	0.10	9	0.73	0.08	9	1.15	0.10	9	0.81	0.04	9	0.80	0.06	8	0.84	0.05	7	1.62	0.22	7	1.57	0.09	10	1.01	0.11	7	1.15	0.08
	4	10	0.98	0.07	8	0.84	0.04	9	0.94	0.07	10	1.29	0.11	10	0.84	0.08	9	1.02	0.06	10	1.12	0.08	10	1.95	0.25 *	10	1.88	0.17 *	10	1.10	0.08	10	1.20	0.12
A2	1	8	0.84	0.06	8	1.21	0.07	7	0.71	0.06	8	1.28	0.17	6	0.79	0.02	7	0.81	0.04	6	0.82	0.03	7	1.83	0.28	6	1.66	0.15 *	7	1.12	0.11	7	1.23	0.07
	4	10	0.82	0.06	9	1.00	0.08	10	1.07	0.08	6	1.43	0.09	9	0.94	0.08	10	1.01	0.04	10	0.98	0.05	8	2.17	0.22 *	8	1.92	0.16 *	7	1.00	0.02	8	1.13	0.05
F1	1	10	0.73	0.05 *	8	1.04	0.06	9	0.68	0.10 *	10	1.07	0.14	9	0.81	0.08	9	0.83	0.06	9	0.86	0.07	8	1.94	0.21 *	9	1.72	0.18 *	9	1.02	0.06	8	1.35	0.18
F2	1	10	0.84	0.08	10	1.08	0.05	9	0.74	0.06	10	1.07	0.13	10	0.95	0.11	7	0.83	0.06	9	1.11	0.05	6	1.46	0.06	8	1.71	0.13 *	10	1.07	0.11	6	1.19	0.05
	4	10	0.61	0.07 *	10	0.99	0.04	10	0.72	0.06	9	1.39	0.16	10	0.86	0.09	10	1.27	0.06 *	10	1.19	0.11 *	7	2.05	0.16 *	8	1.88	0.17 *	9	0.99	0.04	7	1.10	0.04

Resultados

Tabla 3.8. ANOVA de tres vías para la evaluación de los efectos del año, punto y periodo en los marcadores de las ostras estudiadas. Para simplificar sólo se representan los grados de libertad (gl), el valor del coeficiente (*F*) de Fisher, los niveles de significancia (*P*). Las abreviaciones de los biomarcadores están descritas en la tabla 3.4.

Branquias	Punto (P)			Tiempo (T)			Año (A)			PxT			PxA			TxA			PxTxA		
	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	Gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
ChE	2,101	1.61	0.18	1,101	0.49	0.487	1,101	1.2	0.126	2,101	2.03	0.137	2,101	2.03	0.136	1,101	0.01	0.918	2,101	1.93	0.258
GSH	2,94	0.85	0.43	1,94	0.03	0.861	1,94	1.47	0.228	2,94	2.59	0.08	2,94	2.2	0.117	1,94	9.08	0.003	2,94	0.63	0.536
GR	2,93	2.72	0.07	1,93	1.25	0.266	1,93	2.55	0.114	2,93	0.74	0.479	2,93	0.07	0.931	1,93	0.68	0.41	2,93	0.48	0.622
GST	2,104	12.59	<0.01	1,104	0.33	0.569	1,104	157.43	<0.01	2,104	0.1	0.904	2,104	2.58	0.081	1,104	13.47	<0.01	2,104	0.46	0.633
SOD	2,90	0.06	0.95	1,90	6.47	0.013	1,90	40.46	<0.01	2,90	0.82	0.445	2,90	1.4	0.252	1,90	2.23	0.139	2,90	0.1	0.909
CAT	2,90	1.01	0.37	1,90	0.09	0.764	1,90	0.21	0.648	2,90	1.62	0.205	2,90	2.74	0.07	1,90	7.49	0.007	2,90	0.21	0.811
LPO	2,97	0.71	0.49	1,97	5.02	0.027	1,97	11.72	0.001	2,97	0.28	0.759	2,97	0.12	0.884	1,97	7.19	0.009	2,97	1.05	0.354
ADN	2,86	0.34	0.71	1,86	1.87	0.174	1,86	0.58	0.449	2,86	0.87	0.423	2,86	0.53	0.589	1,86	1.35	0.248	2,86	0.07	0.929
Glándula Digestiva																					
GSH	2,96	1.19	0.31	1,96	10.94	0.001	1,96	112.08	<0.01	2,96	7.99	0.001	2,96	0.81	0.446	1,96	6.78	0.011	2,96	2.19	0.117
GR	2,96	2.53	0.09	1,96	2.72	0.102	1,96	230.71	<0.01	2,96	0.96	0.387	2,96	0.46	0.634	1,96	0.84	0.363	2,96	1.66	0.195
GST	2,97	1.04	0.36	1,97	31.62	<0.01	1,97	68.46	<0.01	2,97	0.28	0.753	2,97	0.23	0.794	1,97	7.89	0.006	2,97	4.15	0.019
SOD	2,91	0.63	0.54	1,91	3.16	0.079	1,91	5.55	0.021	2,91	0.41	0.662	2,91	0.45	0.638	1,91	2.28	0.135	2,91	1.01	0.367
CAT	2,99	14.68	<0.01	1,99	1.23	0.269	1,99	100.94	<0.01	2,99	0.18	0.832	2,99	10.51	<0.01	1,99	0.4	0.531	2,99	0.98	0.379
GPX-Se	2,88	0.39	0.68	1,88	1.28	0.262	1,88	6.54	0.012	2,88	1.92	0.153	2,88	5.74	0.005	1,88	5.81	0.018	2,88	0.1	0.907
GPX-T	2,87	1.11	0.34	1,87	13.47	<0.01	1,87	22.01	<0.01	2,87	0.2	0.82	2,87	12.95	<0.01	1,87	22.74	<0.01	2,87	4.15	0.019
LPO	2,83	1.53	0.22	1,83	0.26	0.61	1,83	55.14	<0.01	2,83	0.22	0.81	2,83	2.92	0.06	1,83	8.95	<0.01	2,83	0.09	0.91
LPF	2,91	0.98	0.38	1,91	11.38	0.001	1,91	116.16	<0.01	2,91	0.03	0.968	2,91	0.25	0.781	1,91	0.01	0.938	2,91	0.22	0.802
ADN	2,92	0.19	0.83	1,92	11.04	0.001	1,92	3.26	0.074	2,92	1.66	0.196	2,92	0.52	0.595	1,92	15.51	<0.01	2,92	0.79	0.456
LIPID	2,83	1.589	0.21	1,83	4.314	0.041	1,83	0.101	0.751	2,83	0.929	0.399	2,83	0.475	0.624	1,83	0.029	0.864	2,83	0.27	0.764

BRANQUIAS

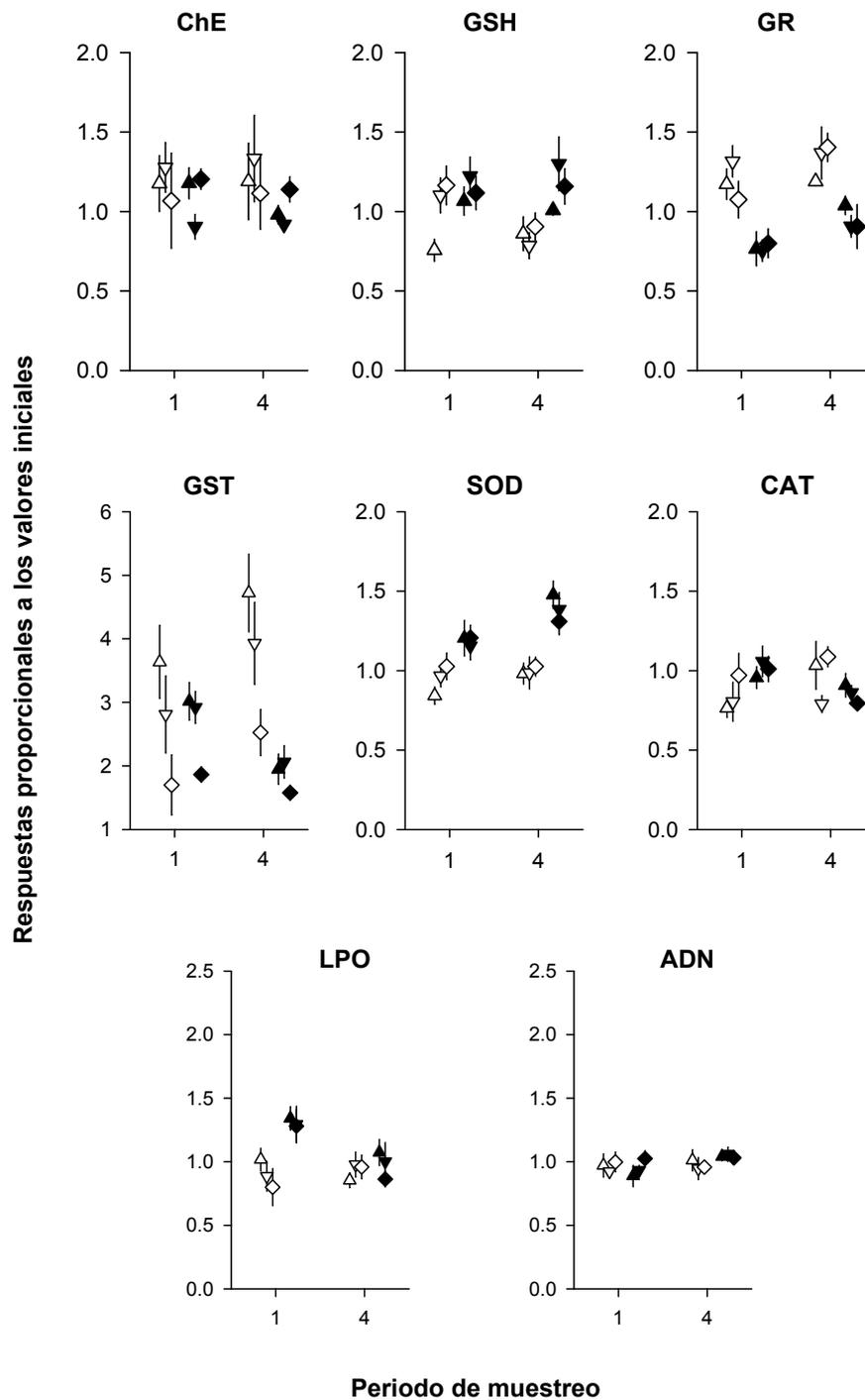


Figura 3.7. Respuesta de los biomarcadores analizados en branquias (Media \pm Error estándar, N=10) medidos en las ostras trasplantadas entre los puntos de estudio, para los periodos 1 y 4 de los dos años de estudio. Los triángulos y rombos se corresponden con los puntos de Alfacs y Fangar respectivamente (el triángulo se corresponde con el punto A1, el triángulo invertido con el punto A2 y el rombo con el punto F2). Los símbolos vacíos y negros corresponden a las ostras del 2008 y 2009, respectivamente.

GLANDULA DIGESTIVA

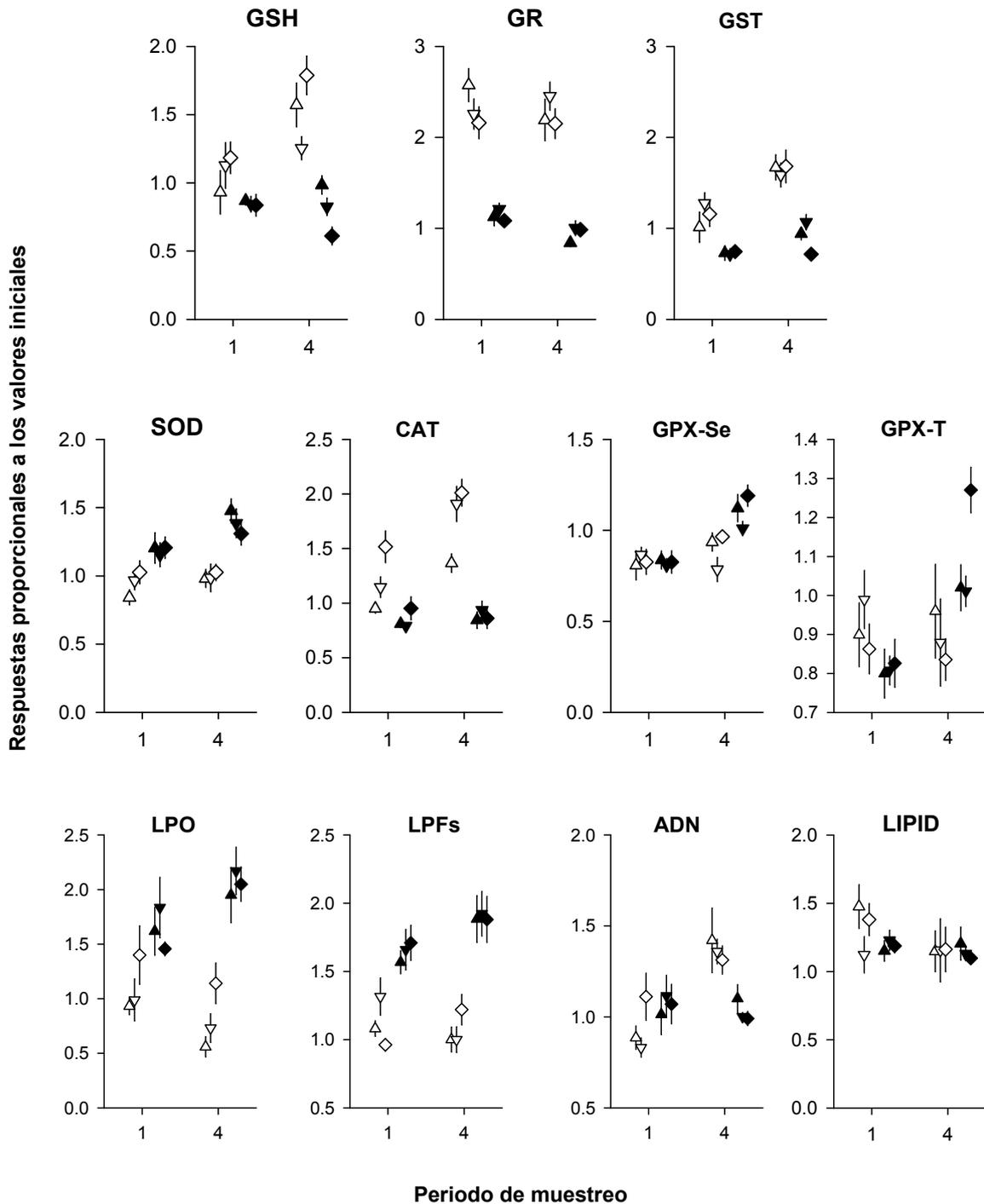


Figura 3.8. Respuesta de los biomarcadores analizados en glándula digestiva (Media \pm Error estándar, N=10) medidos en las ostras trasplantadas entre los puntos de estudio, para los periodos 1 y 4 de los dos años de estudio. Los triángulos y rombos se corresponden con los puntos de Alfacs y Fangar, respectivamente (el triángulo se corresponde con el punto A1, el triángulo invertido con el punto A2 y el rombo con el punto F2). Los símbolos vacíos y negros corresponden a las ostras del 2008 y 2009, respectivamente.

Los resultados indican patrones de variación diferentes entre puntos, periodos de muestreo y año para los dos tejidos analizados.

El análisis de varianza (Tabla 3.8) y la Figura 3.7. indican que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) para todos los biomarcadores analizados en **branquias** a excepción de ChE, GR y ADN respecto a alguno de los tres factores analizados (año, tiempo y punto) o de sus interacciones. El contenido de GSH en branquias se encuentra influenciado por la interacción “Tiempo x Año” debido a que presenta diferentes patrones temporales en función del año, en concreto se observa un ligero descenso del contenido de glutatión (GSH) en el año 2008, mientras que en el año 2009 se mantiene estable (Fig. 3.7.). Según la Tabla 3.8. y la Figura 3.7. la actividad glutatión S transferasa (GST) se encuentra influenciada por el factor “punto” (la actividad es mayor en los puntos situados en Aflacs), el factor “año” (la actividad es mayor en el año 2008) y por la interacción (“Tiempo x Año”) ya que en el 2008 se observa un aumento de actividad mientras que en el 2009 desciende. La actividad superóxido dismutasa (SOD) en branquias se encuentra influenciada por el factor “tiempo” (se aprecia un ascenso en el tiempo) y el factor “año” (en el año 2009 es mayor) (Fig. 3.7.). El análisis de varianza (Tabla 3.8) indica efectos de la interacción “Tiempo x Año” en la actividad catalasa (CAT) de branquias, ya que en el año 2008 se observa un ligero ascenso mientras que en el año 2009 se aprecia un descenso de la CAT (Figura 3.7.). La peroxidación de lípidos (LPO) en branquias presenta efectos significativos ($p < 0.05$) respecto a los factores “tiempo” y “año” y a su interacción (“Tiempo x Año”) ya que la LPO es superior en el año 2009 pero experimenta un ligero descenso en el tiempo, mientras que en el año 2008 los niveles son inferiores y se muestran más estables en el tiempo.

La **glándula digestiva** presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los marcadores bioquímicos analizados a excepción del contenido de lípidos (Tabla 3.8). Según indica la Tabla 3.8 y la Figura 3.8., el contenido de glutatión (GSH) presenta diferencias respecto al factor “año” (mayor en el año 2008), la interacción “Punto x Tiempo” (el patrón temporal varía en función del punto de muestreo) y respecto a la interacción “Tiempo x Año” (en el año 2008 se aprecia un ascenso del contenido de GSH, mientras que en el 2009 se mantiene estable). La actividad glutatión reductasa (GR) indica un claro efecto del año (Figura 3.8. y Tabla 3.8), presentando mayor actividad en el año 2008. El análisis de varianza indica que la actividad GST se encuentra influenciada por el factor “tiempo”, “año” y las interacciones “Tiempo x Año”

Resultados

y “Punto x Tiempo x Año” (la actividad es mayor en el año 2008 y en este año muestra un ascenso en el tiempo, mientras que en el año 2009 la actividad es más baja y es más estable en el tiempo) (Figura 3.8.). El efecto de la interacción “Punto x Tiempo x Año” en la GST (Tabla 3.8) indica que los patrones de respuesta también varían en función del punto de muestreo. Los resultados del ANOVA (Tabla 3.8) y la Figura 3.8. indican que la actividad superóxido dismutasa (SOD) de la glándula digestiva fue mayor en el año 2009. La actividad catalasa (CAT) se encuentra influenciada por el factor “punto”, “año” y su interacción “Punto x Año” (Tabla 3.8) mostrando mayor actividad en los puntos situados en Alfacs y un incremento de actividad en el año 2008 (Figura 3.7.). El análisis de varianza (Tabla 3.8.) indica que las dos GPx analizadas (GPx-total y GPx dependiente de selenio) se encuentran influenciadas por el factor “año” (las actividades más altas se observan en el año 2009) y por la interacción “Punto x Año” (el patrón de variación anual depende del punto de muestreo). La actividad GPx-Total se encuentra además influenciada por el factor “tiempo” y la interacción “Punto x Tiempo x Año”, lo que significa que existe un patrón temporal que depende del año (en el año 2009 se aprecia un ascenso de la actividad que es mayor o menor dependiendo del punto de muestreo, mientras que en el año 2008 la actividad GPx-Total se mantiene más estable) (Figura 3.8.). El ANOVA indica que la LPO de glándula digestiva se encuentra influenciada por el factor “año” y su interacción con el tiempo (“Tiempo x Año”) (los niveles de LPO fueron mayores en el año 2009 y en el año 2009 se aprecia un importante incremento de LPO que no se produce en el año 2008) (Figura 3.8.). Los niveles de Lipofuscina muestran, según el ANOVA (Tabla 3.8), efectos del factor “tiempo” y del factor “año”, al igual que la LPO alcanzan mayores niveles en el 2009 y sufren un aumento con el tiempo en dicho año. El análisis de varianza indica, por último, que los daños en el ADN presentan efectos del factor “tiempo” y de su interacción con el año (“Tiempo x Año”) debido a que en el año 2008 se produce un incremento que no se produce en el año 2009.

Resumiendo, los resultados del ANOVA indican que el factor más influyente en el patrón de variación de las respuestas biológica es el “año”, afectando significativamente ($P < 0.05$) a 15 de los 19 marcadores analizados, ya sea por sí solo o por su interacción con el resto de factores (Tabla 3.8). El periodo de muestreo (factor “tiempo”) *per se* o su interacción también afecta significativamente ($P < 0.05$) a 12 de los 19 marcadores (Tabla 3.8).

En el año **2008** los biomarcadores de estrés oxidativo (CAT, SOD y GST en branquias y CAT, GST y contenido de GSH en glándula digestiva) incrementaron sus actividades/niveles de Mayo a Junio. Los marcadores de daños oxidativos (LPO,

Lipofuscina y ADN) se mantuvieron estables en el tiempo a excepción del ADN en glándula digestiva que mostró un incremento de Mayo a Junio (Figuras 3.7. y 3.8.).

En el año **2009** la mayoría de las actividades o niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo se mostraron mucho más estables en el tiempo o incluso redujeron su actividad (a excepción del incremento de la actividad de la SOD en branquias) y los niveles de los biomarcadores de daños oxidativos experimentaron un ascenso (LPO y LPF en glándula digestiva) de Mayo a Junio (Figuras 3.7. y 3.8.).

3.4.3. Mortalidad en ostras

El porcentaje de mortalidad en las ostras transplantadas fue bajo en año 2008, siendo nulo o negligible durante los tres primeros periodos y de 15, 19, 7 y 25% en los puntos de muestreo A1, A2, F1 y F2 respectivamente, al final de las exposiciones.

En el año 2009 las tasas de mortalidad fueron mayores , siendo de 5, 10, 12 y 20% en A1, A2, F1 y F2 respectivamente a principios de Mayo, incrementando dramáticamente después hasta el final de las exposiciones en Junio, alcanzando un 65, 70 y 80% para los puntos A1, A2 y F2 respectivamente.

3.4.4. Relaciones causales entre variables ambientales y respuestas biológicas

Las relaciones entre las variables ambientales y las respuestas observadas en los biomarcadores se analizaron mediante análisis de componentes principales (PCA).

Se realizó un primer PCA limitado a los datos del primer año de estudio (2008) para poder incluir los datos referentes a los residuos de pesticidas presentes en el agua (sólo disponibles en el 2008) de tal modo que se pudiesen establecer relaciones causales entre las variables ambientales (parámetros físico-químicos del agua y residuos de pesticidas presentes), el contenido de metales en las ostras, los patrones de respuesta de los biomarcadores y la mortalidad registrada en las ostras. Dicho análisis tuvo como resultado nueve componentes que explican el 92% de la varianza. La representación *bi-plots* de los dos primeros componentes (Fig 3.9.) diferenció las ostras estudiadas en varios grupos; por un lado aquellas ostras muestreadas a finales de junio (con un 15-25% de mortalidad) que presentaban *scores* positivos para los dos componentes principales representados (PC1 y PC2) y otro grupo formado por aquellas ostras muestreadas en Mayo, con *scores* negativos para el primer componente principal (PC1).

La temperatura, los herbicidas ácidos (como la bentazona) y anilidas (como el propanil) se muestran relacionados con los biomarcadores de daños en los tejidos

Resultados

(daños en el ADN) y se encuentran situados próximos a aquellas ostras muestreadas a finales de Junio.

Los niveles de metales, las triazinas, los tiocarbamatos (como el molinato), las fenilureas y los pesticidas organofosforados no se mostraron relacionados con los marcadores de daños en ostras y se situaron próximos a las ostras muestreadas en Mayo.

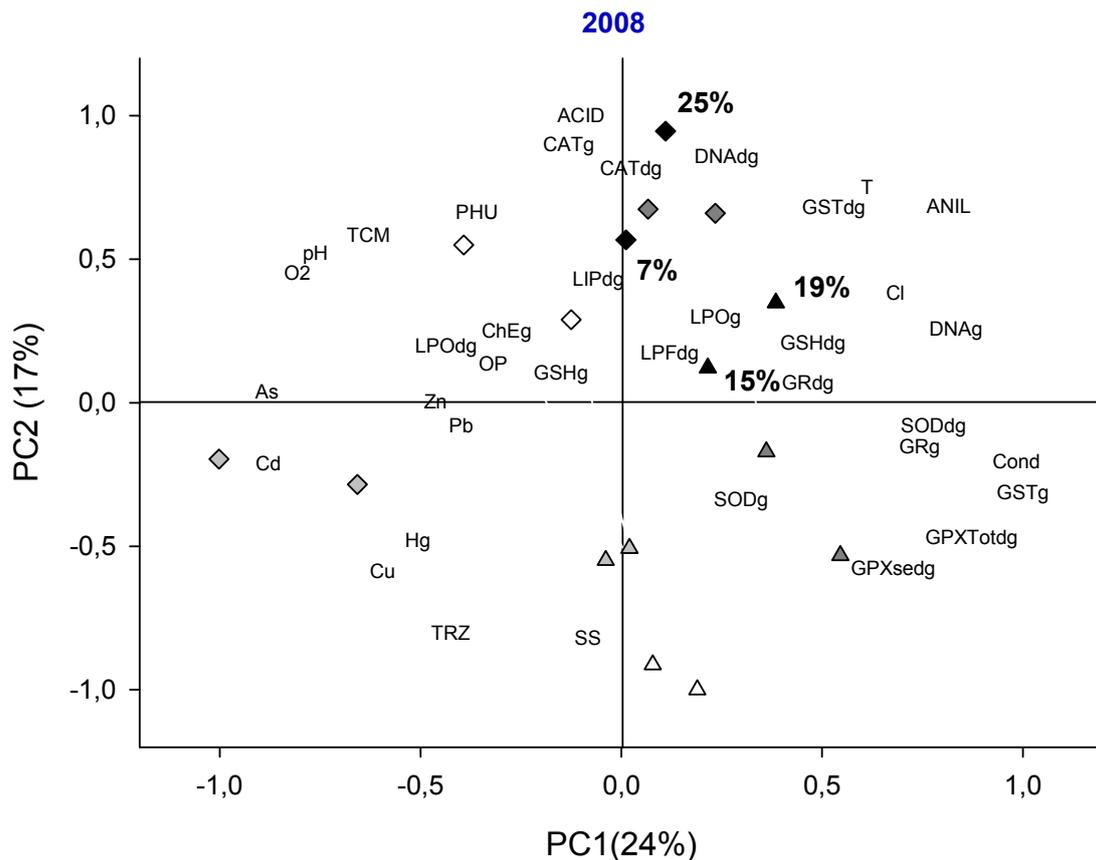


Figura 3.9. Bi-plots de los scores de los puntos y las cargas (loadings) de las variables para los dos primeros componentes del PCA realizado con las variables biológicas y ambientales del año 2008. Los triángulos y los rombos corresponden a los puntos de Alfacs y Fangar respectivamente. Los símbolos blanco, gris, gris oscuro y negro corresponden a las cuatro fechas de muestreo desde principios de Mayo a finales de Junio respectivamente. La mortalidad final (%) se encuentra indicada junto a su punto correspondiente. Las abreviaciones de los biomarcadores acabadas en g y dg corresponden a aquellos biomarcadores medidos en branquias (*gills*) y glándula digestiva (*digestive gland*) respectivamente. Las abreviaciones de los parámetros físico químicos del agua son temperatura (T), oxígeno (O₂), pH, conductividad (Cond), sólidos en suspensión (SS), pesticidas ácidos (ACID), anilidas (ANIL), tiocarbamatos (TCM), triazinas (TRZ), organofosforados (OP) y Fenilureas (PHU).

Se realizó un segundo análisis de componentes principales (PCA) con los parámetros fisicoquímicos del agua, el contenido de metales en ostra y respuestas biológicas de los dos años de estudio cuyos resultados indicaron siete componentes principales que explican el 85% de la varianza. Los primeros dos componentes, que explican hasta el 50% de la varianza, están representados en la figura 3.10. El primer componente principal (PC1) separa claramente las ostras de los dos años de estudio, que muestran un incremento de los daños en ADN y de los niveles de peroxidación lipídica así como una depresión de las defensas antioxidantes. El segundo componente principal (PC2) presenta un claro componente estacional separando las ostras de Mayo de las de Junio. Los mayores niveles de temperatura y salinidad observados en el 2009 también se muestran relacionados con los daños en las ostras, mientras que los niveles de metales se muestran muy poco relacionados con las respuestas biológicas.

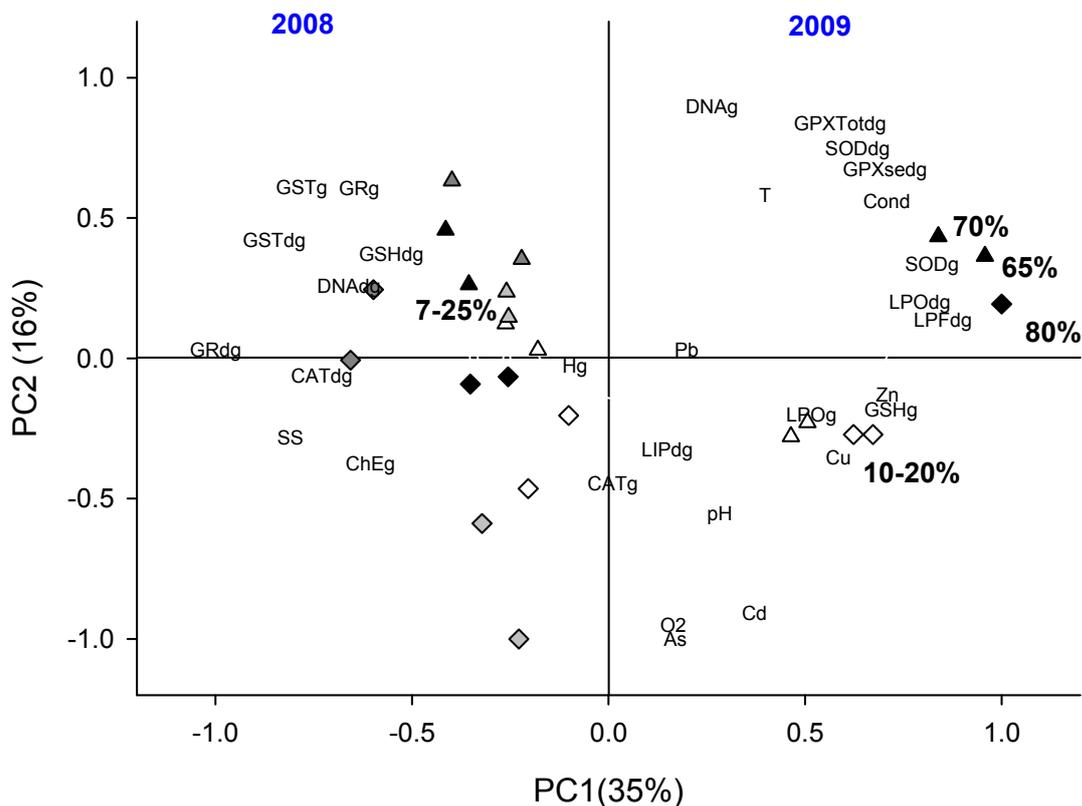


Figura 3.10. Bi-plots de los scores de los puntos y las cargas (loadings) de las variables para los dos componentes principales del PCA realizado con los datos de los dos años de estudio. La descripción de los símbolos y abreviaciones está descrita en la Fig 3.9.

DISCUSIÓN

4. Discusión

4.1. Variación espacio-temporal de los parámetros ambientales del agua en las bahías de cultivo de *Crassostrea gigas* durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas durante dos años consecutivos.

4.1.1. Variación espacio-temporal de los parámetros fisicoquímicos del agua

Las dos bahías donde se cultiva ostra en el delta del Ebro (la bahía de Alfacs y la bahía de Fangar) presentan características típicas Mediterráneas y ambas están sujetas a las mismas condiciones meteorológicas.

Durante el periodo de estudio (principios de Mayo- finales de Junio) de los dos años en los que se realizó el presente trabajo (2008 y 2009) la temperatura registró el incremento habitual del clima mediterráneo en primavera (ver Apéndice, Figura A1). Este ascenso de temperatura explica el incremento de temperatura del agua registrado los dos años de estudio durante las campañas de muestreo (ver Tabla 3.1.). El hecho de que el año 2009 fuese ligeramente más cálido también queda reflejado en la temperatura del agua más elevada en éste año. Como cabe de esperar, asociado al incremento de temperatura del agua, se observa un descenso en el % de oxígeno disuelto en agua.

Las precipitaciones registradas en el Delta del Ebro durante el mes de abril del año 2008 (ver Apéndice, Figura A1), tienen como consecuencia una mayor cantidad de sólidos en suspensión en el agua durante el periodo de estudio. Por el contrario, las bajas precipitaciones registradas en los meses de mayo y junio del año 2009 tienen como resultado una mayor estratificación del agua que queda reflejada en la baja concentración de sólidos en suspensión encontrada en dicho año.

Los descensos y aumentos de conductividad en el agua de las bahías se deben respectivamente a la entrada de agua dulce a través de los canales de drenaje y a la entrada de agua salada procedente del mar. Ambas bahías reciben entradas similares de agua dulce a través de los canales de riego. Sin embargo el volumen de la bahía de Alfacs es aproximadamente diez veces superior al de la bahía de Fangar (Llebot *et al.*, 2011). Estudios previos han demostrado que las características geológicas y la propia dinámica hidrológica de la bahía de Fangar permite un intercambio de agua con el mar superior al que se da en la bahía de Alfacs (Llebot *et al.*, 2011), lo que explicaría, en parte, por qué la bahía de Fangar en el 2008 muestra un incremento de salinidad

Discusión

durante el periodo de estudio en contra de la tendencia general al descenso de salinidad provocado por la entrada de agua dulce a través de los canales de drenaje. La mayor conductividad observada en el año 2009 se debe probablemente a que dicho año fue más seco y más calido que el 2008 (ver Apéndice, Figura A1).

En resumen, los parámetros fisicoquímicos del agua responden directamente a la dinámica geológica e hidrológica propia de las bahías del Delta del Ebro (Llebot *et al.*, 2011; Mañosa *et al.*, 2001) junto con las condiciones climáticas registradas durante los periodos de estudio de los dos años de muestreo.

4.1.2. Variación espacio-temporal de los niveles de contaminantes en agua y evaluación del estado de contaminación por pesticidas de las bahías.

El Delta del Ebro es, probablemente, una de las áreas mejor monitorizadas en cuanto a contaminación ambiental en Europa en los últimos diez años (Barata *et al.*, 2007; Damasio *et al.*, 2010; Köck *et al.*, 2010; Kuster *et al.*, 2008; Mañosa *et al.*, 2001; Terrado *et al.*, 2007). Los trabajos publicados hasta la fecha indican la presencia de herbicidas (principalmente bentazona y MCPA), anilidas (mayoritariamente propanil) y tiocarbamatos (molinato) consecuencia de su aplicación masiva en el control de plagas asociadas al arroz en el Delta del Ebro (Mañosa *et al.*, 2001) alcanzando niveles altos en los canales de drenaje. Los resultados obtenidos en el presente trabajo junto con los resultados publicados por Köck *et al.* 2011 (procedentes de un trabajo simultáneo en el que además de las bahías se monitorizaron los pesticidas presentes en los canales de riego y drenaje del Delta del Ebro) concuerdan con lo observado en trabajos anteriores y demuestran que en los últimos 5 años apenas se ha producido variación en la aplicación de pesticidas y en los niveles de residuos de éstos presentes en agua (ver Apéndice Tabla A1).

Ambas bahías reciben una entrada similar de residuos de pesticidas procedentes de los campos de cultivo a través de los canales de riego y drenaje que acaban descargando en las propias bahías (Llebot *et al.*, 2011). No obstante, a pesar de que la bahía de Alfacs es de un tamaño diez veces superior a la bahía de Fangar, los resultados obtenidos indican niveles similares de contaminantes en ambas bahías. El mayor intercambio de agua con el mar demostrado en la bahía de Fangar (Llebot *et al.*, 2011) explica éstos resultados que son consecuencia del menor tiempo de residencia de los residuos de pesticidas en la bahía de Fangar.

La información publicada hasta la fecha sobre la contaminación de agua marina por herbicidas y biocidas es escasa comparada con la información disponible para las

aguas continentales. La mayoría de los estudios se han enfocado en el análisis de ríos que desembocan en el mar mediterráneo (Comoretto *et al.*, 2007; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2006; Readman *et al.*, 1993), en el océano atlántico (Munaron *et al.*, 2006), en el Mar del Norte (Steen *et al.*, 2002; Steen *et al.*, 2001) o en zonas portuarias de Francia (Tolosa *et al.*, 1996), Alemania (Lamoree *et al.*, 2002) ó Japón (Okamura *et al.*, 2003) debido a que las concentraciones son generalmente mayores (10^1 – 10^3 veces) que en el mar abierto (Munaron *et al.*, 2011).

Los resultados de la sección 3.1.2. (detallados también en las tablas A2 y A3 del Apéndice) indican que los pesticidas mayoritarios encontrados en las bahías del Delta del Ebro son los herbicidas ácidos, anilidas, tiocarbamatos (molinato) y en menor proporción las triazinas. Estos resultados coinciden con los pesticidas más comunes presentes en los estuarios mediterráneos (Readman *et al.*, 1993).

El MCPA y la Bentazona son los herbicidas ácidos mayoritarios en el Delta del Ebro (Barata *et al.*, 2007; Mañosa *et al.*, 2001) debido a su aplicación masiva en el cultivo de arroz. Los resultados del presente trabajo indican que alcanzaron niveles de hasta 309 y 379 ng l⁻¹ respectivamente en las bahías. Estas concentraciones son superiores a las detectadas en diferentes estuarios del mediterráneo (Golfo de Amvarakikos y el Golfo de Thermaikos en Grecia) que indican niveles indetectables de dichos herbicidas (Readman *et al.*, 1993).

Los niveles de las anilidas (principalmente propanil), alaclor y molinato alcanzaron respectivamente 360 ng l⁻¹, 77.4 ng l⁻¹ y 274.9 ng l⁻¹, y también superan los niveles descritos por Readman *et al.* (1993) en estuarios del mediterráneo (Delta del Nilo, Mar Adriático y golfos de Termaikos y Amvarakikos) que no superaron niveles de 70 ng l⁻¹ en el caso de las anilidas o 103 ng l⁻¹ en el caso del molinato.

Entre las triazinas analizadas, la atrazina, la simazina y la terbutilazina mostraron niveles de hasta 9.2, 47.1 y 249.6 ng l⁻¹ respectivamente. Estudios previos demuestran la presencia de atrazina en estuarios de mediterráneo en niveles de hasta 15 ng l⁻¹ en el Golfo de Thermaikos Grecia) y 18 ng l⁻¹ al norte del Mar Adriático (Readman *et al.*, 1993). Pero se han llegado a encontrar niveles de hasta 80, 120, 386 y 432 ng l⁻¹ en el Golfo de Amvrakikos (Grecia) (Readman *et al.*, 1993), en la bahía de Marennes Oléron (costa Atlántica francesa) (Munaron *et al.*, 2006), en el Delta del Ródano (Readman *et al.*, 1993) y en la bahía de Chesapeake (costa Atlántica de Estados Unidos) (Lehotay *et al.*, 1998) respectivamente. La mayoría de estos estudios también demuestran la presencia de simazina (herbicida de pre-emergencia), demostrando niveles de hasta 227, 333 y 1000 ng l⁻¹ en el delta del Ródano (Readman *et al.*, 1993), la bahía de Chesapeake (Lehotay *et al.*, 1998) y el Mar del Norte (Bester y Hühnerfuss, 1993). La triazina mayoritaria en las bahías del Delta del Ebro fue la terbutilazina (alcanzando

Discusión

249.66 ng l⁻¹) cuyos niveles son comparables a los encontrados en la costa alemana del Mar del Norte (de alta incidencia por contaminación de pesticidas), donde se llegan a alcanzar los 360 ng l⁻¹). Los altos niveles de terbutilazina pueden estar relacionados con el uso de este pesticida como sustituto de la atrazina y el hecho de que como todas las triazinas son compuestos recalcitrantes (Readman *et al.*, 1993).

Los organofosforados y las fenilureas son los pesticidas que se encuentran en menor proporción en las muestras analizadas (Figura 3.1.) a excepción de la alta concentración de malatión registrada puntualmente en Alfacs en el segundo periodo de muestreo del 2008 (T2).

4.2. Contenido de metales pesados en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro

4.2.1. Evaluación del estado de contaminación por metales en las bahías del Delta del Ebro

En la tabla 4.1. se comparan los datos obtenidos en el presente trabajo con datos publicados en estudios previos del género *Crassostrea* en diversas localizaciones.

Las concentraciones de Hg y Cd encontradas en las ostras estudiadas son comparables a los resultados obtenidos por Schuhmacher y Domingo (1996) en ostras a lo largo de las costas españolas. Los niveles de Pb, Cu y Zn se asemejan a los resultados de investigaciones realizadas con anterioridad en áreas no contaminadas (Hardiman y Pearson, 1995; Páez-Osuna *et al.*, 1995; Phillips y Muttarasin, 1985; Vázquez *et al.*, 1990; Vázquez *et al.*, 1993). Las concentraciones de As resultaron menores que los niveles reportados en estudios previos en ostras y se encontraron muy cercanos al límite de detección (0.001 mg g⁻¹ p.s.).

En términos generales, el contenido de metales en las ostras (*C. gigas*) transplantadas en el Delta del Ebro puede ser interpretado como bajo a escala global para Hg, Pb, Cd, As, Cu y Zn cuando se compara con los niveles encontrados en zonas bajo influencia de contaminación por metales pesados (Eisler, 1987; Greig *et al.*, 1975; Han y Hung, 1990; Lauenstein *et al.*, 1990; Presley *et al.*, 1990; Riedel y Valette-Silver, 2002; Shulkin *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 1985).

Tabla 4.1. Comparación de la concentración de metales (rango de medias en μgg^{-1} peso seco) en *Crassostrea gigas* del Delta del Ebro con la concentración en ostras del género *Crassostrea* de otros lugares.

	Ref.	Especie	Hg	Pb	Cd	As	Cu	Zn
Delta del Ebro	Este estudio	<i>C. gigas</i>	0.12–0.27	0.26–0.78	0.50–1.32	0.0010–0.0021	38.83–98.73	561.76–1126.84
Shantou, China[†]	Sun et al 2004	<i>C. ribularis</i>	–	2,5	10	–	1383	8260
Bahía de Ussuriyskiy, Rusia[†]	Shulkin et al 2003	<i>C. gigas</i>	–	4.1–36.0	4.7–27.2	–	250–6576	1683–7262
Sur de Carolina, EEUU[†]	Riedel y Valette-Silver, 2002	<i>C. gigas</i>	–	–	–	15.6	–	–
Costas Españolas	Schuhmacher y Domingo, 1996	<i>C. angulata</i>	0.04–0.34	0.02–41.4	0.4–3.2	4.0–11.2	24–345	–
Río Hawkesbury , NSW, Australia	Hardiman y Pearson, 1995	<i>C. commercialis</i>	–	0.1–0.5	0.8–2.1	–	160–180	1440–5440
Nayarit, Méjico	Páez-Osuna et al., 1995	<i>C. iridescens</i>	–	–	1.0–2.2	–	6.5–64.5	416–994
Campeche, Méjico	Vázquez et al. 1993	<i>C. virginica</i>	–	2.9–24.2	1.2–7.8	–	161–662	200–1315
Taiwán, China[†]	Han y Hung 1990	<i>C. gigas</i>	–	–	–	–	275–2025	–
Costa de EEUU[†]	Lauenstein et al. 1990	<i>C. virginica</i>	–	0.18–1.8	1.2–9.1	–	30–530	520–6000
Golfo de Méjico, EEUU[†]	Presley et al. 1990	<i>C. virginica</i>	–	0.02–12.5	0.54–16.8	–	6.8–559	72–10000
Bahía Minamata, Japón[†]	Eisler 1987	<i>C. gigas</i>	10	–	–	–	–	–
Tailandia	Phillips y Muttarasin, 1985	<i>C. commercialis</i>	–	–	3.2	–	100	571
Bahía Chesapeake, EEUU[†]	Wright et al. 1985	<i>C. virginica</i>	–	–	23.2	–	74.8–1860	3440–20630
Connecticut, EEUU[†]	Greig et al. 1975	<i>C. virginica</i>	–	7.1	15.6–28.1	–	1260–2208	8300–10460

[†]Áreas influenciadas por contaminación de metales pesados

Discusión

4.2.2. Evaluación de los patrones de variación de metales en las ostras transplantadas en el Delta del Ebro

En la mayoría de los casos se produjo un descenso del contenido de residuos de metales en las ostras transplantadas en las bahías respecto a los niveles iniciales, denotando procesos de depuración. Este descenso de los niveles de metales es mayor en la bahía de Fangar para Zn, Cu y Cd. El Pb y el Hg, sin embargo, presentan un patrón opuesto mostrando los mayores descensos de concentración en la bahía de Alfacs. Por último, el As tiende a acumularse en las ostras transplantadas en la bahía de Alfacs (Fig 3.2). Así pues, a priori, se puede decir que el único metal que mostró un aumento de concentración en las ostras transplantadas es el arsénico (en la bahía de Alfacs).

Estudios previos han demostrado que los niveles de Zn, Cu y As en el Delta del Ebro se encuentran asociados con los fertilizantes y los pesticidas aplicados en la agricultura tradicional (Mañosa *et al.*, 2001; Suárez-Serrano *et al.*, 2010). El Hg, Pb y Cd tienen como origen la contaminación industrial procedente de 100 Km aguas arriba del río Ebro (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007; Suárez-Serrano *et al.*, 2010). Los niveles de Pb además, también se asocian con los perdigones empleados en las actividades de caza de aves acuáticas (Mateo *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en la sección 3.2.2 y 3.2.3. indican diferentes patrones de respuesta de los metales en las ostras transplantadas en las bahías en función de las fuentes de origen y de la dinámica hidrológica de las propias bahías del modo que se describe a continuación:

El mayor intercambio de agua con el mar abierto que se produce en la bahía de Fangar (Llebot *et al.*, 2011) podría explicar la mayor frecuencia de descenso de concentraciones observada para el Zn y el Cu en dicha bahía. El origen agrícola de dichos metales provocaría una mayor concentración de éstos en las aguas de las bahías, de modo que un mayor intercambio con el mar abierto en la bahía del Fangar provocaría su dilución, explicando el descenso de concentración de Zn y Cu en las ostras transplantadas en dicha bahía.

Del mismo modo, el menor intercambio de agua en la bahía de Alfacs y el origen agrícola del As podría explicar el aumento de concentración de dicho metal en las ostras transplantadas en esta bahía.

El diferente comportamiento observado para los patrones de acumulación del Pb y el Hg se debe probablemente al hecho de que estos metales presentan otra fuente de origen. En particular, el Hg, que tiene su origen en la planta de cloro-alkali de Flix situada 100 Km aguas arriba en el río Ebro (Suárez-Serrano *et al.*, 2010), se encontraría en mayor concentración en el agua de fuera de las bahías consecuencia

de la descarga directa del río en el mar abierto; en cuyo caso la mayor tasa de intercambio con el agua de mar en la bahía de Fangar explicaría los mayores niveles de Hg en las ostras transplantadas en dicha bahía. Damasio *et al.* (2010) en un estudio realizado con almejas de agua dulce (*Corbicula fluminea*) transplantadas en el río Ebro y en la parte baja de los canales del drenaje de los arrozales del delta del Ebro, demostró que los niveles de Hg eran mayores en las almejas transplantadas en el mismo río Ebro que las transplantadas en los canales de drenaje que transportan el agua desde los campos de cultivo hasta las bahías.

El diferente comportamiento del Pb respecto a los metales de origen agrícola se debe a que la contaminación de dicho metal está relacionada con la actividad industrial (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007; Suárez-Serrano *et al.*, 2010) y con las actividades de caza, dependiendo de la frecuencia y la densidad de perdigones que tenga cada bahía (Mateo *et al.*, 1997). más que con las propias actividades agrícolas.

El Cd se comporta de forma similar a los pesticidas de origen agrícola, disminuyendo su concentración en la bahía de Fangar, esto probablemente se deba a que además del origen industrial (Sánchez-Chardi *et al.*, 2007) también pueda tener origen en las actividades agrícolas desarrolladas en el delta.

4.2.3. El Contenido de metales en ostras y el riesgo para la salud humana

Es importante determinar las concentraciones de los metales pesados en los organismos marinos que tienen valor comercial, con el objetivo de evaluar si estas concentraciones constituyen un riesgo para el consumo humano (Schuhmacher y Domingo, 1996).

En la figura 3.2. además de los niveles de metales encontrados en las ostras, se representa el límite máximo de tolerancia (LMT) recomendado por la Comisión Europea para el Hg, Pb y Cd (que es de $3.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s.; $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s.; $6.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s., respectivamente, asumiendo un contenido de agua en ostras del 85%). Los LMTs para Zn, Cu y As no se indican por que actualmente no hay regulación española ni europea para estos metales en bivalvos ni en el resto alimentos.

El mercurio es un metal que se encuentra en la naturaleza de forma natural pero que es altamente tóxico debido a su potencial neurotóxico. El consumo de pescado es una de las principales vías de exposición a Hg para los humanos y el contenido de Hg en peces está muy bien documentado (Burger y Gochfeld, 2006; Burger y Gochfeld, 2011; Carrasco *et al.*, 2011; Schuhmacher *et al.*, 1994) sin embargo poco se sabe por el momento sobre el contenido de Hg en ostras. Los resultados indicaron un rango de concentración de medias del Hg entre $0.12\text{-}0.27 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco. Estos resultados

Discusión

son comprables a los obtenidos por Schuhmacher y Domingo (1996) en ostras de la costas españolas y están muy por debajo de los LMT para el Hg recomendados por la Comisión Europea.

El plomo también es reconocido como agente tóxico. Los estudios previos referentes a la concentración de Pb en bivalvos indican que frecuentemente se encuentran niveles bajos de plomo en estos organismos consecuencia de la baja biodisponibilidad de las dos formas posibles del Pb (disuelta y dietaria) para los organismos marinos (Amiard *et al.*, 1986; Amiard *et al.*, 1985). Todas las muestras analizadas se encontraron muy por debajo de los LMTs admitidos para el plomo en bivalvos.

El cadmio es un metal no esencial para los organismos. Se reconoce como altamente tóxico para los animales y teratogénico y carcinogénico para los humanos (Eisler, 2000). Ninguna de las ostras analizadas en el presente trabajo mostró límites próximos a los LMTs para el Cd.

Así pues, el bajo contenido de los tres metales regulados por la Comisión Europea (Hg, Pb y Cd) indica que no hay riesgo para los humanos derivado del consumo de las ostras cultivadas en el Delta del Ebro.

El cobre y el zinc no están regulados debido a que son elementos esenciales presentes en todos los organismos vivos. Son asimilados fácilmente por los organismos y son necesarios para determinadas funciones fisiológicas. La bioacumulación de Cu y Zn depende de la especie en particular. Estudios previos confirman que las ostras contienen mayores niveles de concentración de ambos metales que otras especies de bivalvos (Funes *et al.*, 2006; Pan y Wang, 2009; Pan y Wang, 2012). No obstante, los niveles de Cu y Zn encontrados en las ostras transplantadas en las bahías del Delta del Ebro están dentro de los niveles medios encontrados en áreas no contaminadas (ver tabla 4.1) y son demasiado bajos como para ser considerados peligrosos.

El arsénico inorgánico es considerado un problema desde el punto de vista de la salud debido a su potencial carcinogénico, sin embargo, se ha demostrado que la mayoría del As presente en los alimentos de procedencia marina, son formas orgánicas no tóxicas y no mutagénicas del As (Edmonds y Francesconi, 1977; Edmonds y Francesconi, 1993; Phillips, 1990). En general se considera que las formas orgánicas del As no suponen riesgo para la salud humana (US-FDA, 1993). A pesar de que no hay regulación legal europea o española del As en bivalvos, los niveles encontrados en las ostras transplantadas en el Delta del Ebro están muy por debajo de los LMT recomendados por la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos ($86 \mu\text{g g}^{-1}$) (US-FDA, 1993).

Los resultados indican que la concentración de metales en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro es comparable a los valores obtenidos en estudios previos realizados en áreas no contaminadas. La ausencia de vinculación entre los niveles de metales en ostras y los daños observados indican que los niveles de los metales en las bahías no se pueden considerar problemáticos para el cultivo de las ostras. Los niveles de los metales regulados por la Comunidad Europea (mercurio, plomo y cadmio) en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro no constituyen un riesgo para la salud de los consumidores.

4.3. Respuestas de las B-esterasas en las ostras cultivadas en las bahías del delta del Ebro durante el periodo de máxima aplicación de pesticidas.

Estudios previos realizados en el campo destacan que la actividad colinesterasa puede ser reducida significativamente en organismos que habitan en áreas donde se aplican pesticidas (Dellali *et al.*, 2001).

Las ostras se han utilizado en ocasiones anteriores como organismos centinela en la evaluación del riesgo ambiental, especialmente en zonas donde no abundan los mejillones (Clegg *et al.*, 1998; Tanguy *et al.*, 2001). Sin embargo hay pocos datos disponibles referentes a la actividad de las colinesterasas y la carboxilesterasa en tejidos de las ostras (Bocquené *et al.*, 1997; Damiens *et al.*, 2004; Le Bris *et al.*, 1995; Monserrat *et al.*, 2002) y menos aún sobre su aplicación en monitoreo en campo (Bernal-Hernández *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios sobre B-esterasas realizados en el Delta del Ebro se han limitado a los mejillones (Escartín y Porte, 1997), almejas (Damasio *et al.*, 2010), cangrejo (Escartín y Porte, 1996) y otros crustáceos (Barata *et al.*, 2007), pero hasta la fecha no hay ningún trabajo referente a las B-esterasas en las ostras cultivadas en las bahías del Delta del Ebro.

Los resultados obtenidos de la actividad B-esterasa en el presente estudio concuerdan con estudios previos que indican mayores actividades en branquias que en músculo aductor en *Crassostrea gigas* (Bocquené *et al.*, 1990; Bocquené *et al.*, 1997) y en otros moluscos bivalvos como el mejillón común *Mytilus galloprovincialis*, la almeja asiática *Corbicula fluminea* (Mora *et al.*, 1999) y más recientemente en *Pecten jacobaeus* (Stefano *et al.*, 2008). Este hecho está relacionado con la función desempeñada por las branquias en la nutrición y la respiración de los bivalvos (Mora *et al.*, 1999).

Discusión

Las actividades encontradas en las ostras transplantadas en las bahías del Delta del Ebro son más bajas que las descritas por Escartín y Porte, (1997) en *Mytilus galloprovincialis* procedente de las mismas bateas de cultivo. No obstante, estos resultados son los que cabe esperar, teniendo en cuenta que estudios de caracterización de colinesterasas han demostrado actividades menores en ostras que en mejillón (Valbonesi *et al.*, 2003) y que en otras especies marinas (Bocquené *et al.*, 1990).

Entre los resultados obtenidos, cabe destacar que la actividad esterasa analizada en branquias se mostró inalterada durante el periodo de estudio (Figura 3.5.), indicando que los componentes organofosforados y carbamatos presentes en agua tienen efectos despreciables sobre la actividad colinesterasa en las branquias de las ostras transplantadas. Estos resultados pueden estar relacionados con la presencia de colinesterasas insensibles en ostra común (*C. gigas*) descrita por Bocquené *et al.* (1997) quien demostró la presencia de éste tipo de colinesterasas hidrofílicas, no unidas a la membrana y resistentes a OPs y CBs en branquias de las ostras. Nuestro protocolo de extracción y fraccionamiento (ver apartado 2.3.1.II del capítulo Materiales y Métodos) favorece la presencia de las mencionadas colinesterasas citosólicas e insensibles.

Estudios previos puntualizan que las diferencias en la sensibilidad de una especie a los componentes anti-colinesterasas en muchas ocasiones no se pueden explicar sólo por la exposición a los OPs y CBs. Se han descrito variaciones estacionales de las esterases en branquias de mejillones en el Delta del Ebro (Escartín y Porte, 1997) y otras especies de bivalvos como *Ruditapes decussatus* y *Mytilus galloprovincialis* (Dellali *et al.*, 2001), *Mytilus edulis* y *Macoma barthica* procedente del norte del Mar Báltico (Leiniö y Lehtonen, 2005), y en mejillón de agua dulce *Anodonta cygnea* (Robillard *et al.*, 2003). También se han descrito efectos en la actividad enzimática de las esterases por otros componentes orgánicos, metales y componentes de mezclas complejas de contaminantes (Al-Ghais *et al.*, 2000; Bocquené *et al.*, 1990; Guilhermino *et al.*, 1998; Jifa *et al.*, 2005; Najimi *et al.*, 1997; Payne *et al.*, 1996).

La escasa variabilidad espacio temporal de la actividad colinesterasa en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro, demostrada en el presente trabajo, indica que la acción anticolinérgica de los pesticidas organofosforados y carbamatos no puede considerarse causa de mortalidad en las ostras cultivadas en las bahías del Delta del Ebro. Estos resultados contradicen lo expuesto por Köck *et al.*, (2010) quien precisamente explica la mortalidad de las ostras como consecuencia de la presencia de residuos de Malatión. No obstante, en dicho estudio los autores basan las conclusiones en estudios de laboratorio realizados con algas de agua dulce, *Daphnia* y

bacterias, cuya fisiología es completamente diferente a la de las ostras. Además estudios previos de laboratorio demuestran que los efectos de los organofosforados en ostras ocurren a nivel de mg l^{-1} (Le Bris *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2004) mientras que nuestros resultados muestran niveles de ng l^{-1} en las bahías donde se cultiva *Crassostrea gigas*. Los resultados obtenidos, por otro lado, apoyan estudios recientes como el realizado por Damasio *et al.*, (2010) donde se indicaba que los efectos observados en las colinesterasas de almejas transplantadas en los canales del delta del Ebro, cuyos niveles de pesticidas organofosforados eran mayores que los presentes en las bahías estudiadas, no estaban relacionados con los componentes organofosforados presentes en el agua.

La ausencia de respuesta observada en las actividades de las colinesterasas estudiadas contrasta, sin embargo, con los resultados obtenidos en las actividades de las carboxilesterasas que mostró una correlación significativa con los residuos OPs y CBs (Figura 3.6.). Así pues, los resultados sugieren que entre las B-esterasas analizadas en *Crassostrea gigas*, las carboxilesterasas son las enzimas que presentan mayor sensibilidad, mostrando inhibición frente a los organofosforados y carbamatos. Estudios previos realizados en otras especies de bivalvos apoyan este argumento mostrando también mayor sensibilidad de las carboxilesterasa en relación a las colinesterasas (Basack *et al.*, 1998; Escartín y Porte, 1997; Galloway *et al.*, 2002; Ozretic y Krajnovic-Ozretic, 1992). De forma más concreta, estudios realizados con *Mytilus galloprovincialis* donde se examinó la sensibilidad de las B-esterasas a la exposición de fenitrotión, fenitroxón y cabofurán (Escartín y Porte, 1997) demostraron que la actividad carboxilesterasa era inhibida a concentraciones mucho más bajas que la actividad colinesterasa. En concreto estos autores demostraron que las concentraciones de Fenitrotión, Fenitroxón y Carbofurán que causaban una inhibición del 50% (IC50) eran de 300 , 5.8 y 3.7 μM respectivamente para la AChE frente a 2.1 , 0.0006 y 3.8 μM respectivamente para la inhibición de la CbE. Trabajos similares en mejillón *Mytilus edulis* indican también que la actividad carboxilesterasa es ligeramente más sensible que la acetilcolinesterasa a la exposición de paraoxón y clorpirifos (Galloway *et al.*, 2002).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con estudios previos e indican que la actividad CbE analizada en branquias de *Crassostrea gigas* se puede utilizar como un buen indicador de exposición a los pesticidas anticolinérgicos.

4.4. Estudio integrado de las variables ambientales y los biomarcadores de estrés oxidativo en ostra (*Crassostrea gigas*) cultivada en el Delta del Ebro durante el periodo de aplicación máxima de pesticidas.

En el presente apartado se discute un análisis integral de los resultados obtenidos tanto de las variables ambientales como de las respuestas biológicas observadas en *C. gigas* con el objetivo de establecer posibles conexiones entre ambas.

4.4.1. Biomarcadores de estrés oxidativo en ostras cultivadas en el Delta del Ebro

Los resultados de los biomarcadores analizados en *Crassostrea gigas* confirman lo descrito en trabajos anteriores sobre la misma especie. En la Tabla 4.2 se presenta una comparación más detallada de los resultados de trabajos publicados en los que se utilizan las mismas metodologías de análisis y las mismas unidades que en nuestro trabajo, demostrando que nuestros resultados de la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) en branquias y glándula digestiva, de la glutatión peroxidasa (GPx) en glándula digestiva y de la glutatión reductasa (GR) y de peroxidación de lípidos (LPO) en branquias se encuentran dentro del mismo rango de varianza y próximos a los valores obtenidos en estudios anteriores. Para el resto de biomarcadores, las diferentes metodologías de análisis y unidades en que se presentan los resultados en los trabajos publicados dificultan una comparación directa con nuestros datos.

Los resultados obtenidos indican que entre los tres factores analizados (año, punto y periodo de muestreo), los factores que más influyen sobre el patrón de variación de los biomarcadores en las ostras transplantadas en las bahías del Delta del Ebro son principalmente el año de estudio y en menor medida el periodo de muestreo.

Las ostras del año 2009 muestran niveles inalterados de la mayoría de las respuestas antioxidantes excepto para la GPx-Se en glándula digestiva, así como los mayores niveles de inducción de daños oxidativos como los niveles de peroxidación de lípidos y lipofuscina, con la excepción de los daños en ADN que fueron mayores en el año 2008 (Fig 3.7). En definitiva el factor año indica una depresión de las defensas antioxidantes y mayores daños oxidativos en las ostras del 2009.

El segundo factor que influye en el patrón de variación de las respuestas biológicas es el tiempo (periodo de muestreo), que indica un incremento de las actividades enzimáticas antioxidantes así como de los niveles de peroxidación lipídica y daños en el ADN de Mayo a Junio (ver Fig 3.7.).

Tabla 4.2. Comparación de resultados obtenidos en el presente trabajo con los rangos de variabilidad y valores medios encontrados en trabajos previos con las mismas metodologías de análisis y unidades de presentación de resultados.

	Tejido	min	max	unidades	Ref
CAT	Branquias	79	204	μmol/min/mg prot	Presente trabajo
	Branquias	50	350	μmol/min/mg prot	Geret <i>et al.</i> , 2011
	Glándula digestiva	89	303	μmol/min/mg prot	Presente trabajo
	Glándula digestiva	100	700	μmol/min/mg prot	Geret <i>et al.</i> , 2011
SOD	Branquias	11	25	U/mg prot	Presente trabajo
	Branquias	10	30	U/mg prot	Cong et al 2012
	Glándula digestiva	13	39	U/mg prot	Presente trabajo
	Glándula digestiva	20	50	U/mg prot	Cong et al 2012
	Glándula digestiva	10.7*		U/mg prot	Solé <i>et al.</i> , 1994
GR	Branquias	3	5	nmol/min/mg prot	Presente trabajo
	Branquias	6	15	nmol/min/mg prot	Trevisan <i>et al.</i> , 2012
GST	Branquias	15	127	nmol/min/mg prot	Presente trabajo
	Branquias	80	280	nmol/min/mg prot	Trevisan <i>et al.</i> , 2012
GPx	Glándula digestiva	6	14	nmol/min/mg prot	Presente trabajo
	Glándula digestiva	5.9*		nmol/min/mg prot	Solé <i>et al.</i> , 1994
LPO	Branquias	3	6	nmol MDA/g p.f.	Presente trabajo
	Branquias	4	22	nmol MDA/g p.f.	Zanette et al, 2011

* valores medios

Los patrones de respuesta observados en los biomarcadores de *C. gigas* en el presente estudio son mucho más marcados en glándula digestiva que en branquias. Este hecho está dentro de lo que cabría esperar teniendo en cuenta que la glándula digestiva es el principal órgano de detoxificación (Livingstone *et al.*, 1992).

Los resultados indican que la localización de los transplantes (punto de muestreo) no influye en las respuestas observadas de los biomarcadores.

El análisis de componentes principales realizado con los datos de los dos años de estudio (2008 y 2009) (Fig. 3.9.) confirma de nuevo las diferencias bioquímicas entre las ostras de los dos años de estudio, demostrando que los organismos correspondientes al año 2009 presentaban las defensas antioxidantes deprimidas y como consecuencia presentaron mayores daños oxidativos en lípidos y una mayor tasa de mortalidad.

Discusión

La actividad colinesterasa de las branquias se mantiene inalterada durante los dos años de estudio, a pesar de tratarse del órgano diana toxicológico de los pesticidas organofosforados (Barata *et al.*, 2004) indicando que durante el año 2009 al igual que en el 2008 (ver apartado 4.3.1.1) los componentes organofosforados presentes en el agua tenían efectos despreciables sobre las colinesterasas de las ostras estudiadas; reafirmando de nuevo la hipótesis de la presencia de colinesterasas insensibles a organofosforados en branquias de las ostras (Bocquené *et al.*, 1997). Estos resultados confirman de nuevo lo expuesto en el apartado 4.3 referente a que la acción anticolinérgica de los pesticidas organofosforados y carbamatos presentes en el agua no puede considerarse un factor influyente en la mortalidad de la ostra cultivada en el Delta del Ebro, contradiciendo otra vez más, la hipótesis de Köck *et al.* (2010) sobre la influencia del Malatión en la mortalidad de *Crassostrea gigas* en el Delta del Ebro.

4.4.2. Relación entre las variables ambientales y las respuestas biológicas

Entre los parámetros fisicoquímicos analizados en el agua, los dos parámetros que podrían estar vinculados a las respuestas biológicas según los resultados obtenidos por los análisis de los componentes principales son la temperatura y la conductividad.

La temperatura es el parámetro ambiental más frecuentemente implicado en los eventos de mortalidad de las ostras ya sea de forma directa o indirecta (Brown y Hartwick, 1988; Cheney *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 1990; Shafee y Sabatie, 1986). A pesar del amplio rango de tolerancia de temperatura de *Crassostrea gigas* (8-32°C) (van der Veer *et al.*, 2006), un incremento o un cambio brusco de temperatura en el agua alrededor de las ostras les puede suponer un importante riesgo de predisposición a enfermedades. Malham *et al.* (2009) demostró mortalidades de un 20% cuando la temperatura del agua se encontraba por encima de los 21°C y encontró una asociación entre las altas temperaturas y la reducción del número de hemocitos con la consiguiente reducción de la capacidad de fagocitosis. Gagnaire *et al.* (2006) también encontró resultados similares en *C. gigas* (*in vivo* e *in vitro*) demostrando la reducción de hemocitos expuestos a altas temperaturas.

Generalmente, *Crassostrea gigas* tolera un amplio rango de variación de salinidad de entre 15 y 44 ‰ (Nell y Holliday, 1988) pero el mantenimiento del balance osmótico bajo un régimen estresante de fluctuación de salinidad supone un coste metabólico muy alto (Brown y Hartwick, 1988) y las condiciones extremas pueden causar mortalidades masivas (Gagnaire *et al.*, 2006). Estudios previos han demostrado reducciones de la tasa de crecimiento en larvas y adultos de bivalvos cuando se

encuentran en condiciones de salinidad bajas (<20‰) o muy altas (>40 ‰) (Brown y Hartwick, 1988; Newkirk, 1978; Taylor *et al.*, 2004).

Las ostras utilizadas en el presente estudio proceden de la costa atlántica francesa, donde la temperatura y la salinidad es de una media de 15°C y 33 ‰ respectivamente (Soletchnik *et al.*, 2007). El rango de temperatura media observado en las bahías del Delta del Ebro en el presente estudio es de 19-24°C siendo más alto en el año 2009 y la conductividad medida en agua fue de 441-621 mS cm⁻¹ (aproximadamente 29.5-41‰) (mayor de 33 ‰ en el año 2009). Estos valores son mayores que los propios de la costa atlántica francesa de donde proceden las ostras y además están próximos a los límites de tolerancia y temperatura reconocidos para *Crassostrea gigas*, especialmente en el año 2009, lo que explicaría la vinculación de la alta temperatura y la alta conductividad registrada en el agua durante el 2009 con los daños y la mortalidad de las ostras de dicho año.

Los resultados de los análisis de los componentes principales indican que no se puede establecer una conexión entre el contenido de metales en las ostras y las respuestas biológicas observadas. Estos resultados confirman lo expuesto en los apartados 4.2.1 y 4.2.4. referente a que los niveles de concentración de metales observados en ostras no indican un riesgo de contaminación por metales en las bahías del delta del Ebro y que los niveles de metales acumulados en las ostras no se pueden considerar un riesgo ni para el cultivo de ostra ni para la salud humana.

El análisis de componentes principales realizado con los datos del 2008 permite establecer posibles relaciones causales entre los patrones de respuesta biológica observada en las ostras transplantadas (descenso de las defensas antioxidantes y aumento de los daños oxidativos) y los pesticidas presentes en el agua de las bahías. No obstante, hay que tener en cuenta que la mortalidad de ostra registrada en Junio del 2008 (ver datos de mortalidad sobreimpresos en la Figura 3.10.) es baja (≤25%) en comparación con la registrada en el año 2009 (≥65%), por lo que estas relaciones se deben interpretar con cautela. Los resultados del PCA del 2008 (Figura 3.2) indican una posible vinculación de la bentazona y los residuos de propanil con las respuestas observadas en las ostras (depresión de sistema antioxidante, mayores daños oxidativos y mayor tasa de mortalidad). Las triazinas, tiocarbamatos (como el molinato), fenilureas y organofosforados, sin embargo, no se muestran relacionadas con dichas respuestas.

Discusión

La información toxicológica sobre los efectos de los pesticidas estudiados en las ostras es escasa y en la mayoría de los casos se refieren a estudios realizados usando concentraciones no realistas de mg l^{-1} (Park *et al.*, 2004; Ward y Ballantine, 1985). No obstante cabe destacar que los resultados del presente estudio corroboran los obtenidos en estudios previos como el realizado por Stachowski-Haberkorn *et al.* (2008) quien demostró que la bentazona a dosis 20 veces superior a la medida en el Delta del Ebro puede afectar a las ostras, pero contradicen otros estudios como los realizados por Bouilly *et al.* (2004) y Geret *et al.* (2012) que indican que las triazinas a bajas concentraciones también pueden provocar efectos genotóxicos en ostras.

Los patrones de variación de los biomarcadores observados en el presente trabajo coinciden en gran medida con los descritos en ostras expuestas a mezclas realistas de pesticidas de la bahía de Marennes-Oléron, donde ocurren eventos de alta mortalidad (Geret *et al.*, 2012).

En resumen, el presente estudio refleja un incremento dramático de mortalidad en la ostra cultivada en el Delta del Ebro en el año 2009 respecto al año anterior así como la alteración de las respuestas bioquímicas asociadas. Las ostras del 2009 mostraron sus defensas antioxidantes deprimidas y como resultado altos niveles de daños oxidativos en sus tejidos y alta tasa de mortalidad, mientras que en el 2008 el incremento de sus defensas antioxidantes de Mayo a Junio las hizo más tolerantes a las condiciones estresantes pro-oxidativas evidenciadas por el menor incremento de peroxidación lipídica.

Desafortunadamente, no se dispone de datos referentes a los niveles de pesticidas en agua del año 2009. Sin embargo hay dos fuentes de información que indican que los residuos de pesticidas pueden contribuir sólo en parte a los efectos dañinos observados en las ostras. La primera evidencia viene de nuestro estudio en el año 2008 que muestra que sólo dos tipos de compuestos bentazona y propanil estuvieron relacionados con dichos efectos aunque aquel año la mortalidad fue muy baja (<25%). La segunda fuente de evidencia proviene de los estudios anteriormente publicados que muestran que en los últimos cinco años los residuos de pesticidas medidos en agua son similares en ambas bahías y a lo largo de los años (Barata *et al.*, 2007; Damasio *et al.*, 2010; Köck *et al.*, 2010; Kuster *et al.*, 2008; Terrado *et al.*, 2007). Además, Köck *et al.* (2010) en un estudio simultáneo al presente trabajo encontró niveles de residuos comparables a los encontrados por Barata *et al.* (2007) en agua de los canales de drenaje del Delta del Ebro en 2005 (ver Apéndice Tabla A1). Por lo

tanto es razonable argumentar que los residuos de pesticidas tuvieron sólo efectos marginales en las mortalidades observadas en el 2009.

Los episodios de mortalidad de la ostra en verano han sido exhaustivamente estudiados no solo en Europa (Dégremont *et al.*, 2010; Delaporte *et al.*, 2007; Gouletquer *et al.*, 1998; Lacoste *et al.*, 2001; Le Roux *et al.*, 2002; Malham *et al.*, 2009; Maurer y Comps, 1986; Soletchnik *et al.*, 2005), también en América (Chávez-Villalba *et al.*, 2007; Cheney *et al.*, 2000; Perdue *et al.*, 1981) y Asia (Cho y Kim, 1977; Huang *et al.*, 2006; Mori, 1979). Parece ser que la mortalidad de las ostras viene provocada por un conjunto de factores ambientales y bióticos. Geret *et al.* (2012) definió dos tipos de *Crassostrea gigas* que eran (I) sensibles y (II) resistentes a la infección bacteriana y que en la bahía de Marennes-Oléron mostraron una alta y baja mortalidad en verano, respectivamente. El grupo de ostras sensibles tenía un mayor metabolismo basal, mayores actividades enzimáticas y cuando éstas se infectaban con una bacteria o eran expuestas a mezclas de pesticidas realistas similares a las medidas en las bahías del Delta del Ebro, mostraban inalteradas sus defensas antioxidantes; mientras que el grupo de ostras resistentes tenía un comportamiento opuesto. En el presente estudio la actividad de la mayoría de las enzimas en la glándula digestiva fue mayor en las ostras del 2009 antes de su transplante (Tabla 3.4) y estas ostras mostraron su sistema de defensa antioxidante inalterado durante el periodo de transplante. Las ostras transplantadas en el 2008, por el contrario, mostraron actividades enzimáticas basales más bajas y sus respuestas antioxidantes incrementaron de mayo a junio. Así pues los trasplantes en el 2008 y 2009 se comportaron de forma similar a las ostras resistentes y sensibles a las enfermedades de la bahía de Marennes-Oléron, respectivamente. Por lo tanto, es razonable concluir que además de los pesticidas presentes en las bahías, otros factores como la salinidad y la temperatura del agua o el estado inmunológico de las ostras iniciales podrían contribuir a explicar las diferencias observadas en los biomarcadores y en las tasas de mortalidad entre los dos años de estudio. De hecho, Roque *et al.* (2012) en un estudio reciente realizado sobre *Crassostrea gigas* cultivada en el Delta del Ebro, demostró mayor incidencia de herpes-virus en las ostras recolectadas en el 2009 que en el 2008, lo que da soporte a nuestra hipótesis de que el incremento de mortalidad de *Crassostrea gigas* en las bahías del Delta del Ebro durante el año 2009 se debió probablemente a la contribución conjunta de toda una serie de factores perjudiciales para el cultivo de las ostras.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

1. Los parámetros fisicoquímicos del agua en las bahías de Alfacs y Fangar, como la salinidad, temperatura y sólidos en suspensión, presentaron una gran estacionalidad y variabilidad anual acorde con el régimen climático y el intercambio de agua de cada bahía. La temperatura y salinidad del agua aumentaron de Mayo a Junio siendo éste incremento mayor en el 2009. Los sólidos en suspensión disminuyeron en Junio probablemente debido a la mayor estratificación del agua. A pesar de que el aporte de agua dulce fue similar en ambas bahías y que la bahía del Fangar es mucho más pequeña, los valores fisicoquímicos del agua fueron similares al tener ésta un mayor intercambio con el agua de mar.
2. Los niveles de pesticidas presentes en ambas bahías fueron similares y variaron a lo largo del estudio con una mayor presencia de triazinas y compuestos organofosforados en los primeros muestreos y de anilidas, en su mayoría representadas por el propanil, en junio. Pesticidas ácidos como bentazona fueron los de mayor abundancia.
3. La concentración de metales en las ostras cultivadas en el Delta del Ebro son en la mayoría de los casos comparables a los valores obtenidos en estudios previos realizados en zonas no contaminadas. Y en particular, el contenido de mercurio, plomo y cadmio en ostras no constituye un riesgo para la salud de los consumidores.
4. Los patrones de acumulación de los metales presentes en las ostras diferenciaron dos fuentes de origen: (I) una procedente de las actividades agrícolas en el mismo Delta del Ebro (As, Cu, Zn) y (II) otra procedente del río Ebro, de las actividades industriales aguas arriba (Hg y Pb) así como de las actividades cinegéticas (Pb).
5. Los niveles acumulados de los metales estudiados mostraron, en la mayoría de las ocasiones, una depuración respecto a los niveles iniciales. La bahía de Fangar mostró una mayor depuración de los metales relacionados con la agricultura (Cu, Zn y As), junto con el Cd, probablemente debido al mayor intercambio con el mar abierto en dicha bahía. Los niveles de Hb y Pb, sin embargo, fueron mayores en las ostras transplantadas en la bahía de Fangar,

Conclusiones

debido probablemente su diferente origen y a que son transportados por el río y descargados directamente al mar abierto..

6. La inhibición de la actividad carboxilesterasa en branquias de *Crassostrea gigas* presentó correlaciones significativas con los niveles de compuestos anticolinérgicos (Organofosfatos y Carbamatos). Por el contrario las actividades de las colinesterasas presentaron una escasa variabilidad espacio-temporal. Estos resultados indican que la actividad de las carboxilesterasa se puede utilizar como un buen indicador de exposición de pesticidas anticolinérgicos.
7. Los patrones de respuesta de las defensas antioxidantes de las ostras transplantadas en 2008 y 2009 fueron claramente diferentes. Las ostras transplantadas en el 2008 incrementaron sus defensas antioxidantes de Mayo a Junio, presentaron pocos daños oxidativos en tejidos y su mortalidad fue baja. Las ostras transplantadas en el 2009 presentaron al inicio sus defensas antioxidantes elevadas, las cuales no se alteraron durante el periodo de estudio lo que incrementó el daño oxidativo en sus tejidos y su mortalidad, siendo ésta elevada en Junio (<65%).
8. Los factores ambientales que más afectaron a los biomarcadores estudiados y por tanto susceptibles de afectar a la supervivencia de la ostra fueron: las altas temperaturas y salinidades, que fueron especialmente elevadas en el 2009 y los residuos de los herbicidas bentazona y propanil, que en las ostras del 2008 se relacionaron con un incremento de roturas de ADN en glándula digestiva y branquias y elevadas actividades de GST. Así mismo el patrón de respuesta de las ostras del 2008 y 2009 y trabajos recientes realizados sobre las mismas ostras indican que los individuos del 2009 tuvieron una mayor incidencia de enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Aebi H. (1974). Catalase In: Bergmayer HU, editor. Methods of enzymatic analysis. Academic Press, London, 671-684.
- 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*. Aquatic Toxicology. 49: 269-287.
- Al-Ghais SM, Ahmad S, Ali B. (2000). Differential Inhibition of Xenobiotic-Metabolizing Carboxylesterases by Organotins in Marine Fish. Ecotoxicology y Environmental Safety. 46: 258-264.
- Alves SRC, Severino PC, Ibbotson DP, da Silva AZ, Lopes F, Saenz LA, Bainy AC. (2002). Effects of furadan in the brown mussel *Perna perna* and in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. Marine Environmental Research. 54: 241-245.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic toxicology. 76: 160-202.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthet B, Métayer C. (1986). Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper y zinc in the mussel; *Mytilus edulis*. Marine Biology. 90: 425-431.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Metayer C. (1985). Experimental Study of Bioaccumulation, Toxicity y Regulation of Some Trace Metals in Various Estuarine y Coastal Organisms. Heavy Metals in Water Organisms. Symposia Biologica Hungarica Akademiai Kiado, Budapest, Hungary. 313-322.
- Anguiano GA, Amador A, Moreno-Legorreta M, Arcos-Ortega F, Vazquez-Boucard C. (2010). Effects of Exposure to Oxamyl, Carbofuran, Dichlorvos, and Lindane on Acetylcholinesterase Activity in the Gills of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Environmental Toxicology. 25: 327-332.
- ASTM (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, DC,
- Barata C, Damasio J, Lopez MA, Kuster M, de Alda ML, Barceló D, Riva MC, Raldúa D (2007). Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. Environmental Toxicology and Chemistry- 26 (2): 370-379.
- Barata C, Fabregat MC, Cotin J, Huertas D, Sole M, Quiros L, Sanpera C, Jover L, Ruiz X, Grimalt JO, Pina B. (2010). Blood biomarkers and contaminant levels in

Bibliografía

- feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain). *Environmental Pollution*. 158: 704-710.
- Barata C, Solayan A, Porte C. (2004). Role of B - esterases in assessing toxicity of organophosphorous (chlorpyrifos, malathion) y carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol*. 66: 125-139.
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*. 140: 175-186.
- Barceló D, Solé M, Durand G, Albaiges J. (1991). Analysys and behaviur of organophosphorus pesticides in rice crop field. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 339: 676-683.
- Basack SB, Oneto ML, Fuchs JS, Wood EJ, Kesten EM. (1998). Esterases of *Corbicula fluminea* as biomarkers of exposure to organophosphorus pesticides. *Bulletin of Environmental Contamination y Toxicology*. 61: 569-576.
- Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DA, Lowe, DM, Mooere MN, Stebbing A, Widdows J. (1985). *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. New York, USA: Praeger.
- Bernal-Hernández Y, Medina-Díaz I, Robledo-Marengo M, Velázquez-Fernández J, Girón-Pérez M, Ortega-Cervantes L, Maldonado-Vázquez W, Rojas-García A. (2010). Acetylcholinesterase y metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicology*. 19: 819-825.
- Bester K, Hühnerfuss H. (1993). Triazines in the Baltic y North Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 26: 423-427.
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A. (2006). New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere*. 62: 510-519.
- Bocquené G, Galgani F, Truquet P. (1990). Characterization y assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*. 30: 75-89.
- Bocquené G, Roig A, Fournier D. (1997). Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*) - Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *Febs Letters*. 407: 261-266.
- Bosch C, Olivares A, Faria M, Navas JM, del Olmo In, Grimalt JO, Piña B, Barata C. (2009). Identification of water soluble and particle bound compounds causing

- sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry. *Aquatic toxicology*. 94: 16-27.
- Bouilly K, McCombie H, Leitão A, Lapègue S. (2004). Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*; 145: 699-705.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown JR, Hartwick EB. (1988). Influences of temperature, salinity and available food upon suspended culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* 1. Absolute and allometric growth. *Aquaculture*. 70: 231-251.
- Buhler DR, Williams DE. (1988). The role of biotransformation in the toxicity of chemicals. *Aquatic Toxicology*. 11: 19-28.
- Buisson S, Bouchart V, Guerlet E, Malas JP, Costil K. (2008). Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 43: 655-664.
- Cadet J, Berget M, Douki T, Ravanat JL. (1997). Oxidative damage to DNA: formation measurements, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 131. 1–87.
- 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. *Science of the Total Environment*. 247: 295-311.
- Camusso M, Balestrini R, Binelli A. (2001). Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere*. 44: 263-270.
- Carlberg I, Mannervik B. (1985). Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*. 113: 485-490.
- Castillo LE, Ruepert C, Ugalde R. (2009). Ecotoxicology and pesticides in Central America. In: Newman MC, editor. *Fundamentals of Ecotoxicology*. CRC Press, Boca Raton. FL. 47-54.
- Cerutti PA. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*; 227: 375-381.
- Chávez-Villalba J, Arreola-Lizarraga A, Burrola-Sánchez S, Hoyos-Chairez F. (2007). Growth, condition, y survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within y outside a subtropical lagoon. *Aquaculture*. 300: 128-136.

Bibliografía

- Cheney DP, MacDonald BF, Elston RA. (2000). Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research*. 19: 353-359.
- Cho CH, Kim YS. (1977). Microenvironment in oyster farm area. 1. On the eutrophication and raft density in Geoje Bay. *Bull. Kor. Fish. Soc.* 10: 259-265.
- Collin H, Meistertzheim A-L, David E, Moraga D, Boutet I. (2011) Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg (1973) to pesticide exposure under experimental conditions. *Journal of Experimental Biology*. 213: 4010-4017.
- Comoretto L, Arfib B, Chiron S. (2007). Pesticides in the Rhône river delta (France): Basic data for a field-based exposure assessment. *Science of The Total Environment*. 380: 124-132.
- Corsi I, Mariottini M, Sensini C, Lancini L, Focardi S. (2003). Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*. 26: 129-138.
- Damasio J. (2010). "The use of biomarkers to diagnose the ecological impact of pollutants in Mediterranean rivers" PhD.Thesis, Universidad de Aveiro (Portugal)
- Damasio J, Navarro-Ortega A, Tauler R, Lacorte S, Barcelo D, Soares A, Lopez MA, Riva MC, Barata C. (2010). Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker y multivariate methods. *Ecotoxicology*. 19: 1084-1094.
- Damiens G, His E, Gnassia-Barelli M, Quiniou F, Romeo M. (2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 138: 121-128.
- Davenport J. (1985). Osmotic control in marine animals. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 39: 207-244.
- Dégremont L, Boudry P, Ropert M, Samain J-F, Bédier E, Soletchnik P. (2010). Effects of age y environment on survival of summer mortality by two selected groups of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 299: 44-50.
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Jegaden M, Moal J, Pouvreau Sp, Dégremont L, Boudry P, Samain J-Fo. (2007). Characterisation of physiological y immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities y fed different rations under controlled conditions. *Journal of Experimental Marine Biology y Ecology*. 353: 45-57.

- Dellali M, Gnassia Barelli M, Romeo MI, Aissa P. (2001). The use of acetylcholinesterase activity in *Ruditapes decussatus* y *Mytilus galloprovincialis* in the biomonitoring of Bizerta lagoon. *Comparative Biochemistry y Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 130: 227-235.
- Depledge MH, Fossi MC. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Ecotoxicology*. 3: 161-172.
- Di Giulio RT, Benson WH, anders BM, Van Veld PA. (1995). Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. G. Rand. Taylor and Francis, London,
- Eisler R. (2000). *Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants, y Animals*. Vol 1. Boca Ranton , FL: Lewis Publishers.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres VJ, Featherstone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. 7: 88-95.
- Escartín E, Porte C. (1997). The use of cholinesterase and carboxylesterase activities from *Mytilus galloprovincialis* in pollution monitoring. *Environ Toxicol Chem*. 16: 2090-2095.
- Escartín E, Porte C. (1996). Bioaccumulation, metabolism, y biochemical effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. *Environ Toxicol Chem*; 15: 915-920.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 11: 81-128.
- FAO©. (2005). *Cultured Aquatic Species Information Programme: Crassostrea gigas*. Text by Helm, M.M. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department Roma*.
- Faria M. (2011). A multibiomaker approach to characterize biological effects of pollutants on freshwater mussels and crayfish. Departamento de Ingeniería hidráulica, Marítima y Ambiental. Programa Interuniversitario de Ciencias del Mar. Universidad Politécnica de Cataluña, PhD Thesis.
- Fernández-Sanjuan M, Meyer J, Damásio J, Faria M, Barata C, Lacorte S. (2010). Screening of perfluorinated chemicals (PFCs) in various aquatic organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398: 1447-1456.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*. 71: 39-48.

Bibliografía

- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226: 497-509.
- Fridovich I. (1978). Biology of oxygen radicals. *Science.* 201: 875-880.
- Fromme H, Tittlemier SA, Völkel W, Wilhelm M, Twardella D. (2009). Perfluorinated compounds - Exposure assessment for the general population in western countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 212: 239-270.
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T. (2006). Effects of temperature y salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology.* 20: 536-547.
- Galloway TM, Millward N, Browne MA, Depledge MH. (2002). Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic toxicology.* 61(3-4):169-180.
- Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. (2002). Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers.* 7: 123-137.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C. (2001). Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers.* 6: 91-107.
- Geret F, Burgeot T, Haure J, Gagnaire B, Renault T, Communal PY, Samain JF. (2012). Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology.* 13.
- Giesy JP, Kannan K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental Science and Technology.* 35: 1339-1342.
- Gómez-Gutiérrez AI, Jover E, Bodineau L, Albaigés J, Bayona JM. (2006) Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro River inputs. *Chemosphere.* 65: 224-236.
- Gouletquer P, Soletchnik P, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Fauray N, Taillade S. (1998). Summer Mortality of the Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Marrennes-Oléron (France). *ICES Mariculture Committee CM 1998/CC.* 14-21.
- Gray DA, Woulfe J. (2005). Lipofuscin and Aging: A Matter of Toxic Waste. *Sci. Aging Knowl. Environ* re1-5.

- Guilhermino L, Barros P, Silva MC, Soares AMVM. (1998). Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate y carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers*. 3: 157-163.
- Gutteridge JMC, Halliwell B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 15: 129-135.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol Chem*. 249: 7130-7139.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- Hayes JD, Pulford DJ. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isozymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 30: 445-600.
- Houde M, De Silva AO, Muir DCG, Letcher RJ. (2011). Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: An updated review. *Environmental Science and Technology*. 45: 7962-7973.
- Huang SC, Hsieh HL, Chen CP. (2006). Effects of the winter Monsoon on the growth, mortality, y metabolism of adult oysters in Kinmen Island, Taiwan. *Aquaculture*. 251: 256-270.
- Jifa W, Zhiming Y, Xiuxian S, You W, Xihua C. (2005). Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate y sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system. *Environmental Toxicology y Pharmacology*; 20: 465-470.
- Johnston RK, Munns WR, Tyler PL, Marajh-Whittemore PR, Finkelstein K, Munney K, Short FT, Melville A, Hahn SP. (2002). Weighing the evidence of ecological risk from chemical contamination in the estuarine environment adjacent to the Portsmouth Naval Shipyard, Kittery, Maine, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 21: 182-194.
- Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ. (2000). Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry*; 286: 35-37.
- Kampioti A, Borba da Cunha AC, López de Alda MJ, D. B. (2005). Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at pictogram per litre levels in water, by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem*. 382: 1815-1825.

Bibliografía

- Kannan K, Tao L, Sinclair E, Pastva SD, Jude DJ, Giesy JP. (2005). Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 48: 559-566.
- Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. (1983). The role of glutathione in detoxification. *Environ Health Persp*. 49: 59-69.
- Köck M, Farré M, Martínez E, Gajda-Schranz K, Ginebreda A, Navarro A, Alda MLd, Barceló D. (2010). Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *Journal of Hydrology*. 383: 73-82.
- Koganezawa A. (1974). Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. In "Proceedings of the Third U.S.-Japan Meeting on Aquaculture at Tokyo, Japan, October 15-16, 29-34.
- Kontreczky C, Farkas A, Nemcsók J, Salánki J. (1997). Short- and long-term effects of deltamethrin on filtering activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38: 195-199.
- Kuster M, López de Alda MJ, Barata C, Raldúa D, Barceló D. (2008). Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*; 75: 390-401.
- Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gelebart F, Cordevant C, Lange M, Poulet SA. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46: 139-145.
- Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology*; 50: 51-71.
- Lam PKS, Gray JS. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 182-186.
- Lamoree MH, Swart CP, van der Horst A, van Hattum B. (2002). Determination of diuron y the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas y coastal waters. *Journal of Chromatography A*. 970: 183-190.
- Lavado R, Ureña R, Martin-Skilton R, Torreblanca A, del Ramo J, Raldúa D, Porte C. (2006). The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ Pollut*. 139: 330-339.
- Lawrence RA, Burk RF. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient ratliver. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 71: 952-958.

- Le Bris H, Maffart P, Bocquené G, Buchet V, Galgani Fo, Blanc G. (1995). Laboratory study on the effect of dichlorvos on two commercial bivalves. *Aquaculture*. 138: 139-144.
- Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F. (2002). Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*. 15: 251-258.
- Lech JJ, Vodick MJ. (1985). Biotransformation. In: Rand GM, Petrocelli SR, editors. *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA. 526–557.
- Lehotay SJ, Harman-Fetcho JA, McConnell LL. (1998). Agricultural pesticide residues in oysters y water from two Chesapeake Bay tributaries. *Marine Pollution Bulletin* 37: 32-44.
- Leibovitz BE, Siegel BV. (1980). Aspects of free radical reactions in biological systems: aging. *Journals of Gerontology*. 35: 45-56.
- Leiniö S, Lehtonen KK. (2005). Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* y *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry y Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 140: 408-421.
- 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. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 324-330.
- Livingstone DR, Lips F, Martinez PG, Pipe RK. (1992). Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 112: 265-276.
- Livingstone DR. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. *Advances in Comparative and Environmental Physiology*; 7: 45-185.
- Livingstone DR. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue De Medecine Veterinaire*. 154: 427-430.
- Llebot C, Solé J, Delgado M, Fernández-Tejedor M, Camp J, Estrada M. (2011). Hydrographical forcing y phytoplankton variability in two semi-enclosed estuarine bays. *Journal of Marine Systems*. 86: 69-86.
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H. (2010). Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Environmental Science and Pollution Research*. 17: 999-1008.

Bibliografía

- Luna-Gonzalez A, de Jesus Romero-Geraldo M, Campa-Cordova A, Orduna-Rojas J, Valles-Jimenez R, Ruiz-Verdugo CA. (2008). Seasonal variations in the immunological and physiological parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahia de Macapule (Sinaloa, Mexico). *Aquaculture Research*; 39: 1488-1497.
- MacRae TH, Bagshaw JC, Warners AH. (1989). *Biochemistry and Cell Biology of Artemia*. Boca raton,FL: CRC Press.
- Malham SK, Cotter E, O'Keeffe S, Lynch S, Culloty SC, King JW, Latchford JW, Beaumont AR. (2009). Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival. *Aquaculture*. 287: 128-138.
- Mañosa S, Mateo R, Guitart R. (2001). A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro biota and wildlife. *Environ Monitor. Assess.* 71: 187-205.
- Mateo R, Martínez-Vilalta A, Guitart R. (1997). Lead shot pellets in the Ebro delta, Spain: Densities in sediments and prevalence of exposure in waterfowl. *Environmental Pollution*. 96: 335-341.
- Maurer D, Comps M. (1986). Mortalities estivales de l'huitre *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon: facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. *European Mariculture Society Special Publication*. 29-41.
- Maxwell DM. (1992). The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 114: 306-312.
- Mc Cord JM, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244: 6049-6055.
- McCarthy JF, Shugart LR. *Biomarkers of environmental contamination*. Florida, USA: Lewis, 1990.
- Meyers TR, Short S, Eaton W. (1990). Summer Mortalities y Incidental Parasitisms of Cultured Pacific Oysters in Alaska. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2: 172-176.
- Monserrat JM, Bianchini A, Bainy ACD. (2002). Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Marine Environmental Research*. 54: 781-785.
- Mora P, Fournier D, Narbonne JF. (1999). Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *Mytilus edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology & Endocrinology*. 122: 353-361.

- Mora P, Michel X, Narbonne JF. (1999). Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology y Pharmacology*. 7: 253-260.
- Mori K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*. 53: 361-369.
- Mourente G, Díaz-Salvago E. (1999). Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 124: 405-416.
- Munaron D, Dubernet JF, Delmas F, Stanisière JY, Scribe P. (2006). Assessment of the quantities of herbicides y nutrients brought down by the river Charente to the coast y modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oléron bay. *Cahiers de Biologie Marine*; 47: 85-92.
- Munaron D, Tapie N, Budzinski H, Andral B, Gonzalez J-L. (2011). Pharmaceuticals, alkylphenols y pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuarine, Coastal y Shelf Science*.
- Nadal M, Ferré-Huguet N, Martí-Cid R, Schuhmacher M, Domingo JL. (2008). Exposure to Metals through the Consumption of Fish and Seafood by the Population Living Near the Ebro River in Catalonia, Spain: Health Risks. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 14: 780-795.
- Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A. (1997). Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (south of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 58: 901-908.
- Navarro A, Endo S, Gocht T, Barth JAC, Lacorte S, Barceló D, Grathwohl P. (2009). Sorption of alkylphenols on Ebro River sediments: Comparing isotherms with field observations in river water and sediments. *Environmental Pollution*; 157: 698-703.
- Nell JA, Holliday JE. (1988). Effect of salinity on the growth and survival of Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*. 68: 39-44.
- Newkirk G. (1978). Interaction of genotype y salinity in larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*; 48: 227-234.
- NRC. (1987). Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect*. 74 , 3-9.
- Nystrom T. (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Embo Journal*. 24: 1311-1317.

Bibliografía

- O'Brien RD (1960). Toxic Phosphorus Esters. Chemistry, Metabolism, and Biological Effects. Academic Press, New York.
- Okamura H, Aoyama I, Ono Y, Nishida T. (2003). Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Marine Pollution Bulletin*. 47: 59-67.
- Olive PL. (1988). DNA precipitation assay - A rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian-cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 11: 487-495.
- Ozretic B, Krajnovic-Ozretic M. (1992). Esterase heterogeneity in mussel *Mytilus galloprovincialis*: effects of organophosphate y carbamate pesticides in vitro. *Comparative Biochemistry y Physiology Part C: Comparative Pharmacology*; 103: 221-225.
- Páez-Osuna F, Marmolejo-Rivas C. (1990). Occurrence and seasonal variation of heavy metals in the oyster *Saccostrea iridescens*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 129-134.
- Páez-Osuna F, Ruiz-Fernández AC, Botello AV, Ponce-Vález G, Osuna-López JI, Frías-Espéricueta MG, López-López G, Zazueta-Padilla HM. (2002). Concentrations of selected trace metals (Cu, Pb, Zn), organochlorines (PCBs, HCB) and total PAHs in mangrove oysters from the Pacific Coast of Mexico: an overview. *Marine Pollution Bulletin*; 44: 1303-1308.
- Paglia DE, Valentin W. (1967). Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte Glutathione Peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70: 158-162.
- Park KH, Kim YS, Chung EY, Choe SN, Choo JJ. (2004). Cardiac responses of Pacific oyster *Crassostrea gigas* to agents modulating cholinergic function. *Comparative Biochemistry y Physiology - C Toxicology y Pharmacology*. 139: 303-308.
- Parkinson A. (1996). Biotransformation of xenobiotics. In: Klassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York.
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*. 333: 19-39.
- Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers y a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*. 32: 225-231.
- Peakall DB. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1) Introduction. *Ecotoxicology*. 3: 157-160.

- Perdue JA, Beattie JH, Chew KK. (1981). Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *Journal of Shellfish Research*. 1: 9-16.
- Pierce SK, Greenber.Mj. (1972). The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. *Journal of Experimental Biology*; 57: 681-692.
- Ramón M, Cano J, Peña BJ, Campos MJ. (2005). Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*; 21 (1-4): 361-373.
- Rand GM, Wells PG, McCarty LS. (1995). Introduction to aquatic toxicology in *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. In: Rand GM, editor. Taylor & Francis, Washington, DC.
- Readman JW, Albanis TA, Barcelo D, Galassi S, Tronczynski J, Gabrielides GP. (1993). Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: Results from a MED POL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin*. 26: 613-619.
- Regoli F, Principato G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals in different field and laboratory conditions: implications for a proper use of biochemical biomarkers *Aquatic Toxicology*. 31: 143-164.
- Ricciardi F, Binelli A, Provini A. (2006). Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 63: 406-412.
- Rikans LE, Hornbrook KR. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 1362: 116-127.
- Robillard S, Beauchamp G, Laulier M. (2003). The role of abiotic factors y pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry y Physiology - C Toxicology y Pharmacology*; 135: 49-59.
- Rodríguez JA, Nanos N, Grau JM, Gil L, López-Arias M. (2008). Multiscale analysis of heavy metal contents in Spanish agricultural topsoils. *Chemosphere*. 70: 1085-1096.
- Roque A, Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Elandaloussi L, Gairin I, Rodgers CJ, Furones MD (2012). First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture*; 324-325: 303-306.
- Sánchez-Chardi A, Lóez-Fuster MJ, Nadal J. (2007). Bioaccumulation of lead, mercury, and cadmium in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*, from the Ebro Delta (NE Spain): Sex- and age-dependent variation. *Environmental Pollution*. 145: 7-14.

Bibliografía

- Sarkar SK, Bhattacharya BD, Bhattacharya A, Chatterjee M, Alam A, Satpathy KK, Jonathan MP. (2008). Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticide residues in tropical coastal environment of India: An overview. *Environment International*. 34: 1062-1071.
- Schuhmacher M, Domingo JL. (1996). Concentrations of Selected Elements in Oysters (*Crassostrea angulata*); from the Spanish Coast. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 56: 106-113.
- Shafee MS, Sabatie MR. (1986). Croissance et mortalite des huitres dans la lagune de Oualidia (Maroc). *Aquaculture*. 53: 201-214.
- Shugart LR, McCarthy JF, Halbrook RS. (1992). Biological Markers of Environmental and Ecological Contamination: An Overview. *Risk Analysis*; 12: 353-359.
- Shulkin VM, Presley BJ, Kavun V. (2003). Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environment International*. 29: 493-502.
- Silva CA, Rainbow PS, Smith BD, Santos ZL. (2001). Biomonitoring of trace metal contamination in the Potengi estuary, Natal (Brazil), using the oyster *Crassostrea rhizophorae*, a local food source. *Water Res*. 35: 4072–4078.
- Solé M, Morcillo Y, Porte C. (1998). Imposex in the commercial snail *Bolinus brandaris* in the northwestern Mediterranean. *Environmental Pollution*. 99: 241-246.
- Solé M, Porte C, Barceló D, Albaiges J. (2000). Bivalves residue analysis for the assessment of coastal pollution in the Ebro Delta (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin*. 40: 746-753.
- Soletchnik P, Lambert C, Costil K. (2005). Summer mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research*. 24: 197-207.
- Soletchnik P, Ropert M, Mazurié J, Gildas Fleury P, Le Coz F. (2007). Relationships between oyster mortality patterns y environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture*. 271: 384-400.
- Stachowski-Haberkorn S, Quiniou F, Nedelec M, Robert R, Limon G, De La Broise D. (2008). In-situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Ecotoxicology*. 17: 235-245.
- Stadtman ER. (1992). Protein damage and aging. *Science*. 257 1220-1224.
- Steen RJCA, Evers EHG, Van Hattum B, Cofino WP, Brinkman UAT. (2002). Net fluxes of pesticides from the Scheldt Estuary into the North Sea: a model approach. *Environmental Pollution*. 116: 75-84.

- Steen RJCA, van der Vaart J, Hiep M, Van Hattum B, Cofino WP, Brinkman UAT. (2001). Gross fluxes y estuarine behaviour of pesticides in the Scheldt Estuary (1995-1997). *Environmental Pollution*. 115: 65-79.
- Stefano B, Ilaria C, Silvano F. (2008). Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: Characterization y effects of exposure to aquatic contaminants. *Science of The Total Environment*. 392: 99-109.
- Stegeman JJ, Brouwer M, Digiulio RT, Forlin 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. *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. 235-335.
- Stohs SJ, Bagghi D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. 18: 321-336.
- Sturm A, Wogram J, Segner H, Liess M. (2000). Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 1607-1615.
- Suárez-Serrano A, Alcaraz C, Ibanez C, Trobajo R, Barata C. (2010). *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 280-286.
- Sukhotin AA, Abele D, Portner HO. (2002). Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. *Marine Ecology-Progress Series*. 226: 223-234.
- Sumpter JP, Jobling S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*. 103: 173-178.
- Sunila I. (1987). Histopathology of mussels (*Mytilus edulis L.*) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Annales Zoologici Fennici*. 24: 55-69.
- Suter GW (1993) *Ecological Risk Assessment*. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers.
- Szakacs G, Varadi A, Oezvegy-Laczka C, Sarkadi B. (2008). The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today*. 13: 379-393.
- Taylor JJ, Southgate PC, Rose RA. (2004). Effects of salinity on growth y survival of silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima*, spat. *Journal of Shellfish Research*. 23: 375-377.

Bibliografía

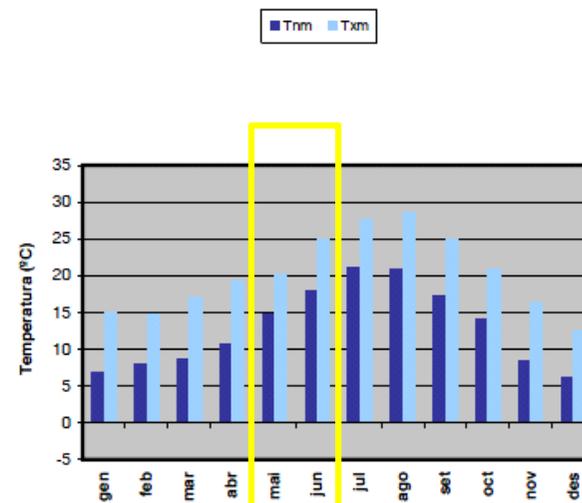
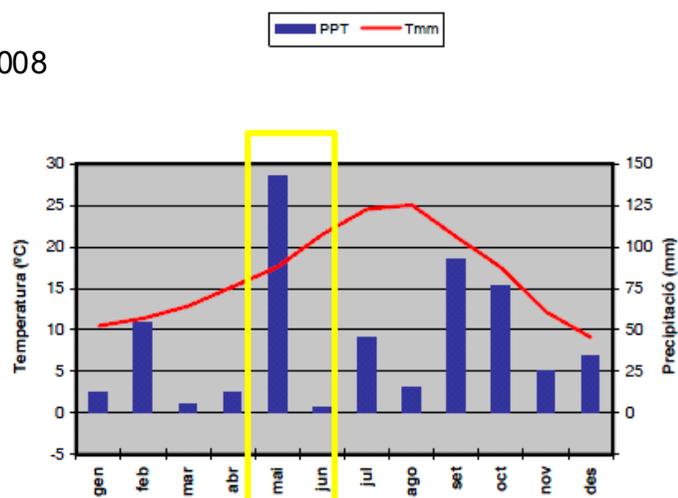
- Terrado M, Barceló D, Tauler R. (2006). Identification and distribution of contamination sources in the Ebro river basin by chemometrics modelling coupled to geographical information systems. *Talanta*. 70: 691-704.
- Terrado M, Kuster M, Raldúa D, Lopez De Alda M, Barceló D, Tauler R. (2007). Use of chemometric and geostatistical methods to evaluate pesticide pollution in the irrigation and drainage channels of the Ebro river delta during the rice-growing season. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387: 1479-1488.
- Thompson HM, Walker CH. (1994). Cholinesterase- inhibiting Insecticides, Chemicals in Agriculture. In: Fossi MC, Leonzio C, editors. *Non-destructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publisher, Chelsea, MI, U.S.A, 37–62.
- Timbrell J. (2001). *Principles of Biochemical Toxicology*. London. Taylor & Francis.
- Tolosa I, Readman JW, Blaevoet A, Ghilini S, Bartocci J, Horvat M. (1996). Contamination of Mediterranean (Côte d'Azur) coastal waters by organotins y irgarol 1051 used in antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*. 32: 335-341.
- Truhaut R. (1977). Eco-toxicology: objective, principles and perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1: 151-173.
- US-FDA (1993). Guidance document for arsenic in shellfish. Center for Food Safety y Applied Nutrition.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 64: 178-189.
- Valbonesi P, Sartor G, Fabbri E. (2003). Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. *Science of the Total Environment*; 312: 79-88.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- van der Oost R, Porte C, van den Brink NW. (2005). Biomarkers in environmental risk assessment. In: den Besten PJ, Munawar M, editors. *Ecotoxicological testing of marine and freshwaters ecosystems: emerging techniques, trends and strategies*. Taylor & Francis, London, 83–133.
- van der Veer HW, Cardoso JFMF, van der Meer J. (2006). The estimation of DEB parameters for various Northeast Atlantic bivalve species. *Journal of Sea Research*. 56: 107-124.
- Van Leeuwen CJ, Hermens JLM. (1995). *Risk Assessment of Chemicals: an Introduction*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Viarengo A, Canesi L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*. 94: 225-243.
- Vioque-Fernández A, de Almeida EA, Ballesteros J, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, López-Barea J. (2007). Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: Esterase inhibition and pollutant levels. *Toxicology Letters*. 168: 260-268.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. (2001). *Principles of Ecotoxicology*, 2 edition. . London, UK: Taylor & Francis.
- Walker CH, Livingstone DR. (1992). *Persistent pollutants in marine ecosystems*. Oxford: SETAC Pub. Series, Pergamon Press.
- Walker CH. (1992). Biochemical responses as indicators of toxic effects of chemicals in ecosystems. *Toxicology Letters*. 64-5: 527-533.
- Ward GS, Ballantine L. (1985). Acute y chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna. *Estuaries* 8: 22-27.
- WHO (1992). *Parathion Health and Safety Guide*. Geneva: World Health Organization.
- Williams RT (1959). *Detoxication Mechanisms*. London: Chapman & Hall.
- Willmer PG (1978). Electrophysiological correlates of ionic and osmotic stress in an osmoconforming bivalve (*Mytilus edulis*) *J. exp. Biol.* 77: 207–223.
- Winston GW, Digiulio RT. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*. 19: 137-161.
- Zanette J, de Almeida EA, da Silva AZ, Guzenski Jo, Ferreira JF, Di Mascio P, Marques MRF, Bainy ACD. (2011). Salinity influences glutathione S-transferase activity and lipid peroxidation responses in the *Crassostrea gigas* oyster exposed to diesel oil. *Science of the Total Environment*. 409: 1976-1983.
- Zanette J, Monserrat JM, Bianchini A. (2006). Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 143: 187-195.
- Zanette J, Nunes FF, Medeiros ID, Siebert MN, Mattos JJ, Lüchmann KH, Meñp. CMR. Bainy ACD. (2008). Comparison of the antioxidant defense system in *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea gigas* exposed to domestic sewage discharges. *Marine Environmental Research*; 66: 196-198.
- Zar JH. (1996). *Bioestatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall International

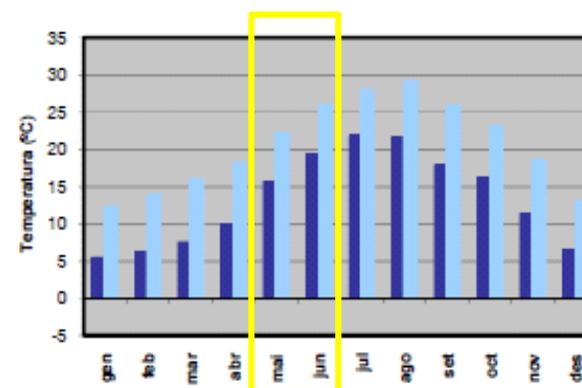
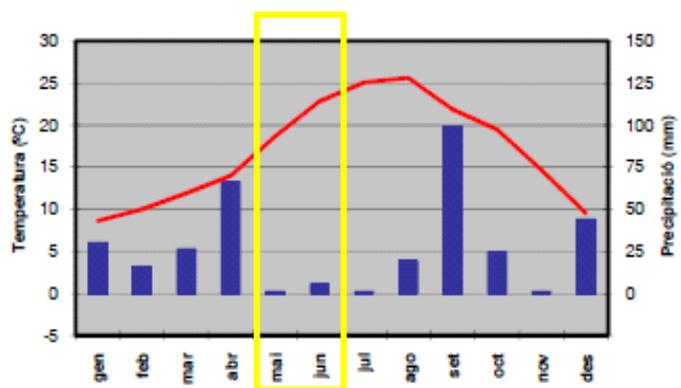
APÉNDICE

7. Apéndice

2008



2009



Estación Els Alfacs-UW (Montsià)

Figura A1. Resumen meteorológico de los años 2008 y 2009 en el Delta del Ebro. Datos de precipitación acumulada (PPT), temperatura media (Tmm), temperatura mínima media (Tnm) y temperatura máxima media (Txm) recogidos en la estación meteorológica de Els Alfacs-UW (Montsià) situada en Delta del Ebro (indicada con un punto rojo en el mapa de Cataluña). Información extraída de www.meteo.cat

Apéndice

Tabla A1. Comparación de las concentraciones de pesticidas (ng/L) en dos puntos situados en canales de desagüe del Delta del Ebro según los resultados obtenidos en el estudio simultáneo al presente trabajo realizado por Köck *et al.*, (2010) y en un estudio previo realizado en el 2005. Datos extraídos de Köck., et al (2010). HDCD y HDAD se corresponden con sendos puntos de muestreo localizados en los canales de drenaje en el Delta del Ebro.

Pesticidas	HDCD		HDAD	
	2005a	2008b	2005a	2008b
Ácidos				
Mecoprop	8	12	7	14
2,4 D	24	18	12	31
Bentazona	80,006	557	95,466	1042
MCPA	2242	448	897	419
Anilidas y cloracetanilidas				
Alaclor	218	206	32	491
Metolaclor	n.d.	5	n.d.	6
Propanil	398	29	1757	218
Organofosfatos				
Diazinon	11	4	3	26
Dimetoato	n.m.	21	n.m.	13
Fenitrotión	165	137	317	376
Malatión	n.d.	984	n.d.	1070
Fenilureas				
Diurón	15	57	17	56
Isoproturón	2	4	2	5
Linurón	n.m.	5	n.m.	n.d.
Chlortolurón	n.d.	3	nd.	3
Tiocarbamatos				
Molinato	318	710	331	554
Triacinas				
Atrazina	412	10	445	13
Simazina	138	99	53	65
Cianazine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Desetilatrazina	n.m.	15	n.m.	18
Terbutilazina	n.m.	576	n.m.	505
Deisopropilatrazina	n.m.	10	n.m.	10

n.d.: no detectado ; n.m.: no analizado

Tabla A2. Niveles (en ng/L) de los herbicidas ácidos (Bentazona MCPA, 2,4D y mecoprop), anilidas (alaclor, metolaclor y propanil) y organofosfatos (diazinón, dimetoato, fenitrotión y malatión) presentes en las muestras de agua analizadas en el año 2008.

Fecha de muestreo	Ref. muestra	Bahía	Bentazona	MCPA	2,4-D	Mecoprop	Alaclor	Metolaclor	Propanil	Diazinón	Dimetoato	Fenitrotión	Malatión
24/04/2008	22	Alfacs	24.11	22.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.67	< LC	n.d.	n.d.
28/04/2008	26	Alfacs	24.44	22.59	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.64	3.68	n.d.	25.139
02/05/2008	32	Alfacs	143.64	81.96	n.d.	1.95	46.06	n.d.	n.d.	2.06	11.48	n.d.	14.76
05/05/2008	38	Alfacs	23.29	20.84	n.d.	< LC	< LC	n.d.	n.d.	1.69	< LC	n.d.	< LC
08/05/2008	44	Alfacs	61.94	42.3	3.64	< LC	15.97	n.d.	< LC	1.26	< LC	n.d.	< LC
13/05/2008	50	Alfacs	81.24	179.47	10.17	3.19	29.07	n.d.	n.d.	0.97	< LC	n.d.	n.d.
15/05/2008	56	Alfacs	147.82	159.42	20.55	4.64	77.39	< LC	< LC	2.02	7.15	n.d.	400.2
19/05/2008	62	Alfacs	100.01	53.76	12.09	2.5	< LC	< LC	n.d.	2.55	< LC	n.d.	218.49
22/05/2008	68	Alfacs	98.48	67.97	12.86	2.98	< LC	4.06	74.65	1.64	n.d.	< LC	< LC
26/05/2008	74	Alfacs	106.68	86.21	6.56	2.53	< LC	n.d.	29.58	1.52	< LC	< LC	31.26
29/05/2008	80	Alfacs	68.02	38.43	5.9	3.53	n.d.	< LC	10.07	0.85	< LC	50.93	< LC
02/06/2008	86	Alfacs	149.8	75.16	< LC	3.42	< LC	< LC	56.43	1.16	n.d.	n.d.	< LC
05/06/2008	92	Alfacs	216.53	71.83	3.46	3.34	n.d.	n.d.	190.46	1.83	< LC	n.d.	107.9
09/06/2008	98	Alfacs	341.41	67.39	n.d.	3.14	n.d.	< LC	44.13	1.56	< LC	n.d.	< LC
12/06/2008	104	Alfacs	212.05	59.71	n.d.	< LC	n.d.	n.d.	78.79	1.34	< LC	n.d.	< LC
24/04/2008	19	Fangar	74.91	232.43	1.93	< LC	< LC	n.d.	n.d.	2.38	n.d.	n.d.	25.46
02/05/2008	29	Fangar	206.27	308.94	5.85	5.67	54.64	< LC	91.74	4.78	25.48	n.d.	42.89
05/05/2008	35	Fangar	119.22	136.8	6.05	4.82	n.d.	n.d.	< LC	2.29	7.61	n.d.	21.86
08/05/2008	41	Fangar	74.34	81.24	3.37	3.92	< LC	< LC	n.d.	7.19	n.d.	n.d.	< LC
13/05/2008	47	Fangar	148.77	406.93	7.01	10.42	< LC	< LC	n.d.	3.11	9.3	n.d.	n.d.
15/05/2008	53	Fangar	52.31	53.5	1.85	2.85	n.d.	< LC	n.d.	1.54	n.d.	n.d.	< LC
19/05/2008	59	Fangar	146.4	90.8	3.91	5.34	< LC	< LC	n.d.	2.46	3.73	n.d.	201.39
22/05/2008	65	Fangar	194.97	110.13	5.55	6.77	n.d.	2.35	7.75	6.83	< LC	n.d.	29.65
26/05/2008	71	Fangar	140.53	97.34	3.78	4.88	n.d.	< LC	19.98	1.67	n.d.	n.d.	66.17
29/05/2008	77	Fangar	118.79	57.19	4.4	5.3	n.d.	< LC	23.31	2.5	n.d.	144.66	< LC
02/06/2008	83	Fangar	107.72	48.54	< LC	4.89	n.d.	n.d.	86.44	3.55	< LC	< LC	n.d.
05/06/2008	89	Fangar	346.95	104.21	3.46	4.39	n.d.	< LC	80.49	1.88	< LC	n.d.	n.d.
09/06/2008	95	Fangar	378.99	114.22	3.43	3.75	n.d.	< LC	166.51	2.39	4.24	n.d.	< LC
12/06/2008	101	Fangar	1238.58	234.88	13.33	4.96	n.d.	< LC	360.75	4.17	< LC	n.d.	57.44

n.d., no detectado, <LC por debajo del límite de cuantificación

Apéndice

Tabla A3. Niveles (en ng/L) de fenilureas (diurón, isoproturón, linurón, clortolurón), tiocarbamatos (molinato) y triazinas (atrazina, simazina, cianizina, disetil atrazina, terbutilazina y deisopropil atrazina) presentes en las muestras de agua analizadas en el año 2008.

Fecha de muestreo	Ref. muestra	Bahía	Diurón	Isoproturón	Linurón	Clortolurón	Molinato	Atrazina	Simazina	Cianizina	Desetil atrazina	Terbutilazina	Deisopropil atrazina
24/04/2008	22	Alfacs	5.06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LC	11.91	n.d.	n.d.	20.2	n.d.
28/04/2008	26	Alfacs	< LC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LC	13.94	n.d.	< LC	36.8	n.d.
02/05/2008	32	Alfacs	17.05	n.d.	n.d.	n.d.	14.75	4.72	47.1	n.d.	10.37	178.45	n.d.
05/05/2008	38	Alfacs	< LC	n.d.	n.d.	< LC	23.08	n.d.	10.75	n.d.	< LC	19.98	n.d.
08/05/2008	44	Alfacs	9.76	n.d.	n.d.	n.d.	60.73	< LC	16.79	n.d.	3.74	90.81	n.d.
13/05/2008	50	Alfacs	17.23	n.d.	n.d.	n.d.	154.84	< LC	33.36	n.d.	n.d.	230.15	n.d.
15/05/2008	56	Alfacs	33.2	1.52	n.d.	n.d.	419.95	4.97	44.97	n.d.	6.2	249.62	< LC
19/05/2008	62	Alfacs	8.5	< LC	n.d.	n.d.	107.23	< LC	19.13	n.d.	3.49	71.46	n.d.
22/05/2008	68	Alfacs	11.47	n.d.	n.d.	n.d.	77.28	4.34	12.06	n.d.	3.09	41.02	< LC
26/05/2008	74	Alfacs	28.98	n.d.	n.d.	< LC	60.77	2.97	12.86	n.d.	3.57	51.25	< LC
29/05/2008	80	Alfacs	9.5	n.d.	< LC	n.d.	24.95	n.d.	< LC	n.d.	n.d.	< LC	n.d.
02/06/2008	86	Alfacs	< LC	n.d.	n.d.	n.d.	32.02	n.d.	< LC	n.d.	< LC	< LC	n.d.
05/06/2008	92	Alfacs	18.21	n.d.	n.d.	n.d.	53.36	n.d.	n.d.	n.d.	< LC	4.82	n.d.
09/06/2008	98	Alfacs	11.67	n.d.	n.d.	n.d.	127.96	n.d.	2.32	n.d.	n.d.	4.08	n.d.
12/06/2008	104	Alfacs	6.03	n.d.	n.d.	n.d.	20,40	n.d.	< LC	n.d.	n.d.	2,06	n.d.
24/04/2008	19	Fangar	28.23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.81	6.64	n.d.	4.32	19.01	n.d.
02/05/2008	29	Fangar	40.57	1.23	n.d.	n.d.	135.39	7.69	14.61	n.d.	11.95	85.14	< LC
05/05/2008	35	Fangar	17.74	n.d.	n.d.	< LC	156.69	6.13	9.97	n.d.	10.23	57.06	n.d.
08/05/2008	41	Fangar	18.6	n.d.	n.d.	< LC	86.9	< LC	8.77	n.d.	7.05	43.18	< LC
13/05/2008	47	Fangar	92.42	n.d.	< LC	< LC	274.9	< LC	26.65	n.d.	7.64	144.49	< LC
15/05/2008	53	Fangar	< LC	n.d.	n.d.	n.d.	83.29	< LC	3,17	n.d.	3.91	18.54	n.d.
19/05/2008	59	Fangar	26.76	1.75	n.d.	n.d.	249.24	5.19	8.17	n.d.	7.09	38.04	n.d.
22/05/2008	65	Fangar	22.56	n.d.	n.d.	n.d.	146.15	9.16	17.69	n.d.	9.06	54.03	n.d.
26/05/2008	71	Fangar	20.12	n.d.	n.d.	n.d.	84.95	4.11	9.89	n.d.	6.28	27.50	< LC
29/05/2008	77	Fangar	12.85	n.d.	n.d.	n.d.	189.13	< LC	< LC	n.d.	< LC	4.48	n.d.
02/06/2008	83	Fangar	8.53	n.d.	n.d.	n.d.	50.84	< LC	< LC	n.d.	n.d.	< LC	n.d.
05/06/2008	89	Fangar	< LC	n.d.	n.d.	n.d.	50.13	n.d.	< LC	n.d.	< LC	3.22	n.d.
09/06/2008	95	Fangar	12.08	n.d.	n.d.	< LC	30.54	< LC	< LC	n.d.	< LC	< LC	n.d.
12/06/2008	101	Fangar	17.47	n.d.	n.d.	n.d.	44.32	< LC	< LC	n.d.	< LC	6.63	n.d.

n.d., no detectado, <LC por debajo del límite de cuantificación

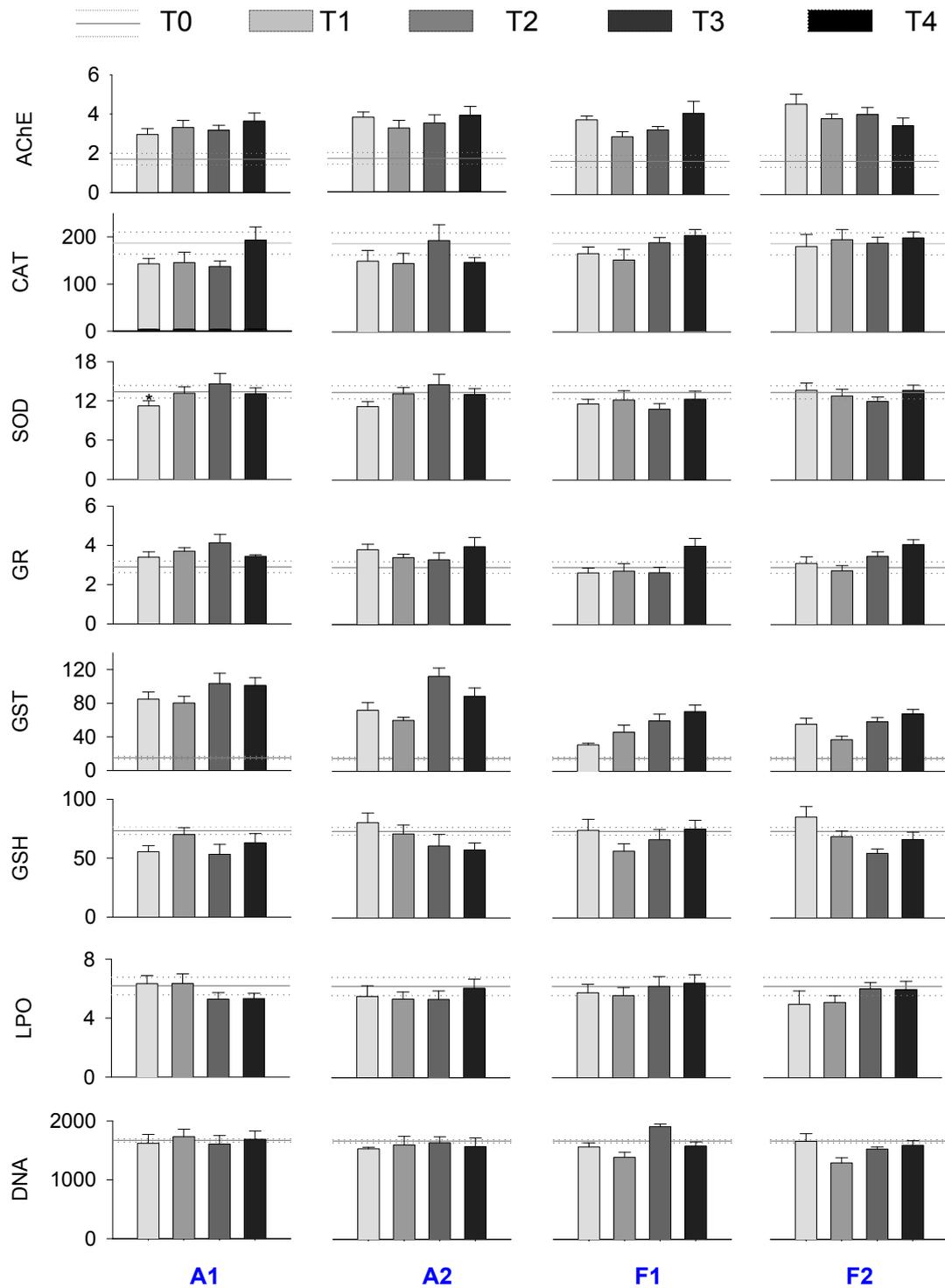


Figura A2. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en branquias de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2008. La línea continua y la línea de puntos representan respectivamente la media y el error estándar de los biomarcadores en las ostras iniciales previo al transplante. La actividad catalasa (CAT) está expresada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot, la superóxido dismutasa (SOD) en U/mg prot. La actividad acetilcolinesterasa (AChE), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión -S-transferasa (GST) están expresados en nmol/min/mg prot. Los niveles de glutatión (GSH) están expresados en nmol/g p.f, los niveles de peroxidación lipídica en nmol MDA/g p.f. y los daños en el ADN están expresados como μg ADN/g p.f

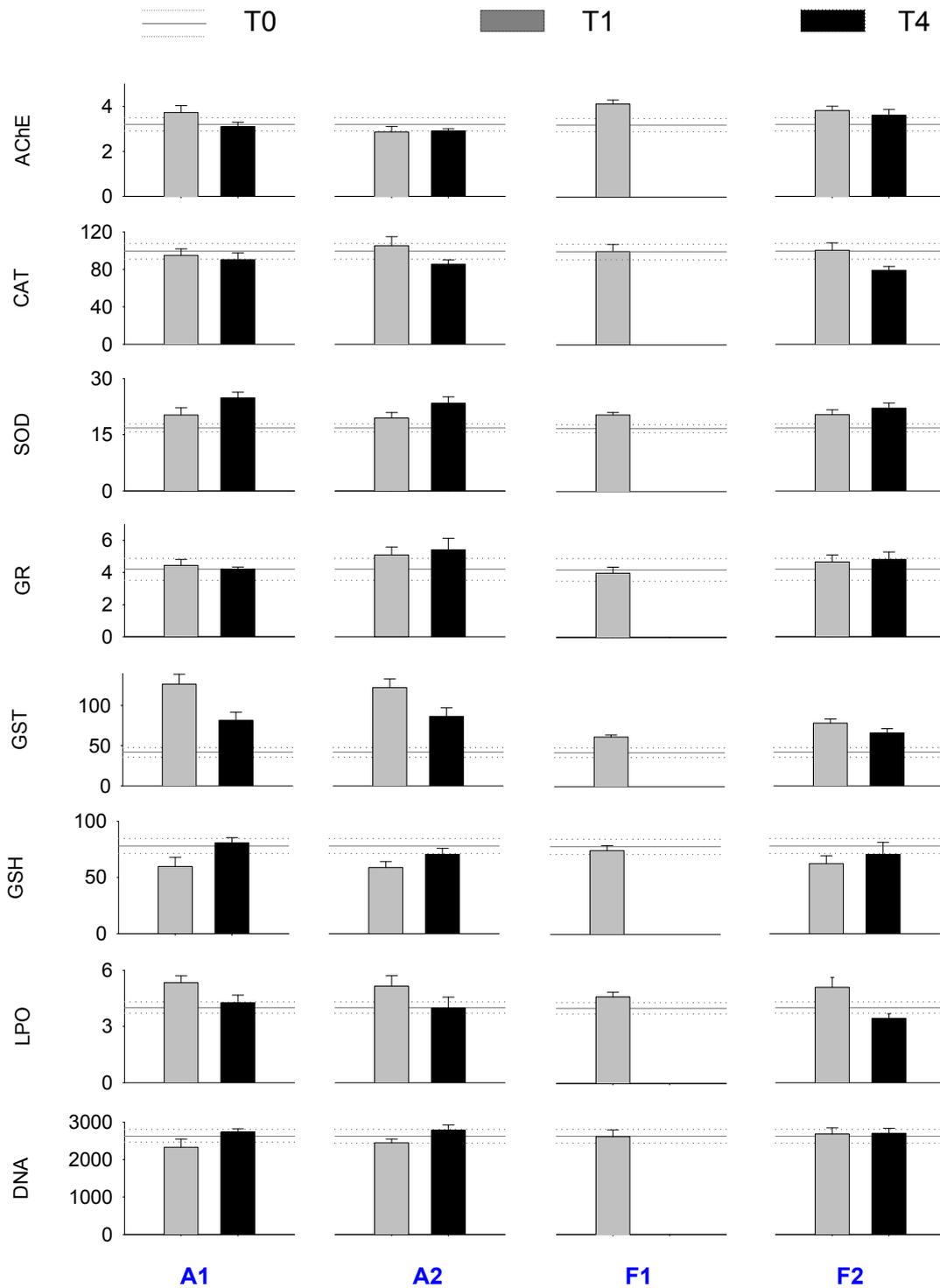


Figura A3. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en branquias de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2009. La línea continua y la línea de puntos representan respectivamente la media y el error estándar de los biomarcadores en las ostras iniciales previo transplante. La actividad catalasa (CAT) está expresada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot, la superóxido dismutasa (SOD) en U/mg prot. La actividad acetilcolinesterasa (AChE), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión -S-transferasa (GST) están expresados en $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ prot. Los niveles de glutatión (GSH) están expresados en nmol/g p.f, los niveles de peroxidación lipídica en $\text{nmol MDA}/\text{g}$ p.f. y los daños en el ADN están expresados como $\mu\text{g ADN}/\text{g}$ p.f.

GLANDULA DIGESTIVA 2008

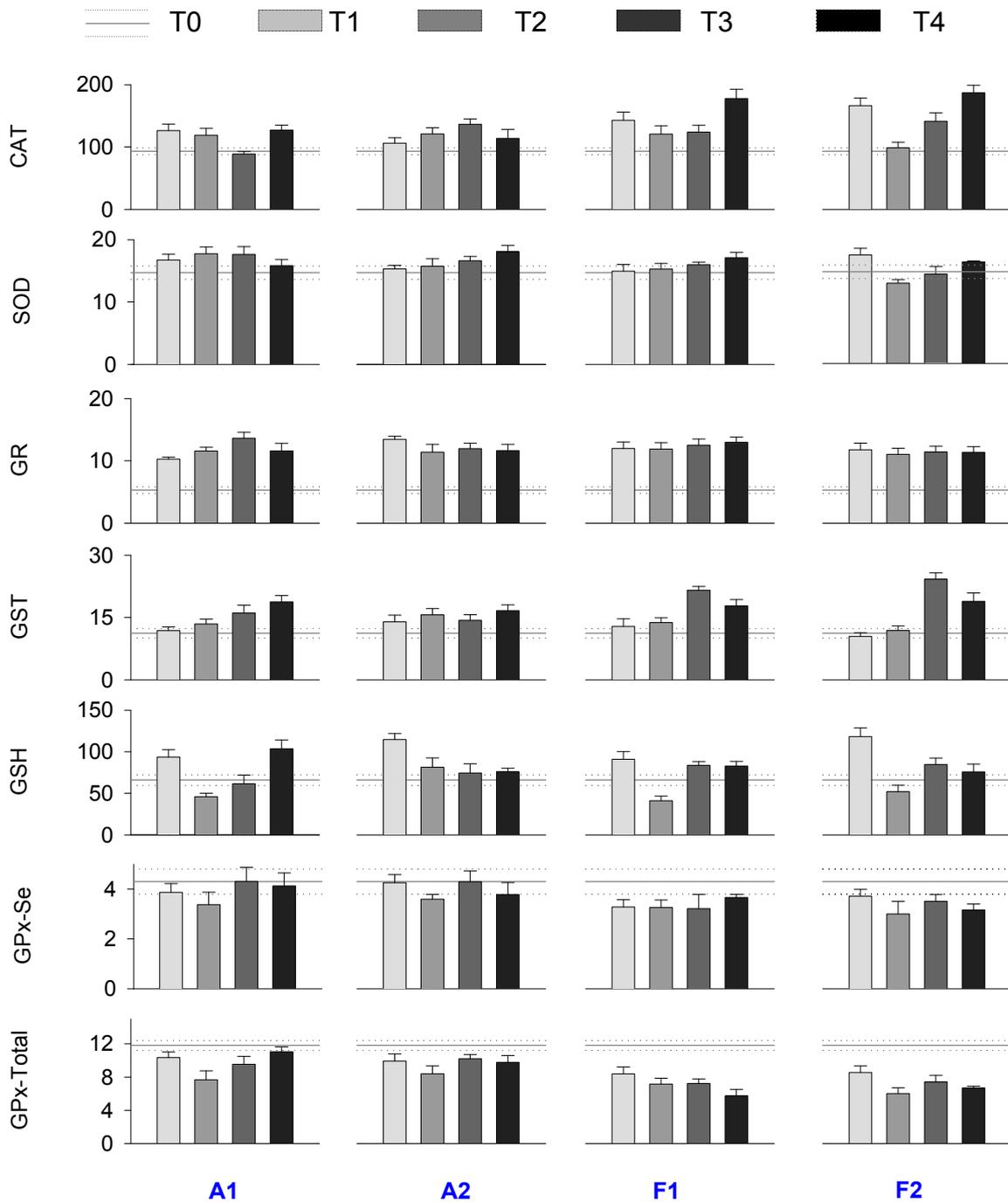


Figura A4. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2008. La línea continua y la línea de puntos representan respectivamente la media y el error estándar de los biomarcadores en las ostras iniciales previo transplante. La actividad catalasa (CAT) está expresada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot, la superóxido dismutasa (SOD) en U/mg prot. La actividad glutatión reductasa (GR), la glutatión -S-transferasa (GST) y la glutatión peroxidasa (GPx) total y dependiente de selenio están expresados en $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ prot. Los niveles de glutatión (GSH) están expresados en nmol/g p.f.

GLANDULA DIGESTIVA 2008

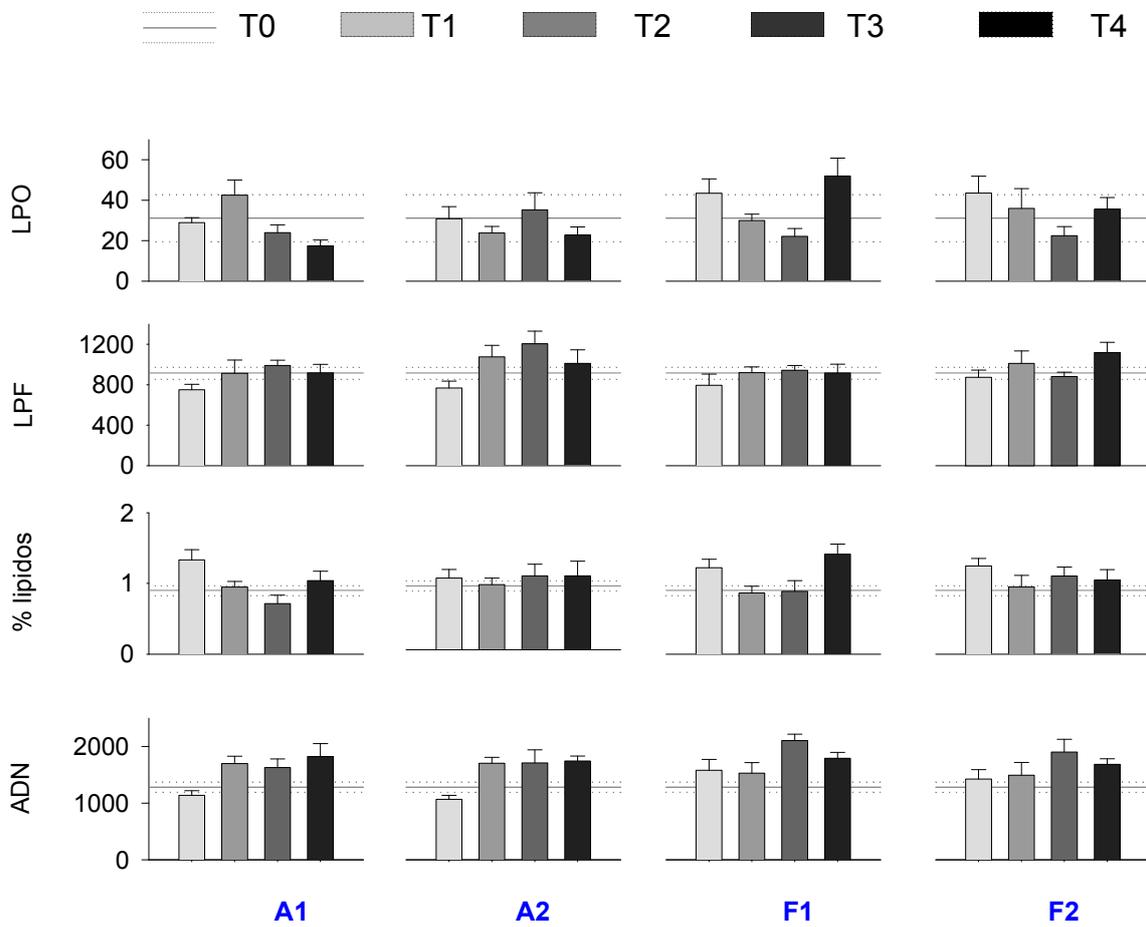


Figura A5. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2008. **Continuación.** La línea continua y la línea de puntos representan respectivamente la media y el error estándar de los biomarcadores en las ostras iniciales previo transplante (n=10). Los niveles de peroxidación de lípidos (LPO), la lipofuscina (LPF), el % lípidos y daños en ADN están expresados respectivamente en nmol MDA equivalentes/g p.f, unidades de fluorescencia arbitrarias/ μ g lípidos, % de peso fresco y μ g ADN/g p.f.

GLANDULA DIGESTIVA 2009

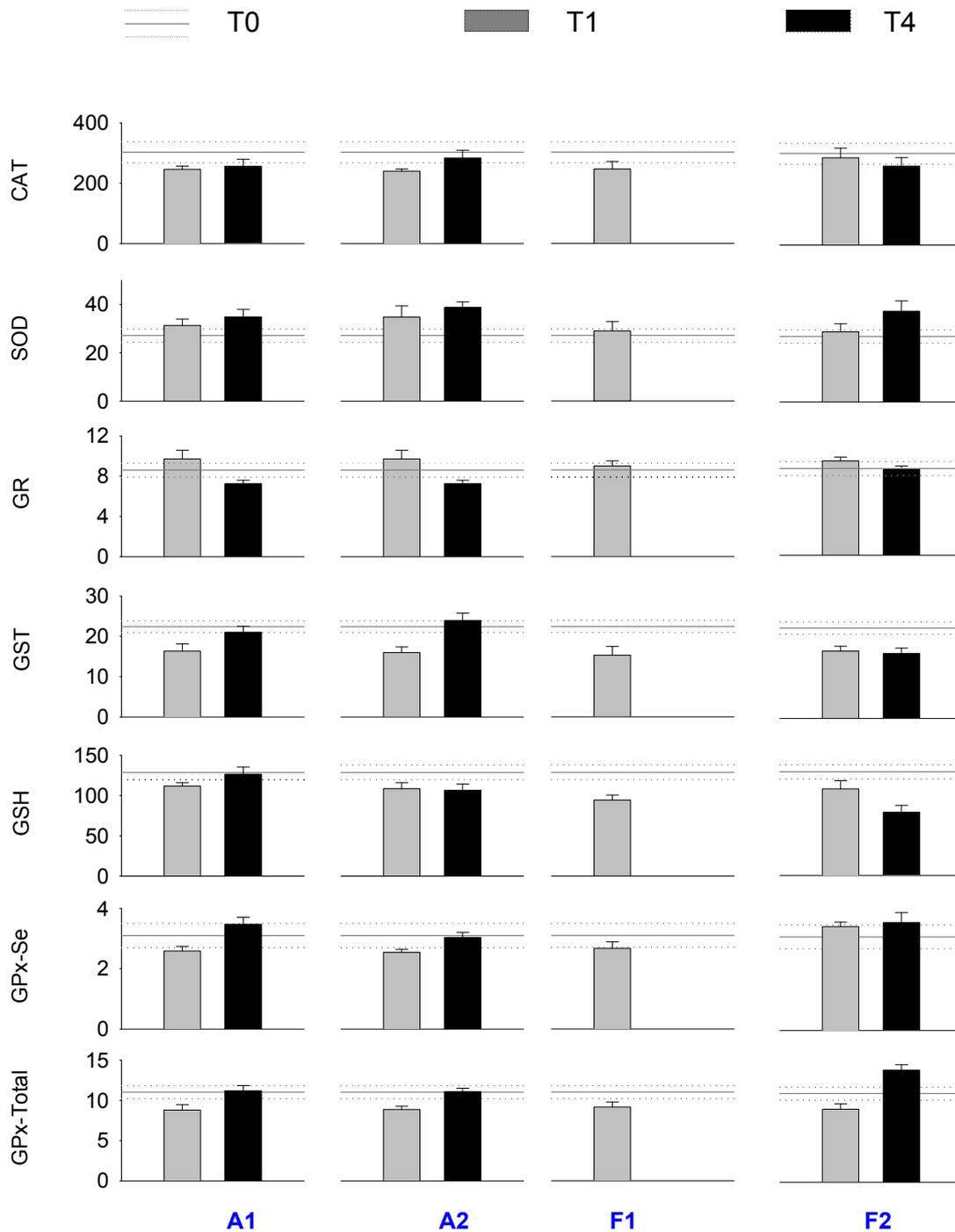


Figura A6. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2009. La línea continua y la línea de puntos representan respectivamente la media y el error estándar de los biomarcadores en las ostras iniciales previo transplante. La actividad catalasa (CAT) está expresada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ prot, la superóxido dismutasa (SOD) en U/mg prot. La actividad glutatión reductasa (GR) y la glutatión -S-transferasa (GST) están expresados en $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ prot. Los niveles de glutatión (GSH) están expresados en nmol/g p.f, los niveles de peroxidación lipídica en $\text{nmol MDA}/\text{g}$ p.f. y los daños en el ADN están expresados como μg p.f.

GLANDULA DIGESTIVA 2009

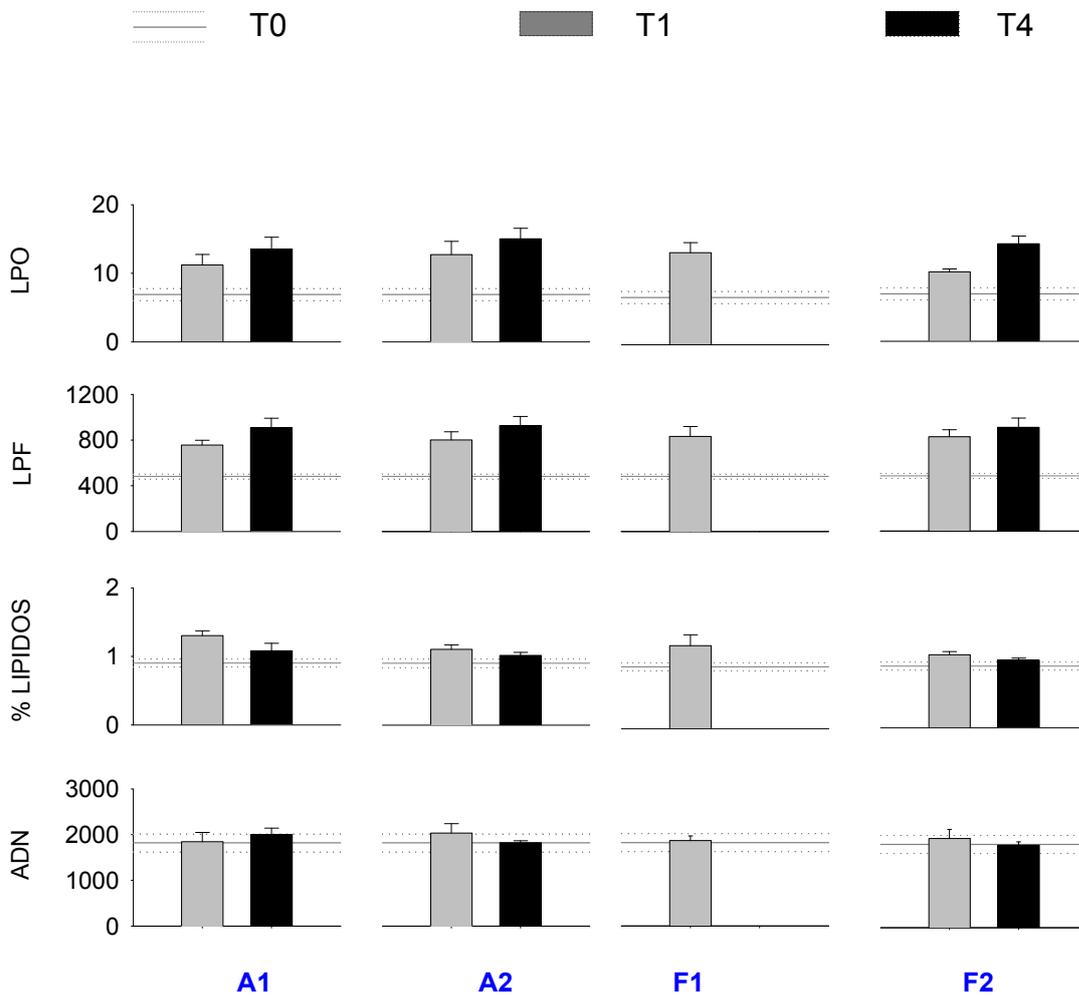


Figura A7. Valores de los biomarcadores (Media \pm Error) (n=10) analizados en glándula digestiva de las ostras en cada punto y periodo de muestreo en el año 2009. **Continuación.** La línea continua y la línea de puntos representan respectivamente la media y el error estándar de los biomarcadores en las ostras iniciales previo transplante (n=10). Los niveles de peroxidación de lípidos (LPO), la lipofuscina (LPF), el % lípidos y daños en ADN están expresados respectivamente en nmol MDA equivalentes/g p.f, unidades de fluorescencia arbitrarias/ μ g lípidos, % de peso fresco y μ g ADN/g p.f.

