



Universitat de Girona

AVALUACIÓ DE LA TOXICITAT DE METALLS
PESANTS I ARSÈNIC EN DIFERENTS MODELS
BIOLÒGICS

Elena FULLADOSA i TOMÀS

ISBN: 84-688-8616-5
Dipòsit legal: GI-1169-2004

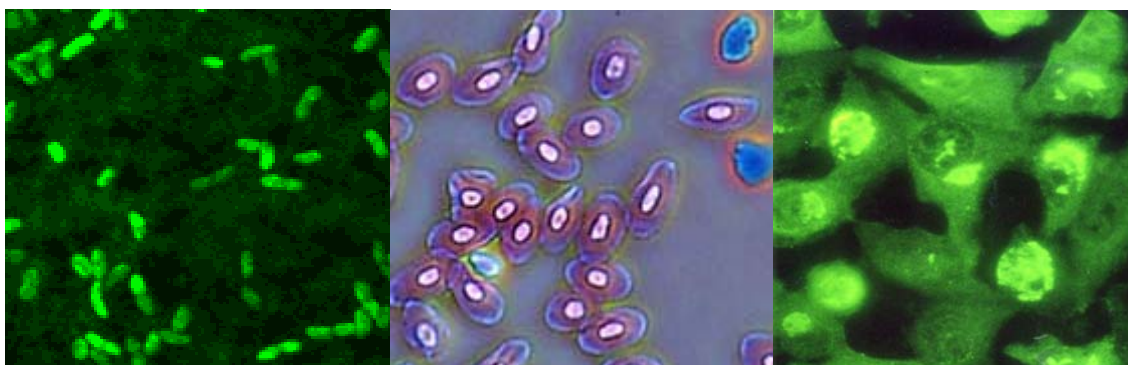


Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química, Agrària i
Tecnologia Agroalimentària

TESI DOCTORAL

**Avaluació de la toxicitat de metalls pesants i
arsènic en diferents models biològics**



Elena Fulladosa i Tomàs

Girona, juliol de 2004



Universitat de Girona

**Departament d'Enginyeria Química, Agrària i
Tecnologia Agroalimentària**

TESI DOCTORAL

**Avaluació de la toxicitat de metalls pesants i
arsènic en diferents models biològics**

Elena Fulladosa

Girona, juliol de 2004

MARIA ISABEL VILLAESCUSA i GIL, professora del Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària de la Universitat de Girona,

CERTIFICA: que la llicenciada Elena Fulladosa i Tomàs ha dut a terme, sota la meva direcció, el treball que, amb el títol “**Avaluació de la toxicitat de metalls pesants i arsènic en diferents models biològics**”, presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar a grau de doctor.

I perquè així consti i tingui els efectes oportuns davant del departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària, signo la present certificació a Girona, 24 de maig de 2004.

Maria Isabel Villaescusa i Gil

Imagine there's no heaven,
It is easy if you try,
No hell below us,
Above only sky,
Imagine all the people,
Leaving for today...

Imagine there's no countries,
It is easy if you try,
Nothing to kill or die for,
No religion too,
Imagine all the people
Leaving live in peace...

Imagine no possessions,
I wonder if you can,
No need for greed or hunger,
A brotherhood of man,
Imagine all the people,
Sharing all the world...

You may say I am a dreamer,
But I am not the only one,
I hope some day you will join us,
And the world will leave as one.

John Lennon

Als meus pares, a l'Alex.

Agraïments

Voldria donar les gràcies a totes aquelles persones que d'una manera o altre han estat al meu costat durant tot aquest temps i han contribuït a la realització d'aquest treball.

Voldria agrair especialment a la Isabel Villaescusa, la meva directora de Tesi per l'interès, dedicació, seguiment present del treball, disponibilitat i ajuda. També per les múltiples lectures d'articles, presentacions a congressos i pòsters, ... i per haver-me donat llibertat per fer el que més m'agrada.

Al professor Jean-Claude Murat del Laboratoire de Biologie Cellulaire et Pollution de la Université Paul Sabatier de Toulouse (França) per l'oportunitat de realitzar una estada al seu laboratori i també per les múltiples col·laboracions. Voldria rendir homenatge al seu optimisme, bon humor i humanitat.

Igualment, a Florence Delmas amb qui he tingut la sort de treballar i qui m'ha sabut aportar tots els coneixements sobre cultiu cel·lular. Així mateix, voldria agrair a Yolande Gaubin, Bernadette Beau i Françoise Croute els seus consells, paciència i les bones estones compartides. També a Jean Pierre Soleilhavoup, director del Laboratoire de Biologie Cellulaire et Pollution per haver-me acceptat al seu laboratori i pel seu tracte sempre amical.

Agraeixo també al Dr. Norman NYS Woo del Laboratory of Fish Biology de la Chinese University of Hong Kong (Xina) per permetre'm realitzar una estada als seus laboratoris i com no, de conèixer una nova cultura. Ha estat un intercanvi científic i cultural enriquidor. Moltes gràcies també a tot el seu equip: Andus NgH i Eddie Deane però especialment a Zhou Liran per la seva ajuda constant i les bones estones passades a tants Km de casa. A en Li Jun per ajudar-me a treure la sang dels meus peixos.

També voldria agrair al Dr. Remy Gourdon del Laboratoire d'Analyses Environnementale des Procédés et des Systèmes Industriels (LAEPSI) de L'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Lyon (França) per haver-me permès de realitzar una petita part d'aquesta Tesi en el seu laboratori. He d'agrair especialment a Valérie Desjardin pel seu suport, consell i disponibilitat durant la realització de la meva estada.

També voldria agrair al Dr. Emili Montesinos per permetre'm utilitzar part de les seves instal·lacions, així com a tot el seu equip per la seva ajuda. Voldria agrair especialment a l'Esther Badosa la seva ajuda i consells.

També voldria agrair molt especialment a la Núria Fiol l'amistat, els ànims, el suport i les bones estones que hem passat juntes, fent o no fent ciència.

A la Núria i la Gemma pel seu ajut amb les comandes i el material, a la Rocio pels ànims i les estones davant del Microtox, a la Farnés i en Pere del Laboratori d'Aigües pels bacteris del Microtox, a tota la gent de la facultat de Ciències que d'alguna manera m'han ajudat, a tots els companys de la segona planta i als del menjador. També voldria agrair a tot el personal del Servei de Microscopia de la Universitat de Girona el seu interès i ajuda.

També voldria donar les gràcies a tots els estudiants ERASMUS que han anat passant pel laboratori durant aquests anys amb els quals he passat molt bones estones. A en Wouter Marcelis, qui continua endavant amb molta empenta i no pas sense dificultats després del greu accident durant la seva estada a Girona. Per la seva força de voluntat i ganes de viure, ell ha estat un exemple per mi i suposo que per tots.

Als meus pares per la seva confiança i suport incondicional durant tots aquests llargs anys d'estudi: pels sucs de taronja al matí, plats de fruita havent sopat, fer de taxistes el cap de setmana i ajudar-me a aixecar cada matí aviat durant període d'exàmens. També al meu germà i la meva cunyada, a en Nil i la Neus, als meus sogres i a la Bet i en Pablo pel seu suport.

A l'Alex, pel seu amor, confiança i per estar al meu costat en tot moment.

RESUM

En aquest estudi, la toxicitat de diversos metalls pesants i l'arsènic va ser analitzada utilitzant diferents models biològics.

En la primera part d'aquest treball, el bioassaig de toxicitat Microtox, el qual està basat en la variació de l'emissió lumínica del bacteri luminescent *Vibrio fischeri*, va ser utilitzat per establir les corbes dosi-resposta de diferents elements tòxics com el Zn(II), Pb(II), Cu(II), Hg(II), Ag(I), Co(II), Cd(II), Cr(VI), As(V) i As(III) en solucions aquoses. Els experiments es varen portar a terme a pH 6.0 i 7.0 per tal de mostrar que el pH pot influir en la toxicitat final mesurada d'alguns metalls degut als canvis relacionats amb la seva especiació química. Es varen trobar diferents tipus de corbes dosi-resposta depenent del metall analitzat i el pH del medi.

En el cas de l'arsènic, l'efecte del pH en la toxicitat de l'arsenat i l'arsenit es va investigar utilitzant l'assaig Microtox en un rang de pHs comprès entre pH 5.0 i 9.0. Els valors d'EC50 determinats per l'As(V) disminueixen, reflectint un augment de la toxicitat, a mesura que el pH de la solució augmenta mentre que, en el cas de l'As(III), els valors d'EC50 quasi bé no varien entre pH 6.0 i 8.0 i només disminueixen a pH 9.0. HAsO_4^{2-} i H_2AsO_3^- es varen definir com les espècies més tòxiques. Així mateix, una anàlisi estadística va revelar un efecte antagònic entre les espècies químiques d'arsenat que es troben conjuntament a pH 6.0 i 7.0.

D'altra banda, els resultats de dos mètodes estadístics per predir la toxicitat i les possibles interaccions entre el Co(II), Cd(II), Cu(II), Zn(II) i Pb(II) en mesclades binàries equitòxiques es varen comparar amb la toxicitat observada sobre el bacteri *Vibrio fischeri*. L'efecte combinat d'aquests metalls va resultar ser antagònic per les mesclades de Co(II)-Cd(II), Cd(II)-Zn(II), Cd(II)-Pb(II) i Cu(II)-Pb(II), sinèrgic per Co(II)-Cu(II) i Zn(II)-Pb(II) i additiu en els altres casos, revelant un patró complex de possibles interaccions. L'efecte sinèrgic de la combinació Co(II)-Cu(II) i la forta disminució de la toxicitat del Pb(II) quan es troba en presència de Cd(II) hauria de merèixer més atenció quan s'estableixen les normatives de seguretat ambiental.

La sensibilitat de l'assaig Microtox també va ser determinada. Els valors d'EC20, els quals representen la toxicitat llindar mesurable, varen ser determinats per cada element individualment i es va veure que augmenten de la següent manera: Pb(II) < Ag(I) < Hg(II) \approx Cu(II) < Zn(II) < As(V) < Cd(II) \approx Co(II) < As(III) < Cr(VI). Aquests valors es varen comparar amb les concentracions permises en aigües residuals industrials establertes per la normativa oficial de Catalunya (Espanya). L'assaig Microtox va resultar ser suficientment sensible per detectar els elements assajats respecte a les normes oficials referents al control de la contaminació, excepte en el cas del cadmi, mercuri, arsenat, arsenit i cromat.

En la segona part d'aquest treball, com a resultats complementaris dels resultats previs obtinguts utilitzant l'assaig de toxicitat aguda Microtox, els efectes crònics del Cd(II), Cr(VI) i As(V) es varen analitzar sobre la taxa de creixement i la viabilitat en el mateix model biològic. Sorprenentment, aquests productes químics nocius varen resultar ser poc tòxics per aquest

bacteri quan es mesura el seu efecte després de temps d'exposició llargs. Tot i això, en el cas del Cr(VI), l'assaig d'inhibició de la viabilitat va resultar ser més sensible que l'assaig de toxicitat aguda Microtox. Així mateix, també va ser possible observar un clar fenomen d'hormesis, especialment en el cas del Cd(II), quan s'utilitza l'assaig d'inhibició de la viabilitat.

A més a més, diversos experiments es varen portar a terme per intentar explicar la manca de toxicitat de Cr(VI) mostrada pel bacteri *Vibrio fischeri*. La resistència mostrada per aquest bacteri podria ser atribuïda a la capacitat d'aquest bacteri de convertir el Cr(VI) a la forma menys tòxica de Cr(III). Es va trobar que aquesta capacitat de reducció depèn de la composició del medi de cultiu, de la concentració inicial de Cr(VI), del temps d'incubació i de la presència d'una font de carboni.

En la tercera part d'aquest treball, la línia cel·lular humana HT29 i cultius primaris de cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba* es varen utilitzar *in vitro* per detectar la toxicitat lliard de metalls mesurant la sobreexpressió de proteïnes d'estrès.

Extractes de fangs precedents de diverses plantes de tractament d'aigües residuals i diferents metalls, individualment o en combinació, es varen analitzar sobre cultius cel·lulars humans per avaluar el seu efecte sobre la taxa de creixement i la capacitat d'induir la síntesi de les proteïnes Hsp72 relacionades amb l'estrès cel·lular. No es varen trobar efectes adversos significatius quan els components s'analitzen individualment. Nogensmenys, quan es troben conjuntament, es produeix un efecte advers sobre tan la taxa de creixement com en l'expressió de proteïnes d'estrès. D'altra banda, cèl·lules sanguínies procedents de *Sparus sarba* es varen exposar *in vitro* a diferents concentracions de cadmi, plom i crom. La proteïna d'estrès HSP70 es va sobreexpressar significativament després de l'exposició a concentracions tan febles com 0.1 µM. Sota les nostres condicions de treball, no es va evidenciar una sobreexpressió de metal·lotioneïnes. Nogensmenys, les cèl·lules sanguínies de peix varen resultar ser un model biològic interessant per a ser utilitzat en anàlisis de toxicitat.

Ambdós models biològics varen resultar ser molt adequats per a detectar acuradament la toxicitat produïda per metalls. En general, l'avaluació de la toxicitat basada en l'anàlisi de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès és més sensible que l'avaluació de la toxicitat realitzada a nivell d'organisme.

A partir dels resultats obtinguts, podem concloure que una bateria de bioassaigs és realment necessària per avaluar acuradament la toxicitat de metalls ja que existeixen grans variacions entre els valors de toxicitat obtinguts emprant diferents organismes i molts factors ambientals poden influir i modificar els resultats obtinguts.

SUMMARY

In this study, the toxicity of some metals and arsenic was investigated using three different biological models.

In the first part of this work, the Microtox[®] bioassay, which is based on variation in light emission by *Vibrio fischeri* luminescent bacteria, was used to establish dose-response curves for several toxic elements, namely, Zn(II), Pb(II), Cu(II), Hg(II), Ag(I), Co(II), Cd(II), Cr(VI), As(V), and As(III), in aqueous solutions. Experiments were carried out at either pH 6.0 or pH 7.0 to indicate that pH may influence the measured toxicity of some elements due to pH-related changes in their chemical speciation. Different types of dose-response curves were found depending on the analyzed metal and pH.

In the case of arsenic, effect of pH on either arsenate or arsenite toxicity, was investigated using the Microtox[®] bioassay within a 5.0 – 9.0 pH range. EC50 values for As(V) were found to decrease, reflecting an increase in toxicity, as pH became basic, whereas in the case of As(III), EC50 values were almost unchanged within a 6.0 – 8.0 pH range and lowered at pH 9.0 only. HAsO_4^{2-} and H_2AsO_3^- were found to be the most toxic species. A statistical approach revealed an antagonistic effect between the arsenate chemical species found in combination at pH 6.0 or 7.0.

On the other hand, results from two mathematical approaches to predict the toxicity of all the possible binary equitoxic mixtures of Co(II), Cd(II), Cu(II), Zn(II), and Pb(II) were compared to the observed toxicity of these mixtures to *Vibrio fischeri* bacteria. Combined effect of the metals was found to be antagonistic for Co(II)-Cd(II), Cd(II)-Zn(II), Cd(II)-Pb(II), and Cu(II)-Pb(II), synergistic for Co(II)-Cu(II) and Zn(II)-Pb(II) and merely additive in other cases, revealing a complex pattern of possible interactions. The synergistic effect of the Co(II)-Cu(II) combination and the strong decrease of Pb(II) toxicity when in the presence of Cd(II) should deserve much attention when establishing environmental safety regulations.

Microtox bioassay sensitivity was also analyzed. EC20 values, which represent a measurable threshold of toxicity, were determined for each element individually and were found to rank as Pb(II) < Ag(I) < Hg(II) \approx Cu(II) < Zn(II) < As(V) < Cd(II) \approx Co(II) < As(III) < Cr(VI). These values were compared to the concentration levels allowed in industrial wastewater according to the official regulations in Catalonia (Spain). It appears that the Microtox[®] test is sensitive enough to detect the tested elements with respect to official regulations dealing with pollution control, with the exception of cadmium, mercury, arsenate, arsenite and chromate.

In the second part of this work, as a complement to previous results obtained using the standard Microtox[®] acute toxicity test, the long-term effects of Cd(II), Cr(VI), and As(V) were studied on growth rate and viability of the same biological model. Surprisingly, these poisonous chemicals were found not to be very toxic to these bacteria when measuring their effect on viability or growth after long periods of exposure. Nevertheless, in the case of Cr(VI), the

inhibition viability assay resulted to be more sensitive than the Microtox acute toxicity test was. Interestingly, it was possible to observe a clear hormesis phenomenon, especially for Cd(II), under the conditions of the viability assay.

In addition, several experiments were performed as an attempt to explain the lack of Cr(VI) toxicity shown by *Vibrio fischeri* bacteria. The resistance shown by *Vibrio fischeri* bacteria could be attributed to the capacity of the bacteria to convert Cr(VI) ions into less toxic Cr(III) ions. This capacity of reduction was found to depend on culture medium composition, initial concentration of chromium, incubation time, and the presence of a carbon source.

In the third part of this work, the HT29 human cell line and primary cultures of *Sparus sarba* blood cells were used *in vitro* to detect metal toxicity thresholds by measuring the overexpression of stress proteins.

Sludge extracts from several wastewater treatment plants and metals, individually or in combination, were tested on human cultured cells for evaluating their ability to affect the growth rate and trigger a synthesis of the stress-related HSP72i proteins. No significant adverse effects were found when given individually. When given in combination, they were however found to affect both cell growth and stress proteins expression.

On the other hand, blood cells freshly collected from *Sparus sarba* were exposed *in vitro* to different concentrations of cadmium, lead or chromium(VI). HSP70 stress protein was significantly overexpressed after exposure to a metal concentration as low as 0.1 μ M. Under our experimental conditions, no overexpression of metallothioneins was evidenced. Nevertheless, fish blood cells appear as an interesting biological model for experimental toxicology.

Both biological models were found convenient to detect toxicity produced by metals. In general, evaluation of toxicity based on stress proteins overexpression was found to be more sensitive than evaluation of toxicity performed at the organism level.

Based on the results, it can be concluded that a battery of bioassays is necessary to accurately evaluate toxicity of metals since important variations between different organisms can be found and a lot of environmental factors may influence as well as modify the obtained results.

RESUMEN

En este estudio, la toxicidad de diversos metales i arsénico fue investigada utilizando diversos modelos biológicos.

En la primera parte de este estudio, el bioensayo de toxicidad Microtox, el cual está basado en la variación de la emisión lumínica de la bacteria luminiscente *Vibrio fischeri*, fue utilizado para establecer las curvas dosis-respuesta de diversos elementos tóxicos como el Zn(II), Pb(II), Cu(II), Hg(II), Ag(I), Co(II), Cd(II), Cr(VI), As(V) y As(III) en soluciones acuosas. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 6.0 y 7.0 para mostrar que el pH puede influir en la toxicidad final observada debido a algunos cambios relacionados con su especiación química. Se encontraron diferentes tipos de curvas dosis-respuesta dependiendo del metal analizado y el pH del medio.

En el caso del arsénico, el efecto del pH en la toxicidad del arsenato y del arsenito fue investigado utilizando el ensayo de toxicidad Microtox en un rango de pH de 5.0 a 9.0. Los valores EC50 del As(V) disminuyen, mostrando un aumento de la toxicidad, a medida que el pH de la solución aumenta, mientras que, en el caso del As(III), los valores EC50 casi no varían entre pH 6.0 y 8.0 y solamente disminuyen a pH 9.0. HAsO_4^{2-} y H_2AsO_3^- se definieron como las especies más tóxicas. Un análisis estadístico reveló un efecto antagónico entre las especies químicas de arsenato que se encuentran conjuntamente en solución a pH 6.0 y 7.0.

Por otro lado, los resultados de dos métodos estadísticos para predecir la toxicidad de todas las posibles interacciones entre los metales en mezclas binarias equitóxicas de Co(II), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Pb(II) se compararon con la toxicidad observada en estas mezclas binarias sobre la bacteria *Vibrio fischeri*. El efecto combinado de estos metales resultó ser antagónico para las mezclas de Co(II)-Cd(II), Cd(II)-Zn(II), Cd(II)-Pb(II) y Cu(II)-Pb(II), sinérgico para Co(II)-Cu(II) y Zn(II)-Pb(II) y aditivo en los otros casos, revelando un patrón complejo de posibles interacciones. El efecto sinérgico de la combinación Co(II)-Cu(II) y la fuerte disminución de la toxicidad del Pb(II) cuando éste se encuentra en presencia de Cd(II) debería merecer más atención cuando se establecen las normativas de seguridad ambiental.

La sensibilidad del bioensayo Microtox también fue determinada. Los valores EC20, los cuales representan la toxicidad umbral medible fueron determinados para cada elemento individualmente y resultaron aumentar de la siguiente forma: Pb(II) < Ag(I) < Hg(II) \approx Cu(II) < Zn(II) < As(V) < Cd(II) \approx Co(II) < As(III) < Cr(VI). Estos valores se compararon con las concentraciones permitidas en aguas residuales industriales establecidas por la Normativa oficial de Catalunya (España). El ensayo Microtox resultó ser suficientemente sensible para detectar los elementos ensayados respecto a las normas oficiales referentes al control de la contaminación excepto en el caso del cadmio, mercurio, arsenato, arsenito y cromato.

En la segunda parte de este trabajo, como resultados complementarios de los resultados previos obtenidos con el ensayo de toxicidad aguda Microtox, los efectos crónicos del Cd(II),

Cr(VI) y As(V) fueron analizados sobre la tasa de proliferación celular y la viabilidad en este mismo modelo biológico. Sorprendentemente, estos productos químicos nocivos resultaron ser poco tóxicos sobre esta bacteria cuando se mide su efecto sobre la viabilidad y crecimiento después de tiempos de exposición largos. De todas formas, en el caso del Cr(VI), el ensayo de inhibición de la toxicidad fue más sensible que el ensayo de toxicidad aguda Microtox. Así mismo, también se pudo observar un claro fenómeno de hormesis, especialmente en el caso del Cd(II), cuando se utiliza el ensayo de inhibición de la viabilidad.

Además, diversos experimentos se llevaron a cabo para explicar la baja toxicidad de Cr(VI) observada en la bacteria *Vibrio fischeri*. La resistencia mostrada por esta bacteria podría ser atribuida a la capacidad de ésta para reducir el Cr(VI) a la forma menos tóxica de Cr(III). Se encontró que esta capacidad de reducción depende de la composición del medio de cultivo, de la concentración inicial de Cr(VI), del tiempo de incubación y de la presencia de una fuente de carbono.

En la tercera parte de este trabajo, la línea celular humana HT29 y cultivos primarios de células sanguíneas de *Sparus sarba* se utilizaron *in vitro* para detectar la toxicidad umbral de metales evaluando la sobreexpresión de proteínas de estrés.

Extractos solubles de lodos procedentes de diversas estaciones depuradoras y diferentes metales, individualmente o en combinación se analizaron sobre cultivos celulares humanos para evaluar su efecto sobre la tasa de crecimiento y inducir la síntesis de las proteínas Hsp72 relacionadas con el estrés celular. No se produjeron efectos adversos significativos cuando los componentes se analizan individualmente. Sin embargo, cuando se encuentran conjuntamente, se produce un efecto adverso sobre la tasa de crecimiento y la expresión de proteínas de estrés.

Por otra lado, células sanguíneas procedentes de *Sparus sarba* se expusieron *in vitro* a diferentes concentraciones de cadmio, plomo y cromo. La proteína de estrés HSP70 se sobreexpresó significativamente después de la exposición a concentraciones tan bajas como 0.1 μM . En nuestras condiciones de trabajo, no se observó una sobreexpresión de metalotioneínas. Sin embargo, las células sanguíneas de pez resultaron ser un modelo biológico interesante para ser utilizadas en análisis de toxicidad.

Los dos modelos biológicos resultaron ser adecuados para detectar la toxicidad producida por metales. En general, la evaluación de la toxicidad basada en el análisis de la sobreexpresión de proteínas de estrés es más sensible que la evaluación de la toxicidad realizada a nivel de organismo.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que una batería de ensayos es realmente necesaria para evaluar específicamente la toxicidad de metales ya que existen grandes variaciones en los valores de toxicidad obtenidos utilizando diferentes organismos y muchos factores ambientales pueden influir y modificar los resultados finales.

Nota al lector

Aquesta memòria consta de les següents parts:

Per començar, es presenta una **Introducció general** de tots els capítols, la qual dóna una visió global i relaciona tots els temes d'aquesta memòria. Seguidament, es presenten cada un dels capítols que formen aquesta memòria els quals contenen una introducció, la descripció del material i mètodes utilitzats i els articles publicats o en procés de revisió, els quals contenen els resultats obtinguts. Al final de cada capítol es presenta una discussió de tots els resultats obtinguts.

El primer capítol està dedicat a l'assaig de toxicitat Microtox i a l'estudi dels factors (com el pH, la composició del medi de cultiu, el temps d'exposició, etc.) que poden afectar als resultats finals de toxicitat determinats amb aquest bioassaig. Els resultats obtinguts de l'estudi de la toxicitat de diversos metalls pesants (Cd(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), Pb(II), Hg(II), Ag(I)) i l'arsènic (As(V) i As(III)) es presenten en 3 articles científics.

Seguidament, **en el segon capítol** d'aquesta memòria, s'estudien i es desenvolupen bioassaigs de toxicitat crònica utilitzant el bacteri *Vibrio fischeri* també utilitzat per l'assaig Microtox. Cultius d'aquest bacteri varen ser utilitzats per avaluar l'efecte dels metalls pesants i arsènic sobre la viabilitat i el creixement d'aquest bacteri. Així mateix, la tolerància de *Vibrio fischeri* davant determinats oxianions es va intentar explicar per la utilització de mecanismes de resistència com la capacitat de reducció del Cr(VI). La darrera part d'aquest estudi es va portar a terme al *Laboratoire d'Analyse Environnementale des Procédés et des Systèmes Industriels (LAEPSI)* de *l'Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Lyon (França)* on anteriorment s'havia posat a punt la metodologia i s'havien portat a terme diversos estudis sobre la reducció del Cr(VI) amb altres soques bacterianes. Els resultats obtinguts en aquest segon capítol es presenten en 2 articles científics.

En el tercer capítol, s'utilitzen dos models biològics sobre els quals s'estudiarà l'efecte d'agents agressors utilitzant l'anàlisi de dos biomarcadors moleculars, les proteïnes d'estrès i les metal·lotioneïnes. Atès que aquest estudi s'ha portat a terme en dos models biològics ben diferenciats, aquest capítol ha estat dividit en dues parts. En **la primera part del tercer capítol** s'utilitzen cultius *in vitro* de cèl·lules humanes establertes per avaluar els efectes tòxics de metalls i extractes de fangs de depuradora conjunta i separatament. Aquest estudi es va portar a terme al *Laboratoire de Biologie cellulaire et Pollution* de la *Université Paul Sabatier de Toulouse (França)*. Els resultats obtinguts durant aquest període es presenten en 2 articles científics.

Així mateix, en *la segona part del tercer capítol* s'utilitzen cultius primaris de cèl·lules sanguínies de vertebrat inferior, específicament *Sparus sarba*, per estudiar la toxicitat de diferents metalls pesants mitjançant l'anàlisi de la sobreexpressió de les proteïnes d'estrès. Una part d'aquest estudi (obtenció de les mostres) es va realitzar al *Laboratory of Fish Biology* de la *Chinese University of Hong Kong (Xina)* però la optimització de la metodologia i la detecció de la sobreexpressió d'aquestes proteïnes d'estrès es va portar a terme a la Universitat de Girona. Els resultats fruit d'aquest treball es presenten en el darrer article científic d'aquesta memòria.

Seguidament, es fa una **Discussió general** de tots els resultats obtinguts englobant tots i cadascun dels temes d'aquesta memòria. Per acabar, es presenten les **Conclusions**, les **Referències bibliogràfiques** i els **Annexes**. En un d'aquests annexes, s'inclouen dos capítols del llibre *Environmental Chemistry* (Springer) encarregat per l'Association of Chemistry and Environment, que recull els resultats més recents de les investigacions que es porten a terme al nostre laboratori (Capítol de llibre 1) i al *Laboratoire de Biologie Cellulaire et Pollution* de la *Université Paul Sabatier de Toulouse* (Capítol de llibre 2). Així mateix, també s'inclou un capítol del llibre *Chemical Industry and Environment* (*Proceedings* del congrés "European Meeting of Chemical Industry and Environment").

ÍNDEX ABREUJAT

INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1 TOXICOLOGIA AMBIENTAL, UNA CIÈNCIA INTERDISCIPLINAR.....	1
2 SUBSTÀNCIES CONTAMINANTS EN EL MEDI AMBIENT: ELS METALLS PESANTS.....	1
2.1 <i>Procedència i estat dels metalls en l'ecosistema</i>	2
2.2 <i>Determinació de la presència de metalls pesants</i>	2
3 TIPUS D'INDICADORS DE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL.....	3
3.1 <i>Indicadors químics</i>	3
3.2 <i>Indicadors biològics</i>	4
4 BIOASSAIGS DE TOXICITAT.....	4
4.1 <i>Classificació i descripció de diferents assaigs de toxicitat</i>	5
4.2 <i>Tipus de paràmetres: corbes dosi-resposta i l'anomenat punt mig</i>	6
5 BIOMARCADORS MOLECULARS DE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL.....	7
5.1 <i>Heat Shock Proteins (HSPs) o Proteïnes d'estrès (SP)</i>	8
5.2 <i>Metal·lotioneïnes (MTs)</i>	12
OBJECTIUS GENERALS DE LA TESI	21
CAPÍTOL I: L'ASSAIG MICROTOX[®]: AVALUACIÓ DE LA TOXICITAT DE METALL PESANTS, ARSÈNIC I LES INTERACCIONS D'AQUESTS EN MESCLES BINÀRIES.	23
I.1 INTRODUCCIÓ	25
I.1.1 L'ASSAIG MICROTOX [®]	25
I.1.1.1 <i>Bioquímica del bacteri</i>	25
I.1.1.2 <i>Reproductibilitat de l'assaig</i>	26
I.1.1.3 <i>Homologacions oficials</i>	26
I.1.2 PARÀMETRES DE TOXICITAT DE L'ASSAIG MICROTOX [®]	27
I.1.3 ESPECIACIÓ QUÍMICA DE METALLS I METAL·LOIDES. GENERALITATS.	27
I.1.3.1 <i>Diagrames d'especiació química</i>	28
I.1.3.2 <i>Biodisponibilitat de les espècies metàl·liques</i>	30
I.1.4 INTERACCIONS ADDITIVES, SINERGÍSTIQUES I ANTAGONÍSTIQUES	30
I.1.5 ANTECEDENTS	31
I.2 MATERIAL I MÈTODES	37
I.2.1 MATERIAL	37
I.2.2 REACTIUS.....	38
I.2.3 PREPARACIÓ DE LES DISSOLUCIONS.....	38
I.2.4 PROTOCOL ESTÀNDARD DE L'ASSAIG MICROTOX	39
I.2.5 TRACTAMENT DE LES DADES DE L'ASSAIG MICROTOX.....	40
I.2.5.1 <i>Concentració efectiva (EC50 i EC20) i unitats de toxicitat (TU)</i>	40
I.2.6 PROCEDIMENTS EXPERIMENTALS.....	41
I.2.6.1 <i>Avaluació de l'efecte de la composició i pH del medi d'assaig</i>	42
I.2.6.2 <i>Avaluació de l'efecte tòxic de metalls pesants i arsènic en medis de diferent pH</i>	42
I.2.6.3 <i>Avaluació de les interaccions entre metalls pesants i espècies d'arsenat en mescles binàries.</i>	43
I.2.7 ANÀLISI ESTADÍSTICA	44
I.2.7.1 <i>Tractament general de dades</i>	44
I.2.7.2 <i>Anàlisi estadística: el Test Student</i>	44
I.2.7.3 <i>Interaccions entre metalls i mescles binàries. Anàlisi estadística</i>	45
I.2.7.4 <i>Interaccions entre diferents espècies d'arsenat en mescles binàries</i>	47
I.3. RESULTATS	49
ARTICLE 1. FULLADOSA, E AND VILLAESCUSA, I. PATTERNS OF METALS AND ARSENIC POISONING IN <i>VIBRIO FISCHERI</i> BACTERIA. <i>ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY</i> (ENVIAT PER PUBLICACIÓ).....	51

ARTICLE 2. FULLADOSA, E AND VILLAESCUSA, I. STUDY ON THE RESULTING TOXICITY OF METAL BINARY MIXTURES USING THE LUMINESCENT BACTERIA <i>VIBRIO FISCHERI</i> AS A BIOLOGICAL TARGET. <i>CHEMOSPHERE</i> (ENVIAT PER PUBLICACIÓ).....	65
ARTICLE 3. FULLADOSA, E., MURAT, JC., MARTINEZ, M AND VILLAESCUSA, I. 2004. EFFECT OF PH ON ARSENATE AND ARSENITE TOXICITY TO LUMINESCENT BACTERIA (<i>VIBRIO FISCHERI</i>). <i>ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY</i> 46 (2):176-182.	79
I.4 DISCUSSIÓ.....	89
CAPÍTOL II. BIOASSAIGS DE TOXICITAT CRÒNICA: EFECTES TÒXICS DEL Cd(II), Cr(VI) I As(V) EN CULTIUS DE VIBRIO FISCHERI. CAPACITAT D'AQUEST BACTERI PER REDUIR EL Cr(VI).....	93
II.1 INTRODUCCIÓ.....	95
II.1.1 ASSAIGS MICROBIANS DE TOXICITAT CRÒNICA.....	95
II.1.1.1 Assaigs d'inhibició de la viabilitat.....	95
II.1.1.2 Assaigs d'inhibició del creixement.....	95
II.1.1.3 Assaigs de toxicitat crònica a nivell molecular.....	96
II.1.1.4 Anàlisis morfològiques utilitzant el SEM.....	97
II.1.2 MECANISMES DE RESISTÈNCIA MICROBIANA ALS METALLS: ASPECTES GENERALS.....	97
II.1.2.1 Adsorció de metalls a les membranes bacterianes.....	97
II.1.2.2 Precipitació de metalls.....	98
II.1.2.3 Mutació dels sistemes d'entrada.....	98
II.1.2.4 Protreïnes d'estrès i metal-lothioneïnes.....	99
II.1.2.5 Inducció de sistemes d'expulsió.....	99
II.1.3 REDUCCIÓ BACTERIANA DEL Cr(VI).....	99
II.1.4 ANTECEDENTS.....	100
II.2 MATERIAL I MÈTODES.....	103
II.2.1 MATERIAL I EQUIPAMENT ESPECÍFIC.....	103
II.2.2 REACTIUS I PRODUCTES.....	103
II.2.3 MEDIS I TAMPONS.....	103
II.2.4 METODOLOGIA.....	104
II.2.4.1 Soca bacteriana i condicions de cultiu.....	104
II.2.4.2 Avaluació del creixement bacterià.....	104
II.2.4.3 Avaluació de la viabilitat bacteriana.....	105
II.2.4.4 Determinació de la concentració de Cr(VI).....	105
II.2.4.5 Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM).....	105
II.2.5 PROTOCOLS DE TREBALL.....	106
II.2.5.1 Avaluació de la toxicitat a nivell cel·lular.....	106
II.2.5.2 Avaluació de la capacitat de reducció de Cr(VI).....	108
II.3 RESULTATS.....	111
ARTICLE 4. FULLADOSA, E AND VILLAESCUSA, I. EFFECT OF CADMIUM(II), CHROMIUM(VI) AND ARSENIC(V) ON LONG-TERM GROWTH AND VIABILITY INHIBITION ASSAYS USING <i>VIBRIO FISCHERI</i> MARINE BACTERIA. <i>ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY</i> (ENVIAT PER PUBLICACIÓ).....	113
ARTICLE 5.- FULLADOSA, E., DESJARDIN, V., VILLAESCUSA, I., GOURDON, R. TOXIC EFFECT AND REDUCTION OF Cr(VI) IN <i>VIBRIO FISCHERI</i> BACTERIA. <i>ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY</i> (ENVIAT PER PUBLICACIÓ).....	131
IV. DISCUSSIÓ.....	147
CAPÍTOL III. LÍNIES CEL·LULARS IN VITRO COM A MODELS BIOLÒGICS PER A L'AVALUACIÓ DE LA TOXICITAT DE METALLS PESANTS UTILITZANT BIOMARCADORS MOLECULARS.	149
III.1 INTRODUCCIÓ GENERAL.....	151

III.1.1 MODELS BIOLÒGICS: CLASSIFICACIÓ SEGONS EL TIPUS DE MATERIAL BIOLÒGIC UTILITZAT.....	151
<i>III.1.1.1 Organismes enters</i>	151
<i>III.1.1.2 Línies cel·lulars establertes</i>	152
<i>III.1.1.3 Cultius de cèl·lules primàries</i>	153
III.1.2 DESCRIPCIÓ TEÒRICA DE LES TÈCNiques UTILITZADES.....	153
<i>III.1.2.1 Quantificació de proteïna total: Mètode Bradford</i>	153
<i>III.1.2.2 Electroforesi amb SDS sobre un gel de poliacrilamida (SDS-page)</i>	154
<i>III.1.2.3 Electrotransferència de proteïnes (Western Blot)</i>	154
<i>III.1.2.4 Immunodetecció</i>	154
<i>III.1.2.5 Assaig Dot-Blot per la detecció de Metal·lotioneïnes</i>	154
III.1.3 MODELS BIOLÒGICS I LÍNIES CEL·LULARS UTILITZADES EN AQUEST ESTUDI.....	155
PRIMERA PART.- LA LÍNIA CEL·LULAR HT29 COM A MODEL BIOLÒGIC PER A L'AVALUACIÓ DE LA TOXICITAT DE METALLS PESANTS I EXTRACTES DE FANGS DE DEPURADORA.	157
III.A.1 INTRODUCCIÓ.....	159
III.A.1.1 DESCRIPCIÓ DEL MODEL BIOLÒGIC UTILITZAT: LA LÍNIA CEL·LULAR HT29.....	159
III.A.1.2 ESTESA DE FANGS DE DEPURADORA EN SÒLS AGRÍCOLS.....	160
III.A.1.3 ANTECEDENTS DE L'ESTUDI.....	161
III.A.2 MATERIAL I MÈTODES.....	163
III.A.2.1 MATERIAL I EQUIPAMENT ESPECÍFIC.....	163
III.A.2.2 REACTIUS I PRODUCTES.....	163
III.A.2.3 MEDIS I TAMPONS.....	164
III.A.2.4 METODOLOGIA.....	164
<i>III.A.2.4.1 Optimització dels protocols de treball</i>	164
<i>III.A.2.4.2 Cultiu i manteniment de la línia cel·lular HT29</i>	165
<i>III.A.2.4.3 Quantificació proteica pel mètode Sulforodamina B (SRB)</i>	165
<i>III.A.2.4.4 Quantificació proteica pel mètode Bradford</i>	166
<i>III.A.2.4.5 Avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès</i>	167
III.A.2.5 PROTOCOLS EXPERIMENTALS.....	168
<i>III.A.2.5.1 Procedència de les mostres de fang</i>	168
<i>III.A.2.5.2 Caracterització dels fangs i preparació dels extractes solubles</i>	169
<i>III.A.2.5.3 Avaluació de l'efecte de concentracions febles d'extractes solubles de fang i determinació dels valors EC20 (Article 6)</i>	170
<i>III.A.2.5.4 Avaluació de l'efecte de metalls pesants separada i conjuntament amb extractes solubles de fang de depuradora (Article 7)</i>	171
III.A.2.6 ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS.....	174
III.A.3 RESULTATS.....	175
ARTICLE 6. DELMAS, F., MAISONNAVE V., FULLADOSA, E., VILLAESCUSA, I SOLEILHAVOUP JP AND MURAT JC. 2000. COMPARATIVE EVALUTATION OF THE POTENTIAL NOXIOUSNESS IN DOMESTIC SLUDGE USED IN AGRICULTURE AND IN COMMERCIAL FERTILIZER. <i>ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY</i> 47:292-297.....	177
ARTICLE 7. FULLADOSA, E., DELMAS, F., JUN LI., VILLAESCUSA I AND MURAT JC. 2002. CELLULAR STRESS INDUCED IN CULTURED HUMAN CELLS BY EXPOSURE TO SLUDGE EXTRACTS FROM WATER TREATMENT PLANTS <i>ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY</i> 53:134-140.....	185
III.A.4 DISCUSSIÓ.....	199
SEGONA PART.- CULTIUS PRIMARIS DE CÈL·LULES SANGUÍNIES D'SPARUS SARBA COM A MODEL BIOLÒGIC PER A L'AVALUACIÓ DE LA TOXICITAT DE METALLS PESANTS.	201
III.B.1 INTRODUCCIÓ.....	203
III.B.1.1 DESCRIPCIÓ DEL MODEL BIOLÒGIC UTILITZAT; CÈL·LULES SANGUÍNIES D'SPARUS SARBA (ORADA).....	203
III.B.1.2 AGRESSORS D'ORGANISMES MARINS.....	204

III.B.1.3 BIOMARCADORS DE CONTAMINACIÓ AMBIENTAL EN VERTEBRATS INFERIORS	205
<i>III.B.1.3.1 Biomarcadors no específics</i>	205
<i>III.B.1.3.2 Biomarcadors específics</i>	206
III.B.1.4 HSP70 I METALLOTHIONEINES EN PEIXOS; BIOMARCADORS MOLECULARS DE TOXICITAT.....	206
III.B.1.5 ANTECEDENTS	207
III.B.2 MATERIAL I MÈTODES	209
III.B.2.1 MATERIAL I EQUIPAMENT ESPECÍFIC	209
III.B.2.2 REACTIUS, PRODUCTES I PREPARACIÓ DE DISSOLUCIONS	209
III.B.2.3 PROTOCOLS EXPERIMENTALS	210
<i>III.B.2.3.1 Peixos</i>	210
<i>III.B.2.3.2 Extracció i rentats de la sang obtinguda</i>	210
<i>III.B.2.3.3 Assaigs previs</i>	211
<i>III.B.2.3.4 Primera sèrie d'experiments: Efecte del temps de recuperació en l'expressió de proteïnes d'estrès en cèl·lules sanguínies</i>	211
<i>III.B.2.3.5 Segona sèrie d'experiments: Avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès en cèl·lules sanguínies després de l'exposició a diferents concentracions de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI)</i>	212
<i>III.B.2.3.6 Extracció proteica</i>	213
III.B.2.4 AVALUACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES D'ESTRÈS I METAL·LOTHIONEINES.....	213
<i>III.B.2.4.1 Optimització del mètode de treball</i>	214
<i>III.B.2.4.2. Anàlisi de les mostres. Descripció del protocol de treball.</i>	219
<i>III.B.2.4.3 Representació dels resultats i tractament de dades</i>	222
III.B.2.5 ANÀLISI ESTADÍSTIC DELS RESULTATS.....	224
<i>III.B.2.5.1 Efecte de la concentració de metall. Test student.</i>	224
<i>III.B.2.5.2 Efecte del temps d'exposició. Test Student de dades aparellades</i>	224
III.B.3 RESULTATS	225
ARTICLE 8. FULLADOSA, E., DEANE, E, AHY. NG, WOO NYS AND VILLAESCUSA, I. STRESS PROTEINS EXPRESSION IN <i>SPARUS SARBA</i> L. BLOOD CELLS AFTER EXPOSURE TO CADMIUM, LEAD AND CHROMIUM. <i>JOURNAL OF FISH BIOLOGY</i> (ENVIAT PER PUBLICACIÓ).	227
III.B.4 DISCUSSIÓ	237
DISCUSSIÓ GENERAL	241
CONCLUSIONS	245
REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	251
ANNEXES	265
ANNEX 1. DIAGRAMES D'ESPECIACIÓ QUÍMICA.....	267
ANNEX 2 MEDIS, TAMPONS I SOLUCIONS	271
ANNEX 3. ALTRES DOCUMENTS PUBLICATS	277
Capítol de llibre 1.- Fulladosa E., Villaescusa I. 2004. Study of Cr(VI) and Cd(II) ions toxicity using the Microtox bacterial assay. In: Environmental Chemistry – Springer book (acceptat i en procés de publicació).	279
Capítol de llibre 2.- Fulladosa E., Gaubin Y., Skandrani D., Villaescusa I., Murat JC. 2004. Cultured human cells as biological detectors for assessing environmental toxicity. In: Environmental Chemistry – Springer book (acceptat i en procés de publicació).	293
Capítol de llibre 3.- Fulladosa, E., Murat, JC., Martínez M., Villaescusa, I. 2003. Biological indicators for assessing metal toxicity. In: Chemical Industry and Environment – Edited by Macías-Machin and Umbría, pp. 359-367.	303

INTRODUCCIÓ GENERAL

INTRODUCCIÓ GENERAL

1 Toxicologia ambiental, una ciència interdisciplinar

L'estudi de l'impacte de substàncies contaminants sobre l'estructura i funcionament dels sistemes ecològics és la ciència anomenada Toxicologia ambiental, la qual inclou una gran varietat de disciplines ja que l'avaluació de l'impacte d'agents químics agressors, bàsicament antropogènics, en els sistemes biològics necessita de l'aportació de coneixements d'ecologia, química, biologia, matemàtiques i altres. L'ecologia aporta les bases per interpretar l'impacte dels agents agressors sobre el funcionament i l'estructura dels ecosistemes mentre que la biologia molecular descriu les interaccions de l'organisme amb l'agent tòxic a nivell molecular. D'altra banda, la química analítica permet estimar les concentracions exactes d'aquests agents tòxics al medi ambient. L'aplicació de l'estadística als problemes biològics proporciona eines per l'anàlisi de dades. La microbiologia i la genètica molecular ajuden a entendre el destí i la transformació de contaminants ambientals però també poden aportar eines eficients de bioremediació (restauració de l'ecosistema) (Landis i Yu, 1999). En aquest estudi, s'han emprat diverses de les disciplines esmentades anteriorment.

2 Substàncies contaminants en el medi ambient: els metalls pesants

Diferents compostos, naturals o antropogènics, poden produir efectes tòxics importants al medi ambient. Aquesta toxicitat pot definir-se com la propietat d'un material per produir un efecte perjudicial sobre un sistema biològic o ecosistema.

Existeixen diferents tipus de substàncies tòxiques. D'una banda, tenim compostos naturals extremadament tòxics com la endotoxina butílica o diverses toxines fúngiques, les quals, tot i ser molt tòxiques, com que no se'n produeixen en grans quantitats, no provoquen afectes perjudicials importants al medi ambient. D'altra banda, també existeixen compostos d'origen antropogènic, a vegades menys tòxics que els anteriors, que suposen una problemàtica ambiental important degut a les grans quantitats abocades al medi ambient cada any (Landis i Yu, 1999). Dintre d'aquests compostos antropogènics s'inclouen els pesticides, agents químics industrials, lubricants, petroli o metalls pesants, els quals tenen una gran persistència al medi ambient.

Entre els diferents grups de substàncies contaminants que poden trobar-se al medi ambient, el grup dels metalls pesants és un dels més importants. Una primera classificació dels metalls és aquella que els divideix en tres grups segons les seves característiques i propietats; són els anomenats metalls, metal·loides i metalls pesants. En general, els metalls es defineixen com els elements químics sòlids que són bons conductors de l'electricitat i la calor. Nogensmenys, no tots els metalls compleixen aquestes característiques. Metalls com l'As, B, Ge i Te són

generalment considerats metal·loides o semimetalls ja que tenen característiques intermitges entre els metalls i els no metalls. Així mateix, els metal·loides poden provocar efectes tòxics diferents als metalls ja que tenen químiques diferents. D'altra banda, anomenem metalls pesants als metalls que tenen un pes específic més gran de 5 g/ml.

Tot i la gran toxicitat atribuïda a aquest grup, cal destacar que existeixen grans diferències de toxicitat segons el metall en qüestió. Es pot fer una primera classificació segons la seva toxicitat. Així podem trobar des de metalls molt tòxics com el Cd, Hg o Pb que poden produir efectes perjudicials de més o menys gravetat fins a metalls anomenats essencials o traça, necessaris en quantitats molt petites per a la vida dels organismes vius degut a que juguen un paper important en el metabolisme de l'organisme en qüestió. Tot i això, cal dir que concentracions superiors a les essencials d'aquests metalls també poden produir efectes tòxics importants. Aquest seria el cas del Mg, Mn, Fe, Cu, Zn i Mo, entre d'altres (Van Leeuwen i Hermens, 1996).

2.1 Procedència i estat dels metalls en l'ecosistema

La font d'aquesta gran quantitat de metalls abocats al medi ambient pot ser d'origen natural (erosió química i física de roques metamòrfiques i descomposició de plantes i animals, etc...) o d'origen antropogènic (combustió de petroli, abocaments d'indústries, etc...). Darrerament, les activitats humanes estant provocant la modificació dels cicles bioquímics i geoquímics d'aquests metalls, els quals persisteixen en el medi ambient ja que no poden ser degradats o destruïts. Així, aquests metalls existeixen en les aigües superficials en forma col·loidal, particulada o dissolts. Es poden trobar en forma (1) d'hidròxids, òxids, silicats o sulfits, (2) adsorbts sobre la matèria orgànica o silicats i (3) dissolts en forma d'ions, quelats organometàl·lics o complexos. La solubilitat d'aquests metalls està controlada pel pH de l'aigua, el tipus i concentracions de lligands en els quals els metalls poden quedar adsorbts i l'estat d'oxidació dels components minerals i del medi on es troben. Cal remarcar que les propietats fisico-químiques del medi poden provocar canvis en l'estat d'oxidació i en la formació de diferents espècies metàl·liques, les quals poden provocar canvis importants en la biodisponibilitat i toxicitat d'aquests metalls. Aquest fet es posarà de manifest al llarg d'aquesta memòria (Merian, 1991).

2.2 Determinació de la presència de metalls pesants.

L'aplicació de tècniques químiques analítiques en estudis de contaminació ambiental aporten valors que fan referència a la concentració de metalls en ambients aquàtics i terrestres. Això no només permet la identificació de fonts de contaminació sinó també un control efectiu del compliment de la legislació. És de vital importància el control de les concentracions de metalls pesants de les aigües potables de consum públic així com el control de l'abocament d'aigües

industrials al medi ambient. Existeixen legislacions europees i estatals que determinen les concentracions màximes admissibles de cada un dels metalls pesants.

Nogensmenys, aquestes tècniques químiques analítiques no permeten diferenciar entre les diferents espècies químiques que poden formar els diferents metalls pesants, les quals seran diferents depenent del medi que els envolti. Tal i com s'ha descrit anteriorment, en els sistemes aquàtics es poden formar complexos de més o menys grandària o es poden formar complexos orgànics que poden augmentar o disminuir l'accessibilitat del metall a l'interior dels organismes vius. També es poden formar precipitats que fan disminuir la biodisponibilitat dels metalls per la majoria d'organismes vius. Les tècniques analítiques tampoc permeten avaluar les interaccions que es poden produir entre diferents metalls presents en el medi, les quals poden interaccionar donant lloc a sinergismes o antagonismes.

Per tot això, si es vol conèixer de forma acurada la toxicitat global d'una mostra, no serà suficient fer una anàlisi química d'aquesta. Les anàlisis químiques mesuren les concentracions de metalls o metal·loides les quals, depenent de les condicions, poden provocar toxicitats més o menys elevades sobre un determinat organisme viu i sobre l'ecosistema. Així doncs, serà necessari utilitzar indicadors de toxicitat o de contaminació ambiental, les característiques i classificacions dels quals es descriuen a continuació.

3 Tipus d'indicadors de contaminació ambiental

Anomenen indicadors als canvis físics, químics o biològics que s'expressen, s'indueixen, canvien o es detecten sobre un determinat organisme viu com a conseqüència de l'acció d'un agent tòxic. Diferents tipus de marcadors, químics i biològics, poden utilitzar-se per avaluar l'impacte de substàncies contaminants sobre els organismes vius i a la vegada sobre l'ecosistema (Landis i Yu, 1999).

3.1 Indicadors químics

Un d'aquests marcadors o indicadors químics podria ser la concentració d'un determinat compost (metall, pesticida, ..etc) en els teixits d'un organisme viu en concret, el qual demostraria l'exposició d'aquest organisme a aquest agent agressor. Un dels grans avantatges d'aquestes determinacions analítiques és la capacitat que tenen d'estimar l'exposició dels agents agressors al model biològic. Tot i que l'exposició no està necessàriament lligada als efectes perjudicials o a les variacions produïdes a nivell de població o comunitat, aquestes anàlisis ens poden donar una idea dels nivells d'exposició. El desavantatge d'aquest mètode és la incapacitat de mesurar tots els possibles agents agressors als qual l'organisme en qüestió hagi pogut estar exposat. Per tant, és necessari limitar l'objectiu de l'estudi a la investigació de determinats compostos susceptibles de ser trobats o aquells establerts per la normativa. D'altra

banda, mesclades de diversos compostos a baixes concentracions poden ser impossibles de detectar i produir impactes ecològics importants. A més a més, tot i haver-hi una relació entre els compostos quantificats i la toxicitat produïda, agents tòxics fàcilment detectables analíticament poden provocar poca toxicitat o al contrari, compostos difícils de mesurar poden produir efectes perjudicials molt importants. La química analítica no mesura la toxicitat.

3.2 Indicadors biològics

El recent desenvolupament de diversos tests fisiològics i moleculars per predir els efectes d'aquests agents agressors ha estat un gran avenç. Aquests assaigs utilitzen indicadors biològics per avaluar l'efecte tòxic d'un determinat agent agressor. Aquests indicadors biològics poden ser molt diversos (des d'anàlisis de danys del DNA fins a índexs fisiològics o de comportament), els quals han estat englobats dins el terme general de biomarcadors.

Els biomarcadors són aquells indicadors de canvi a qualsevol dels nivells d'organització biològica (poblacions d'organismes, organismes enters, cèl·lules i teixits en cultiu) degut a l'exposició d'aquests a agents agressors químics o físics. Els biomarcadors analitzats a nivells elevats d'organització biològica (òrgans, teixits i organismes enters) inclouen els canvis produïts en el metabolisme, fisiologia, morfologia, histologia o immunologia. A nivells moleculars i subcel·lulars d'organització, aquests biomarcadors fan referència bàsicament a canvis en àcids nucleics i proteïnes (Ryan i Hightower, 1994), són els anomenats biomarcadors moleculars. Normalment, aquests biomarcadors moleculars permeten avaluar d'una manera eficaç i precoç l'efecte dels agents agressors exposats a un organisme en concret abans que aquest efecte es manifesti a nivells superiors.

En el següent apartat, es descriuen i es classifiquen els diferents tipus de bioassaigs de toxicitat, sobre els quals poden avaluar-se o quantificar-se diferents indicadors químics i biològics anteriorment esmentats (Landis i Yu, 1999; Munawar et al., 1995). Alguns d'ells utilitzats en aquest estudi per avaluar l'efecte tòxic de metalls i l'arsènic.

4 Bioassaigs de toxicitat

Els bioassaigs són mètodes que utilitzen organismes vius per avaluar experimentalment al laboratori, la toxicitat global de determinades substàncies en el medi ambient. Es determina la resposta biològica (creixement, mortalitat, inhibició enzimàtica, inducció de proteïnes d'estrès o MTs) dels organismes exposats (bacteris, algues, peixos o cultius cel·lulars entre d'altres), permetent l'avaluació de l'efecte tòxic de les substàncies analitzades.

4.1 Classificació i descripció de diferents assaigs de toxicitat

Una primera divisió dels bioassaigs de toxicitat es basa en el temps d'exposició del model biològic als agents agressors i com a conseqüència d'això en el tipus de paràmetre analitzat.

D'una banda, tenim els bioassaigs de toxicitat aguda que es desenvolupen normalment per avaluar la resposta de l'organisme a l'agent agressor durant un període curt de temps. Les espècies més utilitzades com a organismes prova en aquest tipus d'assaig són el crustaci *Daphnia magna* i *Cerodaphnia dubia*, l'alga *Lemna minor* i *Selenastrum Carpicornutum*, el bacteri *Vibrio fischeri* o activitats enzimàtiques, entre molts d'altres (Hoffman et al., 1995). Aquest bioassaigs de toxicitat aguda normalment es porten a terme utilitzant 5 concentracions de l'agent agressor, un control positiu i un control negatiu. D'altra banda, els bioassaigs de toxicitat crònica avaluen els efectes subletals de determinats agents agressors després de temps d'exposicions més llargs sobre el creixement, reproducció, comportament o alteracions bioquímiques de l'organisme prova en qüestió. Normalment, el temps d'exposició dependrà del cicle de vida de l'organisme prova utilitzat en el bioassaig, el qual ha d'incloure com a mínim una desena part del cicle de l'organisme en qüestió. Diverses espècies han estat utilitzades com a organisme prova d'aquests bioassaigs de toxicitat crònica com el peix *Salvelinus fontinalis* o el crustaci *Daphnia magna* i *Cerodaphnia dubia*, utilitzant només els estadis de vida més sensibles d'aquest organisme (Hoffman et al., 1995). També es poden portar a terme els bioassaigs de toxicitat en flux continu, en els quals es reemplaça l'agent agressor de forma contínua ja sigui amb un flux continu d'entrada i sortida o amb intervals intermitents. En aquests bioassaigs s'assegura que la concentració d'agent agressor sigui constant i que no hi hagi acumulació de subproductes del metabolisme de l'organisme prova.

Els bioassaigs de toxicitat també poden classificar-se en dos grans categories segons el tipus d'organisme prova que utilitzen; una primera categoria correspondria als bioassaigs que utilitzen organismes eucariotes, en el qual s'inclourien peixos, invertebrats, algues i protozous i una segona categoria que inclouria enzims i microorganismes.

4.1.1 Assaigs de toxicitat estandarditzats

Diversos assaigs de toxicitat han estat estandarditzats i posteriorment comercialitzats per diverses cases comercials per tal de minimitzar les variacions dels resultats finals obtinguts en els assaigs de toxicitat. Un dels assaigs estandarditzats més utilitzats ha estat l'assaig "Microtox[®] acute toxicity test" el qual mesura la inhibició de l'emissió lumínica del bacteri *Vibrio fischeri* després de 5 i 15 minuts d'exposició (Bulich, 1986; Ribó i Kaiser, 1993; Somasundaram et al., 1990; Carlson-Ekval i Morrison, 1995; Ruiz et al., 1997). Aquest assaig de toxicitat estandarditzat ha estat molt utilitzat per a l'avaluació de la contaminació ambiental i afluents industrials. D'altra banda, el "Microtox[®] chronic toxicity test" mesura aquest mateix paràmetre

però després de 22 hores d'exposició a l'agent agressor (Hsieh et al., 2004). D'altra banda, l'assaig Mutatox[®] utilitza el bacteri *Vibrio fischeri* M169 per mesurar i detectar la presència d'agents genotòxics d'una manera ràpida i sensible. Tots aquests assaigs de toxicitat estan actualment comercialitzats per Azur Environmental (www.azurenv.com) i utilitzen microorganismes com a organisme prova.

D'altra banda també hi ha assaigs de toxicitat estandarditzats que utilitzen altres organismes vius com l'assaig de toxicitat Duckweed comercialitzat per LemnaTec, el qual mesura la inhibició del creixement de *Lemna minor* (Ince et al., 1999; www.Lemnatec.com). Altres assaigs de toxicitat com el MitoScan utilitzen fongs per a l'estudi de la toxicitat mitjançant la inhibició de l'activitat enzimàtica d'enzims relacionats amb l'activitat mitocondrial.

Nogensmenys, hi ha determinats assaigs no comercialitzats que seguint un protocol de treball molt específic poden donar resultats molt repetitius. Algun d'aquests han estat fins i tot homologats per organismes oficials. El creixement i la supervivència del peix *Pimephales promelas* després de 6 o 8 dies d'exposició o la supervivència i reproducció de *Ceriodaphnia dubia* o *Daphnia magna* després de 6 i 8 dies d'exposició també han estat utilitzats des de fa temps per a l'avaluació de l'impacte ambiental de determinats agents agressors (Jop et al., 1986; Khangarot i Ray, 1987; Baird et al., 1989; Nikunen i miettinen, 1995; www.reiclabs.com/bioserv.html).

4.2 Tipus de paràmetres: corbes dosi-resposta i l'anomenat punt mig

La gràfica que descriu la resposta d'un enzim, organisme, població o comunitat biològica en un rang de concentracions d'un determinat agent agressor és l'anomenada corba dosi-resposta. Diferents paràmetres com la inhibició enzimàtica, danys a nivell de DNA, la mortalitat, canvis de comportament i altres respostes es poden descriure utilitzant aquesta relació.

Concretament, dos paràmetres d'aquesta corba són normalment utilitzats per descriure el comportament del model biològic utilitzat davant d'un determinat agent agressor; la concentració o dosi que provoca un 50% d'efecte i el pendent de la part lineal d'aquesta corba. Ambdós paràmetres són necessaris per descriure acuradament la relació entre la concentració d'agent tòxic i l'efecte produït. El punt mig és normalment anomenat LD50 (dosi letal que causa un 50% de la mortalitat dels organismes utilitzats en l'assaig), EC50 (concentració efectiva que causa un 50% d'efecte en un determinat paràmetre) o IC50 (concentració inhibidora que redueix en un 50% la resposta normal de l'organisme) (Landis i Yu, 1999).

En la majoria dels estudis, la toxicitat d'un determinat agent agressor es presenta utilitzant només el valor d'efecte mig. Aquesta pràctica pot portar a interpretacions errònies dels resultats ja que hi ha corbes on la EC50 és la mateixa però el pendent de la corba dosi-resposta és diferent. En canvi, hi ha agents agressors que poden tenir EC50 diferents però els pendents de

la corba dosi-resposta són similars, indicant que el mode d'acció dels dos agents agressors és similar.

També s'utilitzen altres paràmetres per descriure les concentracions que tenen un efecte mínim o inexistent sobre els organismes vius. Són els anomenats NOEC (non observed effect concentration), NOEL (non observed effect level), NOAEC (non observed adverse effect concentration), NOAEL (non observed adverse effect level), LOEC (low observed effect concentration), LOEL (low observed effect level), MTC (minimal threshold concentration), MTAC (minimal threshold allowed concentration). Aquestes concentracions o dosis es refereixen a les concentracions o dosis que no produeixen un efecte estadísticament significatiu (Landis i Yu, 1999).

Alguns dels bioassaigs de toxicitat anteriorment esmentats avaluen l'efecte tòxic de l'agent agressor utilitzant els indicadors biològics també anomenats biomarcadors moleculars de contaminació ambiental descrits a continuació.

5 Biomarcadors moleculars de contaminació ambiental

Els organismes vius estan exposats a una gran quantitat d'agressors ambientals de diferents tipus als quals responen i en alguns casos s'adapten per tal de poder sobreviure. Algunes de les respostes a aquests agressors poden utilitzar-se com a biomarcadors moleculars de contaminació ambiental donant així, informació sobre la nocivitat de l'agent agressor sobre l'organisme viu en concret. Així, un augment de l'expressió d'aquests biomarcadors moleculars de contaminació ambiental indicaria que l'organisme ha estat exposat a agents agressors i mitjançant l'avaluació d'aquesta sobreexpressió es podria quantificar quina ha estat la nocivitat que l'agent agressor ha causat sobre l'organisme viu estudiat.

Existeixen diferents tipus de biomarcadors moleculars de contaminació ambiental. Un d'aquests biomarcadors és el citocrom P450, les variacions d'activitat del qual davant determinades substàncies orgàniques i pesticides, fan d'aquest un bon biomarcador d'aquestes substàncies (Payne et al., 1987; Perez et al., 2004). D'altra banda, les proteïnes antioxidants (superòxid dismutases, catalases, peroxidases) són proteïnes que ajuden a prevenir els danys cel·lulars resultants de l'estrès oxidatiu causat bàsicament per radicals lliures generats a les cèl·lules durant els processos metabòlics normals. Aquestes també han estat utilitzades com a marcadors moleculars de contaminació ambiental (Lukkari et al., 2004). L'anàlisi de les proteïnes reguladores de glucosa també són un grup de proteïnes que s'utilitzen com a biomarcadors, les quals responen a una gran varietat d'agressors. Un altre d'aquests biomarcadors són les Heat shock proteins (HSPs), induïdes sobretot després de l'exposició de l'organisme a xocs tèrmics i determinats metalls pesants (Sanders et al., 1993), i les Metallothioneïnes (MT), que són proteïnes de baix pes molecular que tenen la capacitat de

retenir ions metàl·lics en la seva estructura, exercint un efecte protector de les cèl·lules davant d'agressions bàsicament per metalls (Deagen i Whanger, 1980; Lecoeur et al., 2004). La sobreexpressió d'aquestes pot servir per quantificar el dany provocat per determinats agents tòxics.

Tot i això, abans d'utilitzar un biomarcador molecular com a eina per a l'avaluació de la contaminació ambiental, és necessari demostrar la seva eficàcia com a eina ecològica rellevant. A més a més, també cal avaluar la seva relació amb les respostes citotòxiques, genotòxiques i en general de l'estrès de l'organisme. Així, és necessari que aquests compleixin una sèrie de requeriments. Per començar, (1) els biomarcadors han de tenir una significància biològica. L'estrès induït o els efectes negatius causats per una agressor determinat sobre un organisme han d'estar directament relacionats amb la concentració i el temps d'exposició d'aquest agressor a l'organisme en qüestió. A més a més, les diferències entre aquests biomarcadors, també han de detectar-se entre organismes de poblacions de zones contaminades i no contaminades. D'aquesta manera, en condicions controlades de laboratori, poden realitzar-se estudis de dosi-resposta o temps-resposta utilitzant diferents agressors. (2) A més a més, aquestes biomarcadors han de ser més sensibles que els paràmetres analitzats convencionalment com són la taxa de creixement, mort cel·lular o capacitat de reproducció. Però cal, que al mateix temps, els resultats obtinguts a nivell molecular puguin extrapolar-se a nivells cel·lulars o nivells més elevats. (3) D'altra banda, aquests biomarcadors han de ser sensibles a un ampli rang d'agents agressors, barats i fàcils de mesurar o detectar en un ampli rang d'organismes. També han hagut d'estar prou estudiats per conèixer els nivells basals i les seves variacions segons els factors ambientals naturals. Així mateix, (4) el biomarcador ha de ser sensible i fiable; (5) la biologia i la fisiologia de l'organisme prova utilitzat ha de ser ben coneguda, de manera que es pugui minimitzar la variabilitat dels resultats degut a factors com el creixement, reproducció, etc; (6) Els factors intrínsecs i extrínsecs que poden provocar canvis sobre el biomarcador estudiat també han de ser coneguts per evitar una excessiva variabilitat dels resultats; També és de gran importància que el biomarcador utilitzat, (7) respongui de manera proporcional a la concentració de substància contaminant a la qual ha estat exposat. A més, (8) aquest biomarcador ha de poder detectar concentracions petites, que són les que normalment es troben al medi ambient.

A continuació es fa una descripció general detallada dels biomarcadors moleculars utilitzats en aquest estudi; les Heat Shock Proteins o proteïnes d'estrès (SP) i les metal·lotioneïnes (MT).

5.1 Heat Shock Proteins (HSPs) o Proteïnes d'estrès (SP)

Les *Heat shock proteins* (HSP), altrament anomenades proteïnes d'estrès, són una família de proteïnes que estan expressades constitutivament en les cèl·lules, el nivell d'expressió de les

quals pot augmentar significativament quan aquestes estan exposades a condicions estressants, incloent el xoc tèrmic, canvis ambientals, infeccions o substàncies contaminants. És gràcies a la seva sobreexpressió davant diferents condicions ambientals, que han pogut ser utilitzades com a biomarcadors de contaminació ambiental. En aquest apartat, es descriuen àmpliament cada una de les seves funcions i característiques, així com la seva classificació i aplicacions.

5.1.1 Descobriment de les proteïnes d'estrès

El descobriment de les HSPs s'atribueix a l'aparició de *puffs* cromosòmics a les glàndules salivals de les mosques de la fruita *Drosophila busckii* després d'un xoc tèrmic (Ritossa, 1962). Nogensmenys, en aquest estudi es va veure que hi havia la sobreexpressió d'una proteïna produïda degut a un xoc tèrmic. D'altra banda, tal i com descriuen Mitchell i Peterson (1982) en el seu *review*, l'efecte de l'estrès sobre l'expressió de diversos gens específics ja havia estat esmentada des de mitjans dels anys 30. Més tard, diversos autors varen trobar diverses respostes similars al xoc tèrmic en diferents teixits de gran varietat d'organismes vius, com en *E. Coli* (Lemeux et al., 1978), en llevats (McAlister i Finkelstein, 1980) o en plantes (Barnett et al., 1980). Anys més tard, es va veure que aquestes proteïnes també eren induïdes per altres factors com infeccions, exposició a metalls pesants, substàncies inhibidores del metabolisme o l'edat. Així, després d'utilitzar durant molt de temps el terme "Heat Shock Protein" per designar aquelles proteïnes, l'expressió de les quals es induïda per l'aplicació de calor, es va passar a utilitzar el terme més correcte de proteïnes d'estrès (SP), ja que aquestes no tan sols són induïdes per la temperatura sinó també per moltes altres condicions d'agressió cel·lular.

5.1.2 Estructura i classificació de les proteïnes d'estrès

Durant 30 anys s'ha portat a terme la identificació i caracterització de diferents proteïnes d'estrès, així com l'aïllament dels gens corresponents, de diversos organismes vius. Aquests estudis han posat de manifest que aquestes proteïnes representen un dels grups de proteïnes més ben conservats des de procariotes a eucariotes. Per exemple, s'ha trobat que els membres de les proteïnes d'estrès bacterianes tenen un 50% de la seqüència idèntica a les corresponents proteïnes d'estrès en humans. En aquestes proteïnes, les interaccions electrostàtiques, els ponts d'hidrogen i les forces de Van der Waals juguen un paper molt important en l'estabilització de l'estructura nativa d'aquestes proteïnes, però la força dominant que condueix al plegament són les forces hidrofòbiques. Així mateix, una vegada plegades, aquestes proteïnes poden associar-se amb d'altres.

Podem distingir dos grans grups de SP; les SP constitutives que es troben a totes les cèl·lules en condicions normals i les SP induïbles que només es troben en cèl·lules estressades després d'estar exposades a alguna agressió. Així mateix, totes elles es poden classificar en funció del seu pes molecular, expressat en kilodaltons (kDa), el qual dóna nom a les diferents famílies de

proteïnes (Parsell i Llinquist, 1993). A la Taula 1, es resumeixen les característiques de les famílies de HSPs més importants classificades segons llur pes molecular.

Taula 1 Característiques de les principals famílies de HSP classificades segons llur pes molecular (KDa) (Welch et al., 1991; Feige et al., 1996; Parsell i Llinquist, 1993; Feder i Hoffman, 1999).

Família	Nom	Localització	Funció
Ubiquitina		Citoplasma / nucli	Intervé en la via de degradació proteica no lisosomal.
HSP 10		Mitocondri/ cloroplast	Cofactor de la HSP60
HSP Petites	HSP 26 HSP 27 HSP 28	Citoplasma / nucli	Regulador de la formació de microfilaments d'actina / molècula shaperona. Paper en el pas de l'estat de proliferació a l'estat de diferenciació cel·lular. Forma induïble de l'hemoxygenasa.
HSP 40	HSP 32	Citoplasma Citoplasma / nucli	Cofactor de la HSP72 i de la Hsc73
HSP 47		Reticle endoplasmàtic	<i>Shaperona</i> del col·lagen.
HSP 60	HSP 56	Citoplasma	Forma part del complex receptor d'hormones esteroides.
	HSP 60	Mitocondri/cloroplast	Molècula <i>shaperona</i> .
HSP70	HSP 68 HSP 70 HSP 72	Citoplasma / nucli	Molècula <i>shaperona</i> , fortament induïble per una agressió.
	HSC 73 GRP 75 GRP78	Citoplasma / nucli Mitocondri/cloroplast Reticle endoplasmàtic	Molècula <i>shaperona</i> constitutiva. Molècula <i>shaperona</i> constitutiva Molècula <i>shaperona</i> constitutiva
HSP 90	HSP 90 HSP 94	Citoplasma / nucli Reticle endoplasmàtic	<i>Shaperona</i> i proteïna reguladora de l'activitat de proteïnes quinases, de receptors d'hormones esteroides i de proteïnes, controlant el cicle cel·lular i l'apoptosi.
HSP 100	HSP 104 HSP 110	Citoplasma / nucli	Indispensable per sobreviure en condicions extremes d'estrès. Molècula <i>shaperona</i> .

Les proteïnes d'estrès analitzades en aquest estudi, la família de les HSP70, més concretament les HSP72i, són *chaperones* ubiques i molt conservades al llarg de tota la cadena evolutiva. A més, es coneix que la síntesi d'aquestes proteïnes augmenta considerablement després d'un xoc tèrmic o altres agressions ambientals, tot i que també desenvolupen un paper molt important a nivell constitutiu (com maduració, transport i plegament de proteïnes). En aquesta família de les HSP70 s'inclouen la HSP72i induïbles o HSP73 constitutives, les HSP78 del reticle endoplasmàtic, les HSP75 del mitocondri, entre d'altres.

5.1 3 Funcions de les proteïnes d'estrès

Una de les funcions principals de les proteïnes d'estrès és la d'iniciació de la resposta de defensa cel·lular, que consisteix com hem prèviament dit, en la síntesi de les anomenades HSP induïbles (Welch, 1993). L'acumulació de proteïnes desnaturalitzades o amb un plegament erroni dins la cèl·lula degut a una agressió ambiental indueix la resposta cel·lular anteriorment esmentada. D'aquesta manera, es desencadena una sobreexpressió de HSP, les quals faciliten la identificació de les proteïnes desnaturalitzades i ajuden en el procés de síntesi i ensemblatge de les proteïnes que s'estan sintetitzant. Aquest mecanisme de defensa queda resumit a la Figura 1.

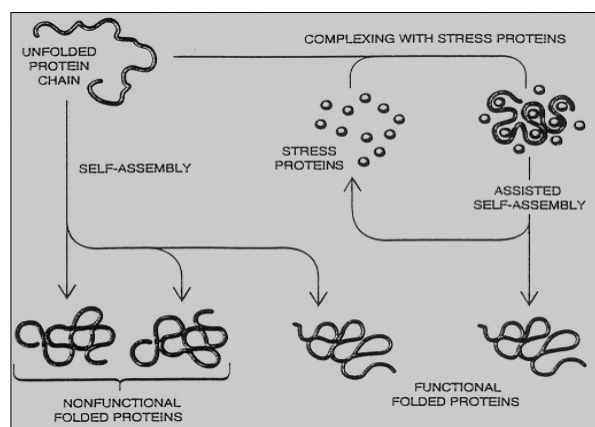


Figura 1 Funcionament del mecanisme de defensa cel·lular (Welch, 1993).

Aquesta sobreexpressió es porta a terme davant diferents tipus d'agressions ambientals. Es consideren bàsicament tres tipus de situacions en les quals té lloc un augment de la síntesi de proteïnes d'estrès. La inducció pot venir provocada per un estrès ambiental; calor, metalls pesants de transició, radiacions, inhibidors del metabolisme energètic i substàncies químiques, per un estrès fisiològic; infeccions bacterianes i víriques, estrès oxidant, inflamacions i edat entre altres i finalment degut a condicions no estressants; deficiència de sèrum, factors de creixement, expressió d'oncògens i protooncògens (Welch, 1993).

D'altra banda, les proteïnes d'estrès constitutives, que existeixen de forma permanent en la cèl·lula, ajuden al plegament ràpid i correcte de proteïnes augmentant la fidelitat del procés de plegament. Malgrat que l'adquisició d'estructura terciària s'aconsegueix espontàniament i que les proteïnes poden plegar-se espontàniament en configuracions biològiques funcionals, es poden produir errors. L'acció de les proteïnes d'estrès constitutives en la funció de *shaperones* moleculars consisteix en un ajut addicional al plegament. Diferents proteïnes d'estrès fan el plegament conjuntament, funcionant en tàndem i poden treballar totes soles o es poden associar amb altres proteïnes formant complexos multimèrics. En el cas de la HSP70

citoplasmàtica aquesta s'uneix a les proteïnes que venen del ribosoma per evitar el plegament prematur.

5.1.4 Proteïnes d'estrès com a biomarcador de contaminació ambiental

Atès que una de les conseqüències de l'exposició de les cèl·lules a agressors ambientals és un augment de l'expressió de les proteïnes d'estrès, aquestes poden ser utilitzades com a biomarcadors moleculars de l'efecte produït sobre aquestes cèl·lules per l'esmentat agressor. Així, quan es detecten augments importants en els nivells d'expressió d'aquestes proteïnes es pot afirmar que l'organisme o cèl·lula està exposat a condicions adverses (p.e. substàncies contaminants). Així, tal i com demostren estudis anteriorment realitzats, les HSP poden considerar-se bons biomarcadors moleculars de contaminació ambiental (Delmas et al., 1995; Abukhalaf et al., 1994).

La importància i la idonitat de les HSPs com a biomarcadors de contaminació ambiental és deguda a que: (1) el nivell d'expressió de les HSP és, en la majoria dels casos, proporcional a la concentració d'agressor a la qual la cèl·lula ha estat exposada; (2) són més sensibles i precoces que altres marcadors tradicionals (creixement o mortalitat de la fauna i flora del medi ambient) i (3) són sensibles a nombroses substàncies contaminants; (4) a més a més, el seu efecte ha estat estudiat en cultius cel·lulars *in vitro* (Delmas et al., 1995, 1996, 2000; Croute et al., 2000; Gaubin et al., 2000), en organismes enters com *Lumbricus terrestris* (Nadeau et al., 2001), *Drosophila* (Bournias-Vardiabasis et al., 1990), en hepatocits de teleostis (Brito-Ingles i Ferri, 1982), entre molts d'altres. Tot i això, també cal dir que si per exemple es tracta d'una agressió que provoca l'aturada o inhibició del mecanisme d'inducció de HSP, aquestes no són induïdes (Pomerai, 1996).

5.2 Metal·lotioneïnes (MTs)

Les Metal·lotioneïnes (MT) són proteïnes ubiques de baix pes molecular i amb un contingut en sulfurs molt elevat degut a l'elevat nombre de cisteïnes, (aminoàcids rics en grups tiol (SH)) que formen la seva estructura. Es creu que juguen un paper important en la fixació d'elements traça essencials com el zinc i el coure, en el control de les concentracions d'ions lliures d'aquests elements, en la regulació del seu flux fins arribar a les diverses destinacions cel·lulars, en la neutralització dels efectes perjudicials de l'exposició d'elements tòxics com el cadmi (Kägi i Schaffer, 1988). Així mateix, la presència de determinats ions metàl·lics pot donar lloc a la sobreexpressió d'aquestes proteïnes per tal de protegir la cèl·lula d'aquests ions metàl·lics. Les MT han estat detectades en una gran varietat d'éssers vius tant del regne animal com vegetal, incloent invertebrats, plantes, fongs i llevats. En aquest apartat, es descriuen àmpliament cada una de les seves funcions i característiques, així com la seva classificació i aplicacions.

5.2.1 Descobriments de les Metal·lotioneïnes

Les metal·lotioneïnes varen ser descobertes el 1957 quan Margoshes i Vallee (1957) varen identificar en el còrtex de cavall equí, una proteïna segrestadora de cadmi responsable de l'acumulació d'aquest metall en aquest teixit. Des de que van ser identificades com a proteïnes segrestadores de Cd, les Metal·lotioneïnes (MTs) han estat de gran interès en diferents camps científics, incloent la Toxicologia, la Química i Física biològica, la Biologia molecular i en la recerca contra el càncer. Actualment, encara són l'únic component biològic que conté naturalment aquest metall.

5.2.2 Estructura i classificació de les Metal·lotioneïnes

Les Metal·lotioneïnes constitueixen una família de proteïnes que es caracteritzen per llur alt contingut en metalls i sulfurs, els quals poden suposar al voltant del 15-20% de llur pes molecular. En mamífers, el pes molecular d'aquestes proteïnes és al voltant de 6000-7000 Da i contenen uns 60 aminoàcids, 20 dels quals són cisteïnes (aminoàcids que contenen S-H). Aquestes Cys es troben en forma reduïda i estan coordinades amb els ions metàl·lics mitjançant enllaços mercaptopeptídics. Cal destacar que aquestes proteïnes poden estar coordinades a 7 equivalents d'ions divalents (Figura 2).

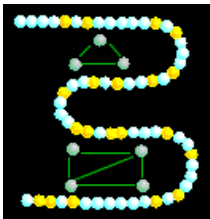
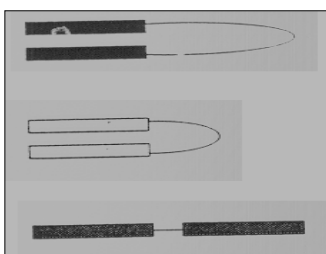


Figura 2 Representació lineal de la seqüència aminoacídica d'una MT de mamífer. S'observa el plegament en dos *cluster* metàl·lics formats per dos dominis rics en cisteïnes (3 o 4 àtoms de metall coordinats en els dominis α i β , respectivament). En groc es representen les cisteïnes i en verd els àtoms metàl·lics coordinats (www.unizh.ch/~mtpage/intro.html).

Les MT es troben en tot el regne animal i vegetal. Es localitzen més freqüentment en el citosol cel·lular tot i que també s'han trobat en el nucli. Tot i la gran conservació d'aquestes proteïnes, és possible distingir diferents estructures i diferents isoformes segons el model biològic estudiat. Això es pot veure a la Figura 3, on es mostren les diferències estructurals que presenten les MTs de diferents organismes.



MT de planta

MT de fong

MT de peix

Figura 3 Estructura de les Metal·lotioneïnes en diferents models biològics. Diagrama esquemàtic de l'estructura dels dominis de les MTs d'invertebrat inferior, planta i fongs (Morris et al., 1999; Klaassen et al., 1999).

En el cas dels humans, s'han descrit quatre isoformes amb diferent patró d'expressió; les MT-1 i MT-2 que s'expressen en tots els òrgans i són induïbles; la MT-3 que només s'expressa en el cervell i no és induïble i la MT-4 de la qual no se'n coneix el seu patró.

D'altra banda, les Metal·lothioneïnes poden dividir-se en diferents grups seguint diferents criteris de classificació. A diferència de les proteïnes d'estrès, aquestes proteïnes no solen classificar-se segons el seu pes molecular ja que es tracta de pesos moleculars molt inferiors a les anteriors. Diferents autors han classificat aquestes proteïnes seguint diferents criteris. Una de les classificacions té en compte les relacions estructurals, dividint aquestes proteïnes en 3 grans classes. Així, la classe I, inclouria les MT humanes, de mamífers i peixos, entre d'altres, ja que es tracta de MT molt conservades. La classe II, inclouria aquelles MT que tenen una correspondència molt distant o nul·la a les MTs corresponents als mamífers (www.unizh.ch/~mtpage/intro.htm). Finalment, la Classe III, inclouria les MTs amb polipèptids atípics (Kägi i Schafer, 1988). Nogensmenys, en aquest treball, les MTs han estat classificades segons el model biològic estudiat tal i com es pot veure a la Taula 2.

Taula 2 Característiques de les principals famílies MTs classificades segons llur seqüència aminoacídica. Classificació basada en llur similitud de seqüència i relacions filogenètiques. Aquest sistema subdivideix la superfamília de les metal·lotioneïnes en famílies, subfamílies, subgrups i isoformes. (Kägi i Schaffer, 1988).

La SUPERFAMÍLIA DE METAL·LOTHIONEÏNES es defineix com a conjunt de proteïnes de baix pes molecular, contingut metàl·lic elevat, composició aminoacídica característica amb un alt contingut en Cys i baix contingut en components aromàtics i una seqüència aminoacídica única Cys-X-Cys.

Família 1: MTs de Vertebrats	60 a 68 aa : 20 Cys (21 en un cas), 19 aa totalment conservats, dividida en dos dominis (de 9 i 11 Cys a cada un, lligant 3 i 4 ions divalents respectivament). (PM : 6000 - 7000)
	SUBFAMÍLIES: MT-I de mamífers MT-II de mamífers MT-III de mamífers MT-IV de mamífers MTs-no definides de mamífers MT-no definides d'aus MT-I d'aus MT-II d'aus Teleost MT de teleostis
Família 2 : MTs de mol·luscs	64 a 75 aa : 18-23 Cys, 13 aa completament conservats. Proteïna dividida en dos dominis estructurals.
	SUBFAMÍLIES: MT-I de musclo MT-II de musclo MT de gasteròpods MT d'altres mol·luscs
Família 3 : MTs de crustacis	58 a 60 aas : 18 Cys completament conservades, dividides en dos dominis de 9 aa cada un els quals lliguen 3 ions metàl·lics divalents cada un.
	SUBFAMÍLIES: MT-I de crustacis MT-II de crustacis MT no definides de crustacis

Família 4 : MTs d'Equinoderms	60 a 67 aas, 20 Cys totalment conservades, dividides en dos dominis que contenen en 9 i 11 Cys cada un que poden lligar 3 i 4 ions metàl·lics divalents respectivament.
	SUBFAMÍLIES: MT-I d'equinoderms MT-II d'equinoderms
Família 5 : MTs de dípters	40-43 aas, 10 Cys conservades.
	SUBFAMÍLIA: MT-I de dípters MT-II de dípters
Família 6 : MTs de Ciliats	105 aas, 31 Cys
Família 7 : MTs de Fongs	Difícil classificació de famílies i subfamílies
	MT-I de fong MT-II de fong MT-III de fong MT-IV de fong MT-V de fong MT-VI de fong
Família 8 : MTs de procariotes	53 i 56 Aas, 9 Cys conservades
Família 9 : MTs de Plantes	45-84 AAs, generalment dues regions riques en Cys (domini 1 i 3) separats per una regió pobre en Cys (domini 2).
	SUBFAMÍLIES: MT tipus-1 de plantes MT tipus-2 de plantes MT variants de plantes MT tipus-3 de plantes MT tipus-2x1 de plantes

5.2.3 Funcions de les Metal-lothioneïnes

La conservació en la cadena evolutiva d'aquestes proteïnes (Figura 3) suggereix una funció molt important en els organismes vius. L'ur funció fisiològica encara no està clara però estan involucrades en el metabolisme del zinc i del coure, i estan relacionades en la detoxificació de metalls contaminants com el Cd i Hg actuant com a *scavengers* de radicals lliures. En general, sembla que la seva síntesi és especialment induïda pel Cd i el Zn però també per altres elements com són les hormones, alcohols, citoquines, antibiòtics i altres tractaments químics i físics (Robinson et al., 1993). Tot i els esforços per conèixer les funcions exactes de les MTs, encara no es coneix exactament el paper que desenvolupen (Waalkes et al., 1996). Nogensmenys es poden detectar 3 funcions fonamentals, les quals es descriuen a continuació. En primer lloc, la funció biològica normal de les MTs pot estar relacionada en el metabolisme i homeòstasi del Zn i/o Cu. Es creu, que les MTs són una reserva de Zn pels teixits durant períodes de creixement ràpid on apareix un dèficit d'aquest metall. D'aquesta manera,

s'aconsegueix una concentració de Zn adequada pel teixit, ja que es tracta d'un element essencial en diversos aspectes de la divisió cel·lular, incloent la síntesi de DNA, RNA i proteïnes. Així mateix, les MTs tindrien una funció important en el procés de diferenciació i proliferació d'algunes línies cel·lulars. S'ha vist, que l'augment de Zn intracel·lular regulat per les MTs és essencial en el procés de transició de la fase Go/G1 a la fase S del cicle cel·lular en cèl·lules 3T3L1 (Schmidt et al., 1999).

En segon lloc, un altre possible paper de les MTs és la detoxificació d'intermediaris químics. Les MTs constitueixen un sistema de defensa cel·lular en resposta a metabolits reactius. Això podria explicar el gran contingut en grups sulfhidril, els quals donarien un elevat grau de neutralització, actuant com un *scavenger* efectiu de radicals hidroxil *in vitro*. A més, el paper de les MTs com a antioxidant s'ha posat en evidència en veure que hi ha una disminució del trencament de cadenes de DNA causat per l'estrès oxidatiu en presència d'elevats nivells de MTs en cèl·lules de hamster. Igualment, s'ha confirmat que les MTs també poden ser importants com agents endògens antimutagènics (Chubatsu i Meneghini, 1993) i en la carcinogènesis (Cherian et al., 1994)

A més a més, aquestes proteïnes també semblen jugar un paper crític en la detoxificació del cadmi i altres metalls pesants. L'acumulació de MTs en resposta a les altes concentracions d'ions metàl·lics corrobora el seu paper de segrestador de metalls en excés. La tolerància cel·lular al cadmi és deguda a la gran afinitat de segrest de metalls per les MTs. A més, es coneix que el tractament amb metalls estimula la síntesi de MTs i dona protecció per la següent exposició al metall; són capaces doncs, de reduir la toxicitat provocada per determinats metalls (mecanisme de defensa).

5.2.4 Metal·lothioneïnes com a biomarcadors de contaminació ambiental

Les MTs podrien utilitzar-se com a biomarcadors moleculars de contaminació degut a que aquesta és induïda en molts organismes després de l'exposició a diferents substàncies contaminants. S'han realitzat estudis en diversos organismes indicadors, els quals defineixen les MTs com a bons bioindicadors de la presència de determinades substàncies com poden ser determinats metalls de transició. Un exemple clar és el de *Fucus spp* que és una macroalga resistent a la contaminació de metalls pesants, la qual acumula intracel·lularment nivells molt alts de coure i zinc. Històricament, s'havia utilitzat com a organisme indicador en ecosistemes marins degut a la seva resistència als metalls pesants. La relació proporcional de les MTs expressades i la concentració de metalls en els teixits suggereix que les MTs, en aquest organisme, podrien ser un biomarcador ambiental apropiat (Morris et al., 1999). També s'han realitzat estudis de les MTs induïdes en crustacis, com per exemple *Carcinus maenas*, després de l'exposició a altes i baixes concentracions de cadmi (Pedersen et al., 1994). Les MTs

expressades en *Cyprinus carpio* i *Tilapia mossambica* també han estat utilitzades per a la monitorització de la contaminació d'aigües de zones determinades (Kowk Lim Lam et al., 1998).

OBJECTIUS GENERALS DE LA TESI

OBJECTIUS GENERALS DE LA TESI

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat l'avaluació de la toxicitat de diversos metalls pesants com el Cd(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), Pb(II), Hg(II), Cr(VI) i Ag(I) i arsènic As(V) i As(III) en diferents models biològics.

Concretament, s'avaluarà l'efecte d'aquests metalls sobre 1) el bacteri *Vibrio fischeri*, mesurant la inhibició lumínica utilitzant l'assaig Microtox i 2) en cultius d'aquest mateix bacteri mesurant la inhibició del creixement i de la viabilitat, 3) sobre cultius cel·lulars establerts *in vitro* de les cèl·lules humanes HT29 i 4) sobre cultius primaris de cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba* (vertebrat inferior). Això, es portarà a terme utilitzant l'anàlisi de diferents paràmetres a nivell cel·lular (creixement o viabilitat) i a nivell molecular (emissió lumínica o sobreexpressió de proteïnes d'estrès).

Per assolir aquest objectiu la memòria es divideix en tres capítols, en cada un dels quals s'utilitzen els diferents models biològics esmentats anteriorment.

Així, en el primer capítol d'aquesta memòria, l'objectiu ha estat l'estudi de la toxicitat de diferents metalls pesants i arsènic sobre *Vibrio fischeri* utilitzant l'assaig Microtox. Per fer això, en primer lloc, es determinaran les corbes dosi-resposta de cada un d'aquests metalls i metal·loides objecte del nostre estudi. En segon lloc, es realitzaran els assaigs necessaris per a la determinació acurada dels paràmetres de toxicitat com els valors EC20, EC50 i unitats de toxicitat (TU) després de 5 i 15 minuts d'exposició en medis de diferent pH. Concretament, s'estudiarà la toxicitat dels metalls pesants Cd(II), Co(II), Pb(II), Cu(II), Zn(II), Hg(II) i Ag(I) en solucions ajustades a pH 6.0 i pH 7.0 i d'As(V) i As(III) a pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 i 9.0. També s'analitzaran les interaccions que es produeixen en solucions binàries dels metalls estudiats prèviament separatament i també entre les diferents espècies d'arsenat presents conjuntament en solució. Finalment, la sensibilitat de l'assaig Microtox per a la detecció eficient d'aquests metalls i l'arsènic en aigües també es posarà de manifest mitjançant la comparació dels valors EC20 obtinguts i les emissions màximes establertes per la normativa vigent.

Seguidament, l'objectiu del segon capítol d'aquesta memòria ha estat l'avaluació de la toxicitat crònica de Cd(II), Cr(VI) i As(V) utilitzant els assaigs d'inhibició de la viabilitat i del creixement utilitzant cultius del bacteri *Vibrio fischeri*. Per això, es determinaran les corbes dosi-resposta i els valors EC50 corresponents als assaigs de viabilitat i creixement, i els resultats obtinguts seran comparats amb els resultats de l'assaig Microtox. També s'avaluaran els canvis morfològics produïts sobre *Vibrio fischeri* degut a aquests metalls després de diferents temps d'exposició mitjançant microscopia electrònica de rastreig.

D'altra banda, per tal de trobar una explicació a la baixa toxicitat del Cr(VI), també s'avaluarà la capacitat de reducció de Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III) del bacteri *Vibrio fischeri* en

diferents medis de cultiu. S'avaluarà la reducció de Cr(VI) que es produeix en solucions 0.34M de NaCl, en diferents medis de cultiu mínims suplementats amb diferents fonts de carboni i en medi ric després de diferents temps d'exposició. També es localitzarà l'activitat reductora, la naturalesa dels agents reductors i l'efecte dels ions Cu^{2+} en aquesta capacitat de reducció.

Per acabar, en el tercer capítol d'aquesta memòria s'utilitzaran dos models biològics per avaluar i detectar la toxicitat dels metalls pesants i altres substàncies potencialment tòxiques. Es tracta de desenvolupar noves aplicacions i nous bioassaigs de toxicitat.

Així, en la primera part d'aquest capítol, s'avaluarà la idoneïtat de la línia cel·lular HT29 com a model biològic per a la determinació de l'efecte nociu de metalls pesants i d'extractes solubles de fangs de depuradora, conjunta i separatament. D'aquesta manera, serà possible avaluar la toxicitat potencial dels fangs de depuradora en cas de trobar-se en presència de diversos metalls pesants. Es tracta d'identificar i descriure l'efecte biològic, a nivell cel·lular i molecular, d'aquestes substàncies contaminants capaces d'afectar als ecosistemes. A nivell cel·lular, es determinaran les corbes dosi-resposta, les concentracions llindar i els valors EC50. Paral·lelament, les anàlisis de sobreexpressió de proteïnes d'estrès (HSP i MTs) en aquesta línia cel·lular després dels mateixos tractaments ens donarà informació sobre l'efecte a nivell molecular.

D'altra banda, en la segona part d'aquest capítol, s'avaluarà la utilitat de la sang de peix, concretament de *Sparus sarba*, per a ser utilitzada com a model biològic per a l'avaluació dels efectes tòxics de metalls pesants en peixos. Per començar, s'optimitzarà el mètode de treball per avaluar adequadament la sobreexpressió de HSP70 en aquest tipus de mostres. Seguidament, s'avaluarà l'efecte tòxic de diferents metalls pesants, el cadmi, el plom i el crom a nivell molecular mitjançant l'anàlisi de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès. Es determinarà d'una banda, l'efecte del temps de recuperació en la sobreexpressió de proteïnes d'estrès en aquest model biològic i també s'avaluarà la sobreexpressió de proteïnes d'estrès després de l'exposició d'aquest model biològic a diferents concentracions de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI) durant 1 o 2 hores.

Capítol I: L'assaig Microtox[®]: Avaluació de la toxicitat de metall pesants, arsènic i les interaccions d'aquests en mescles binàries.

I.1 INTRODUCCIÓ

Els bioassaigs de toxicitat avaluen de manera global l'efecte tòxic dels agents agressors analitzats sobre un determinat organisme viu. En els últims anys, tal i com s'ha explicat en la introducció general d'aquesta Tesi, s'han desenvolupat diversos assaigs de toxicitat utilitzant diferents organismes vius amb els quals s'obtenen diferents nivells de sensibilitat depenent de l'organisme i de l'agent agressor que es tracti. Un dels bioassaigs de toxicitat més utilitzats és l'assaig de toxicitat Microtox.

I.1.1 L'Assaig Microtox®

L'assaig de toxicitat Microtox®, que utilitza el bacteri luminescent *Vibrio fischeri* com a organisme prova, va ser desenvolupat per Beckman Instruments l'any 1979 com una tècnica ràpida i fiable per avaluar la toxicitat global de mostres ambientals. Tot i que els organismes luminescents s'han utilitzat des de fa més de 50 anys com a organismes prova per a l'avaluació de la toxicitat d'aigües i sediments (Serat et al., 1965), no va ser fins a finals dels anys 70 que es va desenvolupar l'assaig Microtox com una tècnica de rastreig per determinar ràpidament i de forma fiable la toxicitat de mostres aquoses (Bullich, 1979). L'analitzador Microtox, desenvolupat per Beckman Instruments, és comercialitzat actualment per Microbics Corporation (Carlsbad, Califòrnia). L'assaig Microtox és un bioassaig de toxicitat aguda ràpid i fiable, les característiques del qual es descriuen extensament en els següents apartats.

I.1.1.1 Bioquímica del bacteri

Els bacteris luminescents, específicament la soca bacteriana *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, utilitzats en l'assaig Microtox® són bacteris aerobis facultatius amb flagelació polar que es troben en ambients marins. Aquests bacteris emeten llum en l'interval de longitud d'ona de 420-630 nm, amb una emissió màxima a 490 nm, com a subproducte del seu metabolisme. Aquesta emissió de llum és conseqüència de l'acció de l'enzim luciferasa que catalitza l'oxidació del flavinmononucleòtid reduït a la seva forma oxidada amb la intervenció d'un aldehyd saturat de més de 8 àtoms de carboni com a acceptor d'electrons (Kemper i Hanson, 1968; Bourgois et al., 2001).



L'emissió de llum està directament lligada a la respiració cel·lular i qualsevol inhibició de l'activitat del bacteri provoca una disminució de la taxa de lluminositat. Així, quan s'utilitza aquest bacteri en l'assaig Microtox, com més tòxica és la mostra analitzada més gran és el percentatge de reducció de llum de la suspensió bacteriana.

Atès que existeix una influència important de diversos factors ambientals en la capacitat de produir llum del bacteri, aquests han d'estar controlats per tal d'aconseguir una màxima

repetitivitat, eficàcia i fiabilitat de l'assaig. L'efecte de la temperatura sobre el metabolisme del bacteri luminescent *Vibrio fischeri* és substancial. S'ha observat que la variació d'un grau centígrad provoca la variació aproximada d'un 10% en el intensitat de llum emesa pel bacteri. La concentració de NaCl de la mostra també pot afectar a la intensitat de llum emesa. *Vibrio fischeri* és un bacteri marí que pot viure en ambients amb concentracions de NaCl entre 5 i 30 g/L, obtenint una màxima emissió de llum a concentracions de 30 g/L. Tot i això, les concentracions de NaCl que s'utilitzen en l'assaig Microtox són de 20 g/L ja que són les concentracions on l'emissió de llum és més estable (www.azurenv.com).

En quant al pH, les condicions fisiològiques òptimes del bacteri *Vibrio fischeri* està comprès entre pH 4.5 i 9.0. Dintre d'aquest rang de pH, la intensitat de llum emesa pel bacteri no pateix variacions importants. Nogensmenys, el pH òptim és de 7.0-7.2 unitat de pH (Villaescusa et al., 1997).

La intensitat d'emissió lumínica també es veu afectada pel període de temps que dura l'assaig, o sigui, el temps d'exposició (5 i 15 minuts) i també per l'edat de la suspensió bacteriana (temps transcorregut després de l'activació de la suspensió bacteriana).

I.1.1.2 Reproductibilitat de l'assaig

El bacteri utilitzat en l'assaig Microtox és subministrat de forma liofilitzada per la casa comercial Azur Environmental. D'aquesta manera es garanteix una font estàndard d'organismes prova, la qual cosa assegura una gran repetitivitat dels assaigs, s'eviten diferències en el cultiu d'organismes i els resultats obtinguts són comparables entre diferents laboratoris. Aquesta repetitivitat depèn bàsicament de l'habilitat de l'analista de pipetejar acuradament volums petits i el coeficient de variació no sol ser superior al 20%. D'altra banda, cada una de les cubetes de l'assaig contenen aproximadament un milió de bacteris exposats a la mostra assajada. Així doncs, les variacions degudes a les diferències entre organismes individuals són estadísticament insignificants (Ribó i Díez, 1994). Així mateix cada un dels vials comercialitzats, que contenen bacteri liofilitzats, han estat preparats sota condicions molt estrictes i controlades.

I.1.1.3 Homologacions oficials

El 1984, el bioassaig Microtox[®] va ser adoptat per la Generalitat de Catalunya com a bioassaig oficial per conèixer la toxicitat de lixiviats de residus sòlids i posteriorment per la determinació de la toxicitat d'aigües residuals. Actualment, l'assaig Microtox[®] s'utilitza en les indústries com un assaig ràpid i fiable per la determinació de la toxicitat de les seves aigües residuals i per l'avaluació de la conveniència del tractament d'aquestes aigües. A més a més, a part de l'aplicació rutinària de l'assaig Microtox[®] per l'avaluació de toxicitat global de mostres ambientals, diferents autors han dedicat els seus esforços a la recerca experimental que permeti noves aplicacions del bioassaig i en la millora del mètode.

I.1.2 Paràmetres de toxicitat de l'assaig Microtox®

La relació entre la dosi d'una substància tòxica i la seva toxicitat en funció del temps és molt important i es representa amb l'anomenada corba dosi-resposta. A partir de la corba dosi-resposta podem avaluar el patró de toxicitat que provoca una substància determinada en funció de la concentració o del temps d'exposició. En el cas de l'assaig Microtox, la corba representa la inhibició de llum emesa pel bacteri en funció de la concentració d'una substància analitzada.

Així mateix, a partir de la corba dosi-resposta es pot determinar el rang de concentracions adequat per a la determinació acurada de l'anomenada concentració llindar (EC20), la qual es defineix com la concentració que provoca el primer efecte tòxic sobre l'organisme indicador. En el cas de l'assaig Microtox aquesta concentració es considera que és la que provoca un 20% de reducció de la llum inicial emesa.

De la mateixa manera, es pot calcular el paràmetre EC50 que és el paràmetre que determina la dosi d'una determinada substància necessària per produir una inhibició lumínica del bacteri *Vibrio fischeri* (no la mortalitat) del 50%. El mètode numèric per determinar aquests paràmetres es descriurà en apartats posteriors. A partir de la EC50 es poden calcular les anomenades unitats de toxicitat (TU), les qual representen de forma més entenedora la toxicitat de les mostres ($TU=100/EC50$).

I.1.3 Especiació química de metalls i metal·loides. Generalitats.

L'especiació és un dels factors importants a tenir en compte a l'hora d'avaluar la toxicitat o la toxicinètica de diversos elements metàl·lics o metal·loides. El terme especiació va ser introduït degut a la necessitat de diferenciar, tant qualitativa com quantitativament la presència d'una mostra en diferents formes o espècies químiques d'un mateix element i un mateix estat d'oxidació (Turpeinen et al., 1999). Com a conseqüència d'aquest fenomen d'especiació química; la forma física, el transport, la distribució, l'acumulació i l'efecte tòxic final d'un metall o metal·loide pot ésser diferent depenent de l'espècie en què aquest es troba.

És ben conegut que alguns metalls presenten variacions en la proporció relativa de les seves espècies en funció de diversos paràmetres ambientals. Diversos paràmetres com per exemple la temperatura, el pH, el contingut de matèria orgànica, la concentració de sals i les condicions reductores entre altres poden fer variar l'estat d'oxidació de l'element i l'especiació química o estat de protonació d'aquest (Matchullat, 2000). Atès que aquestes espècies químiques reaccionen de diferent manera i es troben més o menys accessibles als organismes vius degut a les seves característiques, poden provocar variacions importants en la toxicitat produïda sobre un determinat organisme viu.

La composició del medi és de gran importància a l'hora de determinar el tipus d'espècies químiques que es formaran a partir d'un determinat element. Així, la disminució de la toxicitat degut a la presència de compostos com àcids orgànics, húmics, fúlvics i àcid etilendiamina

tetracetic (EDTA), es produeix degut a la capacitat que aquests tenen de complexació dels metalls. D'altra banda, en alguns casos, la presència d'ions clorurs, nitrats, entre d'altres, donen lloc a la formació de complexos. Així mateix, la concentració d'aquests ions en el medi també pot influir en la proporció relativa de cada una de les espècies (Corpe, 1975). Un altre factor important que influeix en la especiació química dels metalls i en la seva toxicitat és la duresa de l'aigua, l'augment de la qual pot provocar una disminució de la toxicitat dels metalls que conté degut a la formació de complexos amb ions Ca^{2+} , Mg^{2+} del medi.

I.1.3.1 Diagrames d'especiació química

L'aproximació de la distribució d'espècies d'ions metàl·lics o metal·loides en determinats medis de cultiu utilitzant programes informàtics de modelació implica la utilització de constants d'estabilitat anteriorment publicades, juntament amb concentracions conegudes de diversos ions i altres metalls en el medi. Aquestes dades són utilitzades per calcular les concentracions d'equilibri o activitats de les diverses espècies presents en el medi. Tot i la gran quantitat de factors, que aquests programes tenen en compte a l'hora de calcular les concentracions d'equilibri, diversos autors han qüestionat la racionalitat i fiabilitat dels programes de modelació d'especiació (Florence, 1982). El principal obstacle de la modelació d'especiació és la manca de dades d'equilibri termodinàmic. Moltes d'aquestes dades, específiques per interaccions entre ions metàl·lics i partícules del medi, no són disponibles en la bibliografia, la qual cosa dificulta les prediccions d'especiació proporcionades per aquests programes. Tot i aquests desavantatges, la modelació d'especiació és una tècnica poderosa que contribueix de manera important en la comprensió de l'especiació, una vegada conegudes les dades termodinàmiques necessàries.

En aquest treball s'ha utilitzat el programa HYDRA (Hydrochemical Equilibrium Constant database), el qual proporciona les constants d'equilibri de les espècies estudiades al programa MEDUSA (Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Logarithms), a partir del qual es poden representar les dades obtingudes en diagrames de distribució d'espècies químiques. D'aquesta manera, poden obtenir-se diferents tipus de representacions gràfiques, a partir de les quals es pot predir la quantitat relativa d'espècies metàl·liques en funció del pH de la solució on es troben, de la concentració de sals, etc.

En el present estudi, es coneixen les concentracions de tots els ions presents en la solució i les constants termodinàmiques de cada un d'ells, ja que es treballa en medis d'assaig inorgànics (0.34M NaCl), la composició dels quals és coneguda, facilitant i fent completament fiables, els diagrames de distribució d'espècies obtinguts amb aquest programa.

I.1.3.1.1 Especiació química de metalls pesants en 0.34M NaCl

Els diagrames d'especiació química dels metalls analitzats en aquest estudi, Cd(II), Co(II), Cu(II), Zn(II), Pb(II), Hg(II) i Cr(VI), en 0.34M NaCl en funció del pH del medi d'assaig en que es troben es presenten a l'Annex 1. Tal i com es pot veure en aquestes gràfiques, el cobalt i el crom no formen clorocomplexes amb el medi d'assaig (NaCl) al contrari dels altres ions que en formen de diferents tipus i en diferents proporcions (cadmi, coure, zinc, plom i mercuri). L'argent és l'únic metall analitzat que precipita completament a qualsevol pH en medi NaCl. És per això que aquest metall s'ha analitzat en medi NaNO₃ (Annex 1). En general, s'observa que la majoria de metalls formen precipitats a pH bàsics mentre a pHs més àcids es troben en forma de diferents espècies metàl·liques. Dels metalls estudiats, l'únic metall que no precipita a cap pH és el Cr(VI).

El Cr(VI) no forma clorocomplexes amb els ions clorurs presents en el medi però el seu estat de protonació varia depenent del pH de la solució on es troba. En general, el proporció relativa de HCrO₄⁻ i Cr₂O₇²⁻ disminueix mentre augmenta la proporció relativa de CrO₄²⁻ a mesura que augmenta el pH de la solució on es troben.

Cal destacar que a l'hora de dibuixar aquestes gràfiques cal indicar la concentració total de metall ja que a vegades apareixen diferències en la distribució d'espècies formades depenent d'aquesta concentració. També és important posar tots els ions presents en la dissolució (Na⁺, Cl⁻, NO₃⁻, Ca²⁺, SO₄²⁻ o altres) ja que poden aparèixer interaccions entre diferents ions del medi i el metall estudiat.

I.1.3.1.2 Especiació química de l'arsènic en 0.34M NaCl

L'arsènic pot trobar-se bàsicament al medi ambient en dos estats d'oxidació, l'As(III) i l'As(V). Així mateix, depenent del pH de la solució on es troben, poden formar-se diferents espècies químiques que es diferencien pel seu grau de protonació. En condicions oxidants i pHs <6.9 es troba l'espècie H₂AsO₄⁻ com a dominant, mentre que a pHs més elevats es troba l'espècie HAsO₄²⁻. Sota condicions reductores i pHs inferiors a 9.0 predominen l'espècie H₃AsO₃ (Cullen i Reimer, 1989).

En el cas de l'arsenat, la concentració total de metal·loide a l'hora de dibuixar les gràfiques, no és important ja que les seves espècies no varien en funció de la concentració total introduïda. A més a més, tant l'As(V) com l'As(III) no formen clorocomplexes i per tant la seva especiació química no variarà amb la presència de clorurs. D'altra banda, poden trobar-se diverses espècies químiques diferents, cada una d'elles en un estat de protonació diferent, les quals augmenten i disminueixen de forma inversament proporcional en funció del pH.

Les diferents espècies d'arsenit, tampoc no formen clorocomplexes amb els ions Cl⁻ presents en el medi d'assaig i per tant, la concentració de NaCl del medi no farà variar les espècies que es formen. Nogensmenys, la distribució d'espècies és molt diferent a l'obtinguda en el cas de

l'arsenat. En aquest cas, l'àcid arseniòs domina en solucions de pH inferior a 7.0 i a mesura que augmenta el pH de la solució apareixen altres espècies com són el di- i el mono-hidrogenarsenit (Annex 1).

I.1.3.2 Biodisponibilitat de les espècies metàl·liques

La toxicitat d'una determinada espècie metàl·lica dissolta en medi aquós davant d'un organisme aquàtic està probablement relacionada amb la seva habilitat per reaccionar amb les membranes biològiques. La capacitat dels ions metàl·lics per penetrar la membrana i reaccionar amb els components cel·lulars depèn directament de la solubilitat lipídica de l'espècie metàl·lica i de la taxa de reacció amb les proteïnes de transport de la membrana (Florence, 1982). Les interaccions metall-proteïna, que encapçalen l'inici del transport dels ions a l'interior de la cèl·lula, seran més o menys afavorides segons l'espècie química del metall. En el cas dels ions divalents, el transport serà termodinàmicament afavorit, si el metall està en forma simple. En el cas d'ions trivalents (com per exemple el Fe^{3+}), la forma més disponible seran els complexos orgànics (Florence, 1982). Altres vegades, és la cinètica de la reacció amb les proteïnes de la membrana i no la termodinàmica que dicta les espècies més biològicament actives. En general, la reacció dels ions metàl·lics amb les membranes biològiques és particularment un procés complex i no es pot explicar per models de difusió simple. La temperatura en la qual es realitza l'assaig també és de gran importància. Generalment, un augment de la temperatura dona lloc un augment del metabolisme i per tant, un augment de la captació de l'element tòxic. Així mateix, tal i com s'ha descrit anteriorment, la capacitat de complexació dels metalls amb altres ions presents en l'aigua també pot provocar canvis en la toxicitat generada per aquest metall. D'altra banda, processos com el de metilació també poden provocar canvis substancials en la toxicitat generada sobre un mateix organisme.

I.1.4 Interaccions additives, sinèrgiques i antagonístiques

En general, les mostres ambientals analitzades contenen diverses substàncies tòxiques. Quan diversos compostos es troben conjuntament en una mateixa solució, poden interaccionar o entrar en competència donant lloc a variacions de la toxicitat global produïda sobre l'organisme indicador del bioassaig. En general, podem dir que els efectes tòxics de diversos compostos d'una mescla sobre un organisme determinat poden ser de tipus additiu, sinèrgic o antagonic. El sinèrgisme és un terme utilitzat quan l'efecte de la combinació de dues o més substàncies és major que la simple addició dels efectes individualment. Contràriament a l'anterior, l'antagonisme es produeix quan l'efecte d'una substància es veu d'alguna manera neutralitzat per l'altre producte de la mescla, resultant un efecte combinat menor que la simple addició dels efectes individuals. Finalment, ens referim a l'addició simple, quan l'efecte de la combinació de substàncies és equivalent a l'addició dels efectes individuals de cada compost.

El tipus d'interacció que existeix entre diferents substàncies pot determinar-se utilitzant diferents mètodes qualitius i quantitius o formulacions matemàtiques. Els mètodes qualitius utilitzen la representació gràfica, a partir de la qual també es poden realitzar avaluacions quantitatives afegint els intervals de confiança de les dades representades. En aquest tipus de gràfics pot comparar-se la toxicitat global de la mostra en funció de la variació de la proporció de cada un dels components de la mescla binària. Així, a partir d'aquests gràfics, es poden caracteritzar les interaccions que es produeixen entre els diferents components de la mescla aplicant termes d'additivitat, sinergisme o antagonisme (Thomulka i Lange, 1996, 1997; Lange i Thomulka, 1997). D'altra banda, existeixen altres mètodes quantitius que utilitzen formules matemàtiques per calcular específicament índexs d'additivitat o altres paràmetres, els quals determinaran el tipus d'interacció entre els components de la mostra (Ribó i Rogers, 1990; Ince et al., 1999; Fernandez-Alba et al., 2001). En general, els estudis de toxicitat combinada suggereixen que es poden produir una gran varietat d'interaccions entre els productes d'una mostra i demostren la dificultat de predicció d'aquestes. Així, atès que els efectes nocius al medi ambient són normalment el resultat de la combinació de diferents components químics i diversos factors ambientals, s'han proposat diversos algorismes matemàtics per tal de predir la toxicitat de mescles. Bàsicament, es poden considerar dos tipus d'acció conjunta.

"L'acció simple" significa que cada component de la mescla es pot intercanviar per l'altre component sense modificar la resposta, la qual cosa implica que aquests dos components actuen amb mecanismes similars. Aquest model sol aplicar-se en casos on els components de la mescla són similars tal i com varen fer Ribó i Rogers (1990) en l'estudi de la toxicitat de fenols i clorofenols utilitzant l'assaig Microtox. Aquest mateix model va ser utilitzat per Fernández-Alba et al (2001) utilitzant diversos bioassais com el test d'inhibició de la mobilitat de *Daphnia magna*, BioTox™ o MitoScan™.

D'altra banda, en l'anomenada "acció independent", l'intercanvi dels components de la mescla provoca modificacions en la resposta tòxica obtinguda, la qual cosa indica que els components tenen diferents mecanismes d'acció. Dit en altres paraules, aquest model no dóna per suposat que el mode d'acció dels components de la mescla és similar, essent possible que tinguin un mode d'acció diferent (Ince et al., 1999).

1.1.5 Antecedents

Diferents bioassais de toxicitat han estat utilitzats per obtenir informació sobre la qualitat ambiental de determinades zones de l'ecosistema o per fer un seguiment i control dels abocaments industrials al medi ambient. Aquests bioassais poden utilitzar diferents tipus d'organismes prova i analitzar diferents paràmetres (com el creixement, reproducció, viabilitat, entre altres). Fochtman et al (2000) varen estudiar la toxicitat de pesticides mitjançant l'anàlisi

de la inhibició de la mobilitat del crustaci *Daphnia magna*, la mortalitat dels peixos *Cyprinus carpio* i *Oncorhynchus mykiss* i la utilització de diversos assaigs de toxicitat comercials. Altres estudis utilitzen l'assaig Microtox, la inhibició de la mobilitat dels crustacis *Daphnia magna* i *Ceriodaphnia dubia* per estudiar la toxicitat d'aigües residuals (Choi i Meier, 2001). Castillo et al 2000 també varen estudiar la toxicitat de Cd(II), Cu(II), Cr(VI) i Hg(II) en organismes de nivells tròfics diferents com el bacteri *Bacillus cereus*, el nemàtode *Panagrellus redivivus*, el crustaci *Daphnia magna*, el peix *Oncorhynchus mykiss* i la planta *Lactuca sativa*. Nogensmenys, aquests estudis són difícils de comparar, fins i tot quan utilitzen els mateixos models biològics, ja que les condicions de treball són molt diferents i poden influir àmpliament en la resposta de l'organisme viu utilitzat.

Diversos estudis de toxicitat, realitzats sobre diferents models biològics, posen en evidència la importància del control de diversos paràmetres ambientals com són el pH del medi, el potencial redox, la temperatura, la força iònica de la solució o la duresa de l'aigua. En estudis de toxicitat on s'utilitza *Daphnia magna* com a organisme indicador s'ha demostrat la importància de la composició del medi de cultiu a l'hora de determinar la toxicitat de diversos metalls pesants (Berglind i Dave, 1984; Sorvari i Sillampää, 1996). Així mateix, estudis realitzats sobre diversos organismes marins (les microalgues *Hymenomonas carterae*, la diatomea *Skeletonema costatum*, la gamba *Crangon crangon*, entre d'altres) demostren una clara influència dels factors esmentats anteriorment sobre la toxicitat final determinada en cada espècie (Neff, 1997).

Concretament, el bacteri *Vibrio fischeri*, organisme prova de l'assaig Microtox, també ha estat utilitzat anteriorment per tal d'avaluar l'efecte d'alguns d'aquests canvis ambientals com el pH (Villaescusa et al., 1997) o el medi de cultiu (Villaescusa et al., 1996, 2000). El fet que aquest bacteri pugui adaptar-se fàcilment a diferents condicions de treball ha fet que aquest bioassaig sigui molt apropiat per a l'estudi de la toxicitat de diferents substàncies sota diferents condicions de treball.

Concretament, la influència de la composició del medi d'assaig sobre la toxicitat que determinats metalls pesants provoquen sobre el bacteri *Vibrio fischeri* (assaig Microtox) ha estat estudiada per diversos autors. Tal i com varen descriure Florence (1982) i Corpe (1975), la modificació de la composició del medi de cultiu pot donar lloc a la precipitació dels metalls així com a la variació de les espècies químiques en solució. Com a conseqüència d'això, la biodisponibilitat i per tant, la toxicitat d'aquests metalls sobre l'organisme viu pot variar considerablement. Hindwood i McCornick (1987) varen demostrar que el cadmi, coure, zinc, sulfat amònic i clorur d'amoni tenen una toxicitat inferior a mesura que s'augmenta el percentatge de NaCl de la solució, disminuint la toxicitat probablement degut a la formació de complexos menys tòxics. Carlson-Ekwall i Morrison (1994) també varen posar en evidència la

problemàtica que suposa la presència d'ions clorur en el medi a l'hora d'avaluar la toxicitat de mostres i varen investigar diversos medis alternatius com la sucrosa, el glicerol, NaClO_4 , NaHCO_3 entre altres. Així mateix, la toxicitat del plom i el níquel en solucions de clorur i perclorat de sodi així com l'efecte tòxic de diferents clorocomplexes de zinc, plom, cadmi i níquel també ha estat avaluada recentment (Villaescusa et al., 1996, 1998).

D'altra banda, en estudis anteriors, també s'havia posat en evidència la importància del pH del medi d'assaig a l'hora d'avaluar la toxicitat d'un determinat element sobre el bacteri *Vibrio fischeri*. Els compostos orgànics i inorgànics poden ser ionitzats o hidratats donant lloc a un equilibri amb varies espècies químiques, cada una d'elles amb diferents propietats, que provoquen una biodisponibilitat i toxicitat diferent. Ribó et al (1989) varen demostrar que existeix una relació entre el pH de la solució de l'herbicida Glean (que conté chlorosulfuron com ingredient actiu) i la toxicitat que aquest genera sobre els bacteris luminescents. Així mateix, altres autors havien estudiat la toxicitat del mercuri present en solucions de diferent pH, obtenint també valors de toxicitat diferents amb la variació d'aquest paràmetre degut a la formació de diferents complexos (Ribó et al., 1989). D'altra banda, un augment del pH pot produir una precipitació dels metalls presents en solució i conseqüentment una reducció de la biodisponibilitat i de la toxicitat que provoquen sobre els organismes vius (Puigdomènech, 2004). En estudis de la toxicitat del Cr(VI), realitzats utilitzant l'assaig Microtox, es va observar un augment de la toxicitat a mesura que disminueix el pH de la solució (Villaescusa et al., 1997). Aquesta variació es va atribuir a l'existència de diferents espècies químiques, més o menys tòxiques, que provocarien diferents graus de toxicitat sobre *Vibrio fischeri*.

Tot i la gran quantitat d'informació relacionada amb la toxicitat de metalls pesants, s'ha vist que molts dels estudis no especifiquen exactament les condicions de treball (medi d'assaig, pH, etc). Això provoca que els resultats no siguin comparables i que els resultats no siguin acurats ja que, tal i com s'ha posat de manifest anteriorment, la resposta dels organismes en diferents condicions de treball pot variar àmpliament. A més a més, tenint en compte que es tracta d'un assaig de toxicitat homologat que s'utilitza actualment per a l'anàlisi de la contaminació ambiental i d'afluents industrials caldria determinar la sensibilitat d'aquest bioassaig per detectar les concentracions de metalls establertes per la normativa, en les diferents condicions de treball, bàsicament variacions de pH.

D'altra banda, tot i que la majoria d'estudis de toxicitat de metalls fan referència a l'avaluació de l'efecte dels metalls pesants quan aquests es troben individualment, durant els últims anys ha augmentat l'interès per a l'avaluació de la toxicitat de mesclades de substàncies contaminants utilitzant diferents organismes indicadors. Diversos autors han dedicat els seus esforços a l'estudi de mesclades de metalls pesants (Ince et al., 1999; Herkovits et al., 2000), pesticides (Strachan et al., 2001) o contaminants orgànics (Ribó and Rogers, 1990). Altres autors han

desenvolupat models per la predicció de les interaccions que es produeixen en una mescla i en altres casos s'han dissenyat testos d'anàlisi multivariables per avaluar les interaccions que es produeixen entre dos components (Lock et al., 2000). També s'han analitzat les interaccions que existeixen entre diferents metalls pesants en funció de la proporció d'ambdós metalls presents a la mescla sobre aquest bacteri. Així, s'ha demostrat que la proporció dels components també pot influir en el tipus d'interacció (Thomulka i Lange, 1996). Per portar a terme aquests estudis, es varen utilitzar anàlisis qualitatives i quantitatives per determinar el tipus d'interacció entre els metalls analitzats (Thomulka i Lange, 1996, 1997; Lange i Thomulka, 1997). Altres autors han utilitzat mètodes quantitius que calculen mitjançant formules matemàtiques índexs d'additivitat o altres paràmetres, els quals establiran el tipus d'interacció entre els components de la mostra. Concretament, Ince et al (1999) varen estudiar les interaccions binàries que es produeixen entre metalls quan aquests es troben en diferents proporcions. Nogensmenys, en aquest estudi, no s'especifica el pH de la solució analitzada i l'efecte de les interaccions d'altres metalls encara estan pendents d'estudi. En general, els estudis de toxicitat combinada suggereixen que es pot donar una gran varietat d'interaccions entre els productes d'una mostra i demostren la dificultat de predicció d'aquestes.

La toxicitat de metal·loides, concretament de l'arsènic, també ha estat estudiada per diversos autors sobre diferents organismes vius. S'han trobat estudis relacionats amb els efectes tòxics i patologies de l'arsènic en organismes superiors i en l'home (Neff, 1997; Buchet et al., 1999). Altres treballs estan enfocats a la determinació del seu estat d'oxidació, a la definició del tipus de metabolisme en organismes vius o a la biotransformació d'aquest element al medi ambient (Léonard, 1991; Turpeinen et al., 1999). Altres estudis apunten que la toxicitat que genera l'arsènic orgànic i inorgànic sobre diferents organismes pot ser molt diferent ja que la seva disponibilitat pot variar considerablement (Tonner-Navarro, 1998; Carbonell-Barrachina et al., 1999).

També s'han trobat treballs sobre la toxicitat diferencial de l'arsenat i l'arsenit sobre diferents organismes vius (Saranko, 1998) però majoritàriament els estudis s'han realitzat directament sobre humans o vertebrats per tal d'avaluar els efectes tòxics en cas d'ingestió, les metilacions o canvis d'especiació que aquest pateix a l'interior de l'organisme (Jain i Ali, 2000). En general, tots els autors coincideixen que l'arsenit presenta una toxicitat més gran que l'arsenat en vertebrats superiors (Gebel, 2001). En organismes marins, existeix un nombre limitat d'estudis relacionats amb la toxicitat de l'arsenat i l'arsenit. En els amfibis *Corophium insidiosum*, els cranys *Scylla serrata*, les gambes *Crangon crangon* entre d'altres, no s'observen diferències gaire significatives entre l'efecte produït per l'arsenat i l'arsenit i en general la toxicitat és baixa (Neff, 1997). No s'han trobat estudis dedicats a l'estudi de la toxicitat de diferents formes d'arsènic en microorganismes.

També s'han trobat llacunes en altres àmbits de l'estudi de l'arsènic. Per començar, no s'han trobat estudis referents a la detecció sensible i precoç de la presència d'aquest metal·loide en aigües potables i residuals. Es coneix que la ingestió crònica d'arsènic a través de l'aigua que conté baixes dosis d'aquest metal·loide pot provocar danys perjudicials a diferents teixits de l'organisme (ATSDR, Toxic Substances and Disease Registry, USA; Karagas et al., 2001; Frost et al., 2002; <http://www.atsdr.cdc.gov/clist.html>). Tant és així que, els límits de concentració màxima d'arsènic en aigües potables ha estat reduït a 10 µg/L per l'agència de protecció del medi ambient (EPA 815-F-00-015, January 2001). Nogensmenys, la majoria d'autoritats nacionals encara tenen vigents els nivells previs de 50 µg As/L. Aquest fet, és en part degut a la manca de mètodes sensibles i eficients d'aquest element en aigües residuals i potables. D'aquesta manera, es posa de manifest la necessitat de desenvolupar mètodes per a la seva detecció. Alguns autors han desenvolupat sensors per la biomonitorització d'aigües amb continguts baixos d'arsènic (Cai i Dubow, 1997), amb la utilització dels quals s'aconsegueix un límit de detecció de 0,01 µg As/ml però aquest mètode només és vàlid per determinades formes d'arsènic i no s'aplica actualment.

Tampoc s'han trobat estudis que tractin la toxicitat de l'arsènic utilitzant l'assaig Microtox, tot i tractar-se d'un assaig homologat actual que determina els nivells de qualitat de les nostres aigües. Només es descriu de manera poc específica i poc extensa en alguns estudis, en els quals no s'especifica l'estat oxidació o el pH de la solució on es troba aquest semimetall (Qureshi et al., 1982). Només Mowat i Bundy (2002), fa referència a la toxicitat de l'arsènic en els dos estats d'oxidació presents en el medi ambient, As(V) i As(III). En aquest estudi, es va determinar que l'As(V) era més tòxic que l'As(III), tot i que no s'especifica el pH de la solució estudiada.

És de gran importància avaluar la sensibilitat d'aquest bioassaig davant diferents metalls i metal·loides per determinar si es poden detectar correctament els nivells màxims d'aquest element establerts a la Normativa Europea actual i per establir, i si és necessari, diferenciar en els límits d'abocaments de l'As(V) i l'As(III) separadament. L'efecte del pH en la toxicitat provocada per l'As(V) i l'As(III) sobre *Vibrio fischeri* tampoc ha estat anteriorment estudiada. Caldria avaluar la toxicitat de les diferents espècies d'arsenat i d'arsenit que es formen amb la variació del pH del medi d'assaig.

I.2 MATERIAL I MÈTODES

I.2.1 Material

En aquest estudi s'ha utilitzat el material i aparells bàsics d'un laboratori químic. Alguns dels aparells més específics que han estat utilitzats són el pHímetre (MicroCM2200, Crison, Barcelona); Balança (Mettler P100); Agitador magnètic (Rotamag C10); Sistema Milli-Q Millipore (Bedford, M.A); Micropipetes d'alta precisió de 10µl (Nichryo model 5000), 250 i 500 µl (Mark Brand Transferpette); Espectrefotòmetre d'absorció atòmica (Varian SpectrAA-640, Mulgrave Victoria, Australia).

A més d'aquests aparells s'ha utilitzat l'analitzador M500, el qual està comercialitzat per Azur Environmental (Microbics Corporation, Carlsbad, Califòrnia). A la Figura 4 es pot veure l'esquema de l'analitzador de toxicitat Microtox[®] i la funció de cada una de les parts assenyalades.

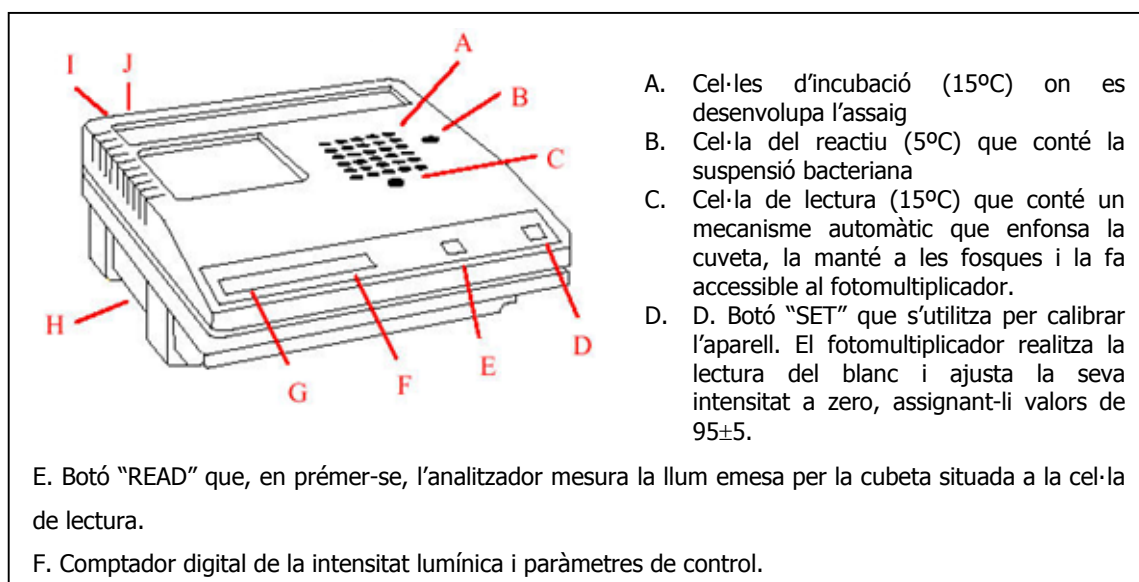


Figura 4 Analitzador Microtox[®] model 500, descripció i funció de cada una de les parts.

L'analitzador de toxicitat Microtox consta d'una cambra tancada, on la llum emesa pel bacteri és rebuda per un fotomultiplicador que la transforma en un senyal elèctric que es pot veure en un comptador digital. Atès que l'emissió de llum per part del bacteri està fortament influenciada per la temperatura, hi ha tres controladors de temperatura. La cel·la del reactiu es manté a 5°C i les cel·les de lectura i les cel·les on es troben les mostres a 15°C. Així mateix, la cambra està equipada amb un sistema de circulació d'aire que el distribueix pel bloc d'incubació per evitar que es condensi l'aigua sobre les cubetes. Aquest analitzador amb capacitat d'autocalibració mesura la producció de llum del bacteri abans i després de l'exposició a mostres tòxiques.

I.2.2 Reactius

Les dissolucions de metalls analitzades en aquest estudi varen ser preparades a partir de patrons estàndard per absorció atòmica de flama (AA) de Cd(II), Pb(II), Zn(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) de concentració 1 g/L en HNO₃ (Panreac (1g/l), Barcelona, Espanya). També s'han utilitzat les sals de cobalt (CoCl₂·6H₂O) i les sals inorgàniques utilitzades per preparar les dissolucions d'arsènic a partir de trioxid d'arsènic doblement sublimat (As₂O₃) de Merck (Darmstad, Germany) i l'arseniat disòdic heptahidratat (Na₂HAsO₄·7H₂O) de Panreac (Barcelona, Spain). Per a la determinació de la concentració d'arsènic total de les mostres es va utilitzar espectroscopia d'Absorció Atòmica i un patró estàndard d'arsènic total de 1 g/L en solució d'àcid nítric 0.5M (Merck,Darmstad, Germany).

Altres reactius utilitzats són les sals de NaCl, NaNO₃, NaClO₄, NaOH, HCl, HNO₃ i els patrons estàndard de l'assaig Microtox com el fenol i sulfat de zinc (ZnSO₄·7H₂O) de Panreac (Barcelona, Espanya).

Altres reactius específics de l'assaig Microtox són:

Reactiu Microtox. Es tracta d'un vial que conté un cultiu liofilitzat de la soca bacteriana *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, aproximadament 100 milions de bacteris per vial.

Reconstituent Microtox solution. Solució lliure de material tòxic està preparada especialment pel bioassaig Microtox amb aigua destil·lada i que s'utilitza per reconstituir el bacteri liofilitzat.

I.2.3 Preparació de les dissolucions

Per a la preparació de les dissolucions de metalls, es va dissoldre la quantitat corresponent de solució patró (1 g/L) o sal inorgànica en aigua de qualitat milli-Q. Totes les dissolucions de metalls varen ajustar-se al pH desitjat (6.0 o 7.0) utilitzant solucions de NaOH i HCl 0.1N. Algunes de les solucions de metalls pesants i les d'arsenat i d'arsenit, també es varen ajustar a pH 5.0, 8.0 i 9.0. En alguns casos, específicament en l'estudi de l'argent, es va utilitzar HNO₃ 0.1N en comptes de HCl per tal d'evitar la precipitació de l'argent.

En el cas de la preparació de les dissolucions d'As(III), es va acidificar lleugerament la solució amb àcid clorhídric i es va escalfar fins a l'ebullició amb agitació constant per tal d'obtenir una total dissolució de l'òxid. A diferència de la sal d'arsenat, l'arsenit no es dissolt fàcilment en aigua. Aquest procés va realitzar-se sota una campana de gasos.

El fenol va ser utilitzat com a patró estàndard de l'assaig Microtox degut a que no pateix una variació de l'especiació en el rang de pHs estudiat i no forma complexos amb les sals del medi que puguin fer variar la seva toxicitat. Per tal de verificar la no variació de la toxicitat segons el pH, solucions de 90 mg/L de fenol varen ser preparades i ajustades a cada un dels pHs anteriorment esmentats (pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 i 9.0).

En tots els casos, abans d'analitzar les solucions amb l'assaig Microtox, va ser necessària la comprovació, i en alguns casos la correcció, del pH de la solució. Tot i això, cal dir que aquests

reajustaments del pH de la solució no són importants i no fan variar significativament la concentració de metall o metal·loide de la solució. És important verificar el pH de la solució abans de la seva utilització en el bioassaig Microtox, ja que en alguns casos es poden donar petites variacions de pH que podria modificar els resultats. Les solucions preparades poden emmagatzemar-se a la nevera en pots de plàstic durant uns dies. Tot i això, no és aconsellable un llarg emmagatzematge de les mostres per tal d'evitar problemes de precipitació del metall o variacions del pH.

La preparació del diluent, una solució 0.34M NaCl, es va preparar i ajustar als diferents pHs de treball (pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 i 9.0). Així mateix, la solució d'ajustament osmòtic (3.4 M NaCl) també es va preparar dissolent la quantitat adequada de NaCl en aigua Milli-Q. En aquest cas, no es va ajustar el pH de la solució ja que el petit volum afegit durant l'assaig no afecte al pH de la solució final.

Per l'anàlisi dels metalls en medi nitrats i perclorats, també es va preparar un diluent (0.34M) i un ajustador osmòtic (3.4M) a partir de la sal de nitrats de sodi i de perclorats de sodi per a l'avaluació de l'efecte dels medis de cultiu en *Vibrio fischeri*. El diluent i l'ajustador osmòtic de nitrats de sodi també va utilitzar-se per l'anàlisi de les solucions d'argent. Aquest element, precipita en contacte amb els clorurs, la qual s'evita canviant la composició del diluent i l'ajustador osmòtic. Així mateix, l'ajustament del pH es va fer utilitzant NaOH i HNO₃.

1.2.4 Protocol estàndard de l'assaig Microtox

Abans de començar l'assaig, cal engegar l'aparell i esperar el temps necessari per obtenir una temperatura estable i adequada per la supervivència del bacteri. Per aquesta mateixa raó, cal que les mostres estiguin a temperatura ambient quan es comencin a analitzar.

D'altra banda, l'activació del bacteri liofilitzat s'aconsegueix abocant la solució reconstituent (temperada a 5°C) a l'interior del seu vial on es troba el bacteri liofilitzat. Cal barrejar vigorosament i transferir el cultiu activat de *Vibrio fischeri* a la cel·la del reactiu. Abans de començar és necessari esperar uns minuts fins que l'emissió lumínica emesa pel bacteri és estable.

El protocol estàndard de l'assaig Microtox consisteix en exposar les solucions d'una determinada mostra, diluïda a 1, 1/2, 1/4 i 1/16, a una solució bacteriana, la inhibició lumínica de la qual es mesura després de 5 i 15 minuts d'exposició.

Per fer això, caldrà seguir un protocol de treball el qual es descriu a continuació (Protocol estàndard). Utilitzant el protocol estàndard poden utilitzar-se 3 mostres a la vegada:

1. Per començar, a la primera cubeta de la primera fila de pous de l'analitzador, es farà un ajustament osmòtic de la mostra, afegint 0.25 ml d'ajustador osmòtic (20% NaCl) a 1.5 ml de mostra objecte del nostre estudi, en cas que es tracti de mostres que no contenen sals. Aquest pas és molt important per tal de no produir un xoc osmòtic al bacteri.

2. Seguidament, en les cubetes dels pous d'aquesta mateixa fila, es farà una sèrie de dilucions utilitzant el diluent (2% NaCl), obtenint les següents dilucions: 1, 1/2, 1/4 i 1/8.
3. Paral·lelament, a les cubetes de la segona filera de pous, s'afegeixen 10 µL de la solució bacteriana a 0.5 ml de diluent (2% NaCl). Després de 15 minuts d'aclimatació, es fa la primera mesura d'emissió lumínica (I_0).
4. Per acabar, es transfereixen 0.5 ml de les cubetes dels pous de la primera filera a la segona fila, començant així l'exposició. Seguidament, es fa la lectura de l'emissió lumínica després de 5 i 15 minuts d'exposició (I_5 i I_{15}) (Microbics Corporation Manual d'instruccions, 1992).

Cal remarcar que en aquest apartat s'ha descrit el protocol estàndard per analitzar un blanc i quatre concentracions d'una mostra problema. En cas de voler realitzar assaigs amb diversos blancs o dilucions, s'hauria de seguir el mateix procediment utilitzant les altres cel·les de l'analitzador. En cas de produir-se aquestes variacions, s'especificarà en el protocol de treball de l'assaig en qüestió.

I.2.5 Tractament de les dades de l'assaig Microtox

La inhibició biològica, representada en aquest cas per la inhibició lumínica que pateix el bacteri *Vibrio fischeri* després de l'exposició a un agent agressor, es pot predir relacionant la concentració de mostra que produeix efectes tòxics i la resposta de l'organisme prova mitjançant la següent equació matemàtica,

$$\Gamma = KC^p \quad (\text{Equació 1})$$

on Γ és la variable que representa la inhibició lumínica del bacteri *Vibrio fischeri*, C és la concentració de la substància tòxica, p és el nombre de molècules tòxiques per unitat de volum i K és la constant que depèn de l'energia lliure i dels canvis de volum en la reacció. Així, després de la transformació logarítmica de l'anterior equació, s'obté la següent equació lineal,

$$\text{Log}(C) = b \cdot \text{log}(\Gamma) + a \quad (\text{Equació 2})$$

Concretament, la variable gamma (Γ) representa la relació entre el valor de llum perduda per *Vibrio fischeri* després d'un temps d'exposició a la mostra i el valor de llum que resta a la cubeta, tal i com s'expressa en la següent equació,

$$\Gamma = \text{llum perduda} / \text{llum restant} \quad (\text{Equació 3})$$

D'aquesta manera, quan el valor de llum perduda és igual al valor de llum restant, gamma pren el valor 1, i llavors, la concentració de mostra és per definició el valor EC50. O sigui, la concentració de mostra que inhibeix l'emissió de llum a la meitat.

I.2.5.1 Concentració efectiva (EC50 i EC20) i unitats de toxicitat (TU)

Un dels paràmetres de toxicitat estàndard per avaluar la nocivitat d'una mostra és l'anomenada EC50 que es defineix com la concentració de mostra o producte que provoca una disminució de l'emissió lumínica del 50% respecte al control negatiu. Així, en el cas de l'assaig Microtox, una

vegada llegits els valors d'emissió de llum inicial (I_0), a 5 min (I_5) i a 15 minuts (I_{15}) d'exposició, es poden calcular els valors de EC50 de les mostres per a cada un dels temps d'exposició estudiats.

El càlcul d'aquest paràmetre pot portar-se a terme mitjançant el programa Microtox Omni (Azur Environmental, Carlsbad, California), el qual proporciona una recta de regressió i calcula directament la EC50. Així mateix, el càlcul d'aquest paràmetre també pot realitzar-se manualment, el procediment del qual es descriu a continuació.

Per començar, cal trobar el factor de correcció R_t del blanc per a cada un dels temps d'exposició analitzats, el qual representa la proporció de llum inicial que resta en la cubeta del blanc després de 5 i 15 minuts (Equació 4)

$$R_t = I_t / I_0 \quad (\text{Equació 4})$$

on I_0 és la lectura d'emissió de llum a temps 0 i I_t és la lectura d'emissió de llum a un temps t del blanc. Aquest factor s'ha de tenir en compte alhora de calcular la gamma, tal i com s'especifica en la següent equació,

$$\Gamma = (R_t \cdot I_0 - I_t) / I_t \quad (\text{Equació 5})$$

Aquesta equació relaciona la variació de llum relativa al blanc i es fa per a cada una de les concentracions de mostra analitzada. Gràficament, la luminiscència expressada en percentatge del control va ser representada en funció del logaritme de la concentració de metall. La EC50 correspon a la concentració que provoca un 50% d'inhibició lumínica, que coincideix amb el punt que talla l'eix d'ordenades ($\Gamma=1$).

Un altre manera d'expressar aquest paràmetre seria mitjançant les unitats de toxicitat (TU), les quals poden determinar-se a partir de les EC50 anteriors i seguint la següent equació,

$$TU = 100 / EC50 \quad (\text{Equació 6})$$

Un altre paràmetre a determinar és l'anomenada concentració llindar, definida com la concentració de mostra analitzada que provoca una inhibició relativa de llum del 20%. Aquest paràmetre representa la concentració mínima de mostra capaç de provocar efectes nocius sobre l'organisme indicador, *Vibrio fischeri*. El càlcul d'aquest paràmetre pot portar-se a terme seguint el mateix procediment i formules descrites en l'apartat anterior. Tot i això, en aquest cas, la EC20 correspondria a $\Gamma=0.25$.

1.2.6 Procediments experimentals

A continuació es descriuen els protocols experimentals seguits per portar a terme cada un dels experiments presentats en aquest capítol. El protocol estàndard de l'assaig Microtox ha estat explicat detalladament en apartats anteriors però en cada un dels treballs es varen fer modificacions per assolir els objectius proposats en cada un d'ells.

En general, per tal de poder dur a terme aquest estudis, s'han hagut de realitzar bàsicament dues modificacions en el protocol estàndard de l'assaig Microtox.

1) D'una banda, va ser necessari l'ajustament del pH de la dissolució analitzada. Així mateix, va ser necessari l'ajustament del diluent utilitzat durant la realització de les dilucions per evitar que provoqués canvis en el pH de la solució metàl·lica analitzada.

2) D'altra banda, també va ser necessari, en alguns casos, l'augment del nombre de dilucions a l'hora d'analitzar la mostra. El protocol estàndard de l'assaig Microtox realitza 4 dilucions de la mostra inicial. En el nostre estudi, ha estat necessària la dilució fins a 14 vegades de la mostra inicial per algun dels elements analitzats per tal d'obtenir una corba de disminució lumínica completa, tot i que això pugui comportar un augment de la variabilitat dels resultats.

A part d'aquestes modificacions, el tractament dels resultats experimentals obtinguts i el procediment seguit es van realitzar tal i com es descriu en el protocol estàndard descrit anteriorment.

I.2.6.1 Avaluació de l'efecte de la composició i pH del medi d'assaig

El patró estàndard de l'assaig Microtox, el fenol, ha estat utilitzat per comprovar que es realitza correctament l'assaig i per verificar el bon comportament del reactiu utilitzat (bacteri). Si el bioassaig es porta a terme correctament, els valors de EC50 de toxicitat del fenol han de ser entre 13 i 26 mg/L (<http://www.azurenv.com/mtox.htm>).

Les solucions de fenol també han estat utilitzades per avaluar l'efecte de la composició del medi d'assaig sobre el bacteri. En aquest cas, s'ha realitzat el protocol estàndard de l'assaig Microtox descrit anteriorment però utilitzant diluents i ajustadors osmòtics de diferent composició (NaCl, NaNO₃ i NaClO₄).

A partir de les dades obtingudes s'han calculat les EC50 tal i com es descriu en apartats anteriors per tal de comparar les variacions de toxicitat produïdes per aquestes modificacions experimentals.

I.2.6.2 Avaluació de l'efecte tòxic de metalls pesants i arsènic en medis de diferent pH

En aquest estudi, s'ha avaluat la toxicitat de diferents metalls com el Cd(II), Co(II), Pb(II), Cu(II), Zn(II), Hg(II) i Ag(I) en solucions ajustades a pH 6.0 i 7.0, per tal de veure la influència d'aquest paràmetre en la toxicitat que aquests provoquen sobre *Vibrio fischeri*. En alguns casos, diversos experiments complementaris amb solucions ajustades a pH 5.0 i 8.0 han estat realitzats per avaluar més correctament la toxicitats de determinades solucions metàl·liques. Així mateix, també s'ha analitzat la toxicitat de solucions d'As(V) i As(III) ajustades a pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0).

I.2.6.2.1 Determinació de la corba Dosi-resposta

Per començar, es va avaluar la relació dosi-resposta de cada un dels metalls, l'arsenat i l'arsenit en dissolucions dels diferent pH objecte del nostre estudi. Per aconseguir això, es va aplicar un

nombre de dilucions variable (entre 4 i 14 dilucions), a diferència del protocol estàndard de l'assaig Microtox que només realitza 4 dilucions.

Una vegada obtingudes les corbes dosi-resposta, es varen estudiar els diferents patrons de disminució lumínica que provoca cada un dels metalls en funció de l'augment de la concentració i es varen determinar si existeixen diferències de toxicitat degudes als diferents pHs estudiats. Cal remarcar, que la relació dosi-efecte no ha estat estudiada anteriorment per altres autors, els quals sempre han utilitzat paràmetres de toxicitat per definir la toxicitat que provocava un element. El coneixement de la resposta en funció de la concentració és important a l'hora d'avaluar el mecanisme d'acció d'un metall o espècie metàl·lica en qüestió.

I.2.6.2.2 Determinació dels valors EC50, EC20 i TU

A partir de les corbes dosi-resposta, ha estat possible determinar el rang de concentracions òptim per avaluar específicament per cada un dels paràmetres de toxicitat objecte del nostre estudi. El càlcul de la EC50 i la EC20 es va realitzar seguint el protocol estàndard de l'assaig Microtox, descrit anteriorment a l'apartat I.2.4 d'aquest capítol.

I.2.6.3 Avaluació de les interaccions entre metalls pesants i espècies d'arsenat en mescles binàries.

Una vegada coneguts els valors de EC50 dels anteriors metalls divalents, es va avaluar la toxicitat de diferents mescles binàries d'aquests metalls quan es troben presents conjuntament en solució. Així, quedaria demostrat que no només paràmetres com el pH i el medi d'assaig sinó també la presència d'altres ions en el medi influeixen en la toxicitat que aquests provoquen sobre *Vibrio fischeri*. En aquest cas, s'ha realitzat el protocol estàndard de l'assaig Microtox i el pH de la solució s'ha mantingut constant a pH 6.0 durant l'assaig utilitzant el diluent ajustat a pH 6.0.

Per a cada mescla binària, es va avaluar experimentalment la toxicitat de dissolucions que contenien els dos metalls conjunta i separatament a pH 6.0. Les mescles binàries varen ser preparades a una concentració semblant al valor de la EC50 dels metalls quan es troben individualment, el qual havia estat determinat anteriorment. Les concentracions de metalls analitzades en dissolucions binàries varen ser: 0.169 mM pel Co(II), 0.26 mM pel Cd(II), 0.033 pel Zn(II), 0.015 mM pel Cu(II), 0.0026 mM pel Pb(II). Es tracta de dissolucions binàries equitòxiques on la concentració de cada un dels metalls presents a la mescla provoca, individualment, una inhibició de l'emissió lumínica del 50%. A partir de les dades obtingudes, es varen calcular els valors EC50 i les unitats de toxicitat de cada una de les mescles. Aquestes dades observades es varen comparar amb les dades esperades segons la hipòtesi nul·la del model estadístic utilitzat que serà descrit properament a l'apartat I.2.7.3.

En el cas de les interaccions entre espècies d'arsenat, no va ser necessària la preparació de mescles binàries sinó l'anàlisi de la toxicitat a diferents pHs, on la presència de les dues espècies objecte del nostre estudi es troba en diferents proporcions (Figura 2A de l'Annex 1). El tractament de dades es descriu a l'apartat I.2.7.4.

I.2.7 Anàlisi estadística

I.2.7.1 Tractament general de dades

Tots els resultats presentats en aquesta capítol en forma de taula o figura representen la mitjana d'almenys tres repeticions independents. Així mateix, la desviació estàndard d'aquesta mitjana també ha estat calculada a partir d'aquestes tres repeticions. En tots els casos, la desviació estàndard és inferior al 20%, que és un coeficient de variació acceptable tenint en compte que es tracta d'assaigs que utilitzen organismes vius i que per tant, la seva variabilitat és més gran que en assaigs químics.

I.2.7.2 Anàlisi estadística: el *Test Student*.

L'avaluació de les diferències trobades entre els diferents tractaments, en el nostre cas entre solucions ajustades a diferent pH, va realitzar-se utilitzant l'anàlisi estadística test d'*Student*. Aquest test avalua si existeixen diferències estadísticament significatives entre dos grups de dades estudiades. Aquest test ens dona la probabilitat d'una variable aleatòria seguint una distribució *t* student, la qual s'utilitza per a la comprovació de les hipòtesis quan el número de mostres és petit.

En el nostre estudi, s'ha avaluat si existeixen diferències significatives entre els valors d'EC50 determinats a partir de solucions ajustades a diferent pH. En aquest cas, la hipòtesi nul·la (H_0) del test afirma que la mitjana dels dos grups de dades analitzats no presenten diferències significatives i que per tant, poden considerar-se iguals. Contràriament, la hipòtesi alternativa (H_a) estableix que hi ha diferències significatives entre els dos grups de dades analitzats i que per tant, cal considerar-los diferents.

Així, per tal d'acceptar o rebutjar la hipòtesi nul·la, aquest test, es base en el càlcul d'un valor *t* a partir de les dades experimentals trobades, el qual s'aconsegueix a partir de la següent equació,

$$t_{\text{obs}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S^2_1}{n} + \frac{S^2_2}{n}}} \quad (\text{Equació 7})$$

Una vegada estimada la t_{obs} a partir de les dades experimentals, pot comparar-se amb la $t_{\text{df},0,05}$ tabulada en les taules de valors crítics de la distribució *t*, la qual té en compte el grau de llibertat i estableix un interval de confiança, en el nostre cas establert al 95%.

D'aquesta manera, si $t_{obs} > t_{df,0,05}$ podem afirmar que existeixen diferències significatives entre els dos grups de dades. Si pel contrari, $t_{obs} < t_{df,0,05}$ pot acceptar-se la hipòtesi nul·la i afirmar que no existeixen diferències significatives entre els grups de dades estudiats. Així mateix, a partir d'aquest valor, també és molt important determinar quin és el valor p , el qual determina la probabilitat d'equivocar-se al acceptar la hipòtesi alternativa (Cox, 1997).

1.2.7.3 Interaccions entre metalls i mescles binàries. Anàlisi estadística

1.2.7.3.1 Interaccions entre diferents metalls. Acció similar

Les interaccions additives, sinèrgiques o antagonístiques que es produeixen entre metalls presents en mescles binàries han estat avaluades utilitzant el mètode estadístic descrit prèviament per Ribó i Rogers (1990). Aquest mètode consisteix en la comparació de la toxicitat observada i la toxicitat esperada segons el model matemàtic descrit a continuació.

Les interaccions existents entre metalls en solucions binàries varen ser estudiades quantitativament comparant (1) la toxicitat determinada experimentalment quan aquests dos metalls es troben presents en una mateixa solució ($EC50_{obs}$) i (2) la toxicitat esperada segons la hipòtesi nul·la del model estadístic utilitzat ($EC50_{calc}$). Les diferències es varen avaluar mitjançant una anàlisi estadística del test d'*Student*.

En aquest cas, la hipòtesi nul·la del test defineix les unitats de toxicitat esperades de la mescla ($EC50_{calc}$) com la suma de les unitats de toxicitat dels dos metalls de la mescla quan aquests es troben individualment, fenomen altrament anomenat additivitat. El càlcul de la $EC50$ es descriu en la següent equació,

$$EC50_{calc} = \frac{C_M}{(C_X / EC50_X) + (C_Y / EC50_Y)} \quad (\text{Equació 8})$$

on C_M és la suma de les concentracions dels metalls de la mescla binària (C_X i C_Y) i la $EC50_X$ i $EC50_Y$ són les concentracions de cada un dels metalls que provoquen un 50% d'inhibició lumínica emesa pel bacteri individualment, les quals representen la toxicitat observada de cada un dels metalls quan es troben individualment en solució.

L'avaluació del tipus d'interacció involucra: 1) el càlcul del valor $EC50_{Diff}$, entre la toxicitat calculada amb l'equació 1 i la toxicitat observada de la mescla binària ($EC50_{Diff} = EC50_{calc} - EC50_{obs}$); 2) el càlcul de la t d'*student* per cada una de la $EC50_{Diff}$, utilitzant l'error standard de cada un dels metalls separatament i l'error estàndard de la mescla binària; i 3) la comparació dels valors t calculats amb la corresponent valor $t_{0,05}$ derivat de la distribució d'*student*. (Cox, 1997, Ribó i Rogers, 1990).

Els valors obtinguts indiquen el tipus d'interacció entre els dos metalls de la mescla binària: si el valor $EC50_{Diff}$ és negativa i significativament diferent, la interacció s'anomena antagonica, la qual comporta que la toxicitat observada en la mescla binària és inferior que la suma de

toxicitats; si la $EC50_{Diff}$ és positiva i , la interacció s'anomena sinèrgica, la qual implica que la toxicitat observada de la mescla és superior que la suma de toxicitats; 3) D'altra banda, quan la diferència és considerada estadísticament no significativa (a un nivell de confiança del 95%) considerem que la interacció és additiva.

I.2.7.3.2 Interaccions entre diferents metalls. Acció independent

En aquest estudi, les interaccions additives, sinèrgiques o antagonístiques, que es produeixen entre els diferents metalls presents en una mateixa solució, han estat avaluades mitjançant un mètode quantitatiu que consisteix en el tractament i anàlisi estadística de les dades experimentals i de les obtingudes a partir de la comparació de l'hipòtesi nul·la i la toxicitat observada, per tal de detectar estadísticament les diferències entre els grups de dades analitzats (Ince et al., 1999).

Les interaccions existents entre metalls en solucions binàries també varen ser estudiades quantitativament mitjançant una anàlisi estadística dels resultats. En global, aquestes diferències varen ser avaluades comparant (1) la toxicitat determinada experimentalment quan aquests dos metalls es troben presents en una mateixa solució (TU_{obs}) i (2) la toxicitat esperada segons la hipòtesi nul·la del model estadístic utilitzat (TU_H).

En aquest estudi, la toxicitat de les mostres es va determinar utilitzant les unitats de toxicitat (TU) descrites anteriorment. Tal i com s'ha explicat en apartats anteriors, es defineixen les unitats de toxicitat com $TU=100/EC50$, on la $EC50$ s'expressa com a percentatge de la concentració de la mostra inicial que provoca una inhibició lumínica del 50%. Així, cal remarcar, que en aquest cas, els valors obtinguts no són valors absoluts sinó valors relatius que fan referència a la concentració inicial. Així, les unitats de toxicitat d'aquestes solucions poden sumar-se, la qual cosa no podria realitzar-se amb els valors de $EC50$ trobats (mg/L) ja que es tracta de concentracions de dos metalls diferents.

Així, una vegada obtingudes les unitats de toxicitat de cada un dels metalls quan es troben individualment i conjuntament, es varen avaluar les diferències mitjançant una anàlisi estadística, utilitzant el test d'*Student*. En aquest cas, la hipòtesi nul·la del test defineix les unitats de toxicitat esperades de la mescla (TU_H) com la suma de les unitats de toxicitat dels dos metalls de la mescla quan aquests es troben individualment, fenomen altrament anomenat additivitat que es representa en l'equació següent,

$$H_0 : TU_H(x + y) = TU_x + TU_y \quad (\text{Equació 9})$$

on $TU_H(x + y)$ són les unitats de toxicitats esperades d'una mescla que conté dos metalls ($x+y$), a un pH 6.0. D'altra banda, TU_x i TU_y , corresponen a les unitats de toxicitat observades per a cada un dels metalls de la mescla avaluats individualment en una solució del mateix pH.

Una vegada definit el model estadístic a seguir, es procedeix a determinar les anomenades unitats de toxicitat diferencials (TU_{Diff}), que es defineixen com la diferència entre les unitats de toxicitat esperades i les unitats de toxicitat observades experimentalment. Aquesta relació es defineix com,

$$TU_{Diff} = TU_H - TU_{obs} \quad (\text{Equació 10})$$

on TU_H són les unitats de toxicitat esperades de la mescla segons la hipòtesi nul·la del model estadístic anteriorment definit i TU_{obs} són les unitats de toxicitat determinades experimentalment quan els dos metalls es troben conjuntament. En segon lloc, és necessària el càlcul del valor t del test de *Student* per cada una de les TU_{Diff} calculades anteriorment. Així, l'estimació del valor t observat a uns determinats graus de llibertat amb un nivell de confiança del 95%, s'aconsegueix a partir de la següent equació,

$$t = TU_{Diff} / SE_{Diff} \quad (\text{Equació 11})$$

on TU_{Diff} és la diferència de toxicitat que existeix entre els grups de dades comparats i SE_{Diff} és la desviació estàndard d'aquesta diferència.

Per acabar, es compararan els valors de t_{obs} i de $t_{df,0,05}$, tabulada en la taula de valors t de la distribució de *Student*, tenint en compte els graus de llibertat ($df(SE_{obs})+df(SE_H)$) i un nivell de confiança del 95%. Així, es pot determinar si existeixen diferències significatives entre els grups de dades analitzats. Si el valor t estimat és inferior al valor t tabulat ($t < t_{df,0,05}$) podem considerar que no existeixen diferències significatives entre els dos valors comparats. En aquest cas s'acceptaria la hipòtesi nul·la i es consideraria l'existència d'una interacció additiva entre els metalls de la mescla. Si pel contrari, el valor t estimat és superior al valor t tabulat ($t > t_{df,0,05}$) podem considerar que existeixen diferències significatives entre els valors comparats. Això suposaria un rebuig de la hipòtesi nul·la, que en el nostre cas determinaria l'existència d'interaccions antagonístiques o sinèrgiques.

En aquest cas, si $TU_{Diff} > 0$ podem considerar que existeix un antagonisme entre els dos metalls presents en la mescla binària. Contràriament, si $TU_{Diff} < 0$ podem afirmar que existeix un sinèrgisme entre els dos metalls presents en la mescla binària. A més a més, tal i com ja s'havia dit anteriorment, és important conèixer el valor p , per tal de decidir si les diferències són estadísticament significatives. En aquest estudi, es considera que hi ha diferències estadísticament significatives si $p < 0,05$, la qual cosa significa que l'error és inferior al 5 %.

1.2.7.4 Interaccions entre diferents espècies d'arsenat en mescles binàries

En el cas de l'arsenat, l'estudi de la toxicitat de les diferents espècies ha estat possible gràcies a la variació inversament proporcional en funció del pH de la solució on es troben de les dues espècies existents. Es coneix que en les solucions ajustades a pH 5.0 trobem aproximadament

un 100 % de l'espècie dihidrogenarsenat i en les solucions ajustades a pH 8.0 aproximadament un 100 % de l'espècie monohidrogenarsenat. Així, les interaccions que es produeixen entre espècies presents en les solucions ajustades a pH 6.0 i 7.0, on es troben diferents proporcions de dihidrogen i monohidrogenarsenat, han pogut ésser estudiades.

Així, una vegada determinades les EC50 i les TU de les diferents espècies d'arsenat, quan aquestes es troben individualment en solució (pH 5.0 i pH 8.0), es varen avaluar estadísticament les interaccions existents entre aquestes dues espècies quan es troben conjuntament en diferents proporcions. El procediment per avaluar aquestes interaccions és el mateix que el descrit anteriorment.

En aquest cas, l'anàlisi estadística de les interaccions entre espècies d'arsenat, quan aquestes es troben en diferents proporcions en funció del pH de la solució, s'ha realitzat amb el mateix mètode utilitzat anteriorment (Apartat I.2.7.4). Nogensmenys, cal destacar certes diferències alhora d'analitzar aquestes interaccions.

En primer lloc, cal destacar que els valors EC50, a partir de les quals es calcularan les unitats de toxicitat, no s'expressen com a percentatge de la concentració inicial. A diferència de l'apartat anterior, on s'analitzaven dos metalls diferents, les EC50 s'expressen en concentracions d'arsenat (mg/L). Això és possible degut a que es tracta de diferents espècies d'un mateix metal·loide i que l'augment d'una espècies suposa la disminució de l'altre i inversament.

En segon lloc, a l'hora d'estudiar la toxicitat de diferents espècies d'un mateix element, és necessari conèixer la toxicitat de cada una de les espècies analitzades separatament. Així, la toxicitat de l'espècie dihidrogenarsenat ha estat avaluada en les solucions ajustades a pH 5.0 on es troba una proporció al voltant del 100% d'aquesta espècie. De la mateixa manera, la toxicitat de l'espècie monohidrogenarsenat ha estat avaluada en solucions ajustades a pH 8.0, on hi ha aproximadament un 100% d'aquesta espècie. Sabent això, ha estat possible calcular les unitats de toxicitat esperades (TU_H) de les solucions ajustades a pH 6.0 i pH 7.0 on existeixen diferents proporcions de les espècies (x i y). En aquest cas, l'equació utilitzada es presenta a continuació,

$$H_0 : TU_H (x+y)_i = \%_x TU_{x,i} + \%_y TU_{y,i} \quad (\text{Equació 12})$$

on $\%_x$ i $\%_y$ són la proporció de cada una de les espècies estudiades a un determinat pH (i) i $TU_{x,i}$ i $TU_{y,i}$ són les unitats de toxicitat corresponents de cada una de les espècies avaluades individualment en el mateix pH(i).

I.3. RESULTATS

A continuació, es presenten els resultats obtinguts en aquest estudi en els articles científics publicats o en període de revisió que s'adjunten a continuació.

Per començar, es presenta un article enviat per publicació a la revista *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, en el qual es presenten les corbes dosi resposta i les concentracions llindar de diversos metalls pesants i arsènic en solucions de diferent pH obtingudes utilitzant l'assaig Microtox. En aquest article també es comparen aquestes concentracions llindar amb la normativa vigent per determinar l'eficàcia d'aquest bioassaig per detectar aquests agents agressor.

D'altra banda, en el treball enviat per publicació a la revista *Chemosphere*, es presenten els resultats obtinguts de l'estudi de les interaccions que es produeixen entre metalls pesants en mescles binàries utilitzant diferents models estadístics.

Seguidament, s'inclou l'article publicat aquest mateix any a la revista *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, el qual recull les investigacions sobre la toxicitat de l'arsenat i l'arsenit en medis d'assaig de diferent pH sobre el bacteri *Vibrio fischeri* (Assaig Microtox). També s'avaluen les interaccions que es produeixen entre les diferents espècies d'arsenat presents en solució a pH 6.0 i 7.0

Article 1. Fulladosa, E and Villaescusa, I. "Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (Enviat per publicació)

Dept- of Chemical Engineering. Universitat de Girona, Avda. Lluís Santaló, s/n. 17071 Girona, Spain.
e-mail: Isabel.villaescusa@udg.es

Abstract.- The Microtox[®] bioassay was used to establish dose-response curves for some toxic elements, namely, Zn(II), Pb(II), Cu(II), Hg(II), Ag(I), Co(II), Cd(II), Cr(VI), As(V) and As(III) in aqueous solutions. Experiments were carried out at either pH 6 or pH 7 to indicate that pH may influence the measured toxicity of some elements due to pH-related changes of their chemical speciation. EC20 values, which represent a measurable threshold of toxicity, were determined for each element and were found to rank as Pb(II), Ag(I), Hg(II), Cu(II), Zn(II), As(V), Cd(II), Co(II), As(III), Cr(VI). These values were compared to the limit concentrations allowed in industrial wastewater according to the official regulations in Catalonia (Spain). It appears that the Microtox[®] test is sensitive enough for detecting the tested elements with respect to official regulations dealing with pollution control, with the exception of cadmium, mercury, arsenate, arsenite and chromate.

Keywords.- Metals and arsenic toxicity, Microtox[®] test, *Vibrio fischeri*, dose-response relationship, EC20 values.

Article 2. Fulladosa, E and Villaescusa, I. "Study on the resulting toxicity of metal binary mixtures using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target". Chemosphere (Enviat per publicació)

Chemical Engineering Department, Escola Politècnica Superior,
Universitat de Girona, Avda Lluís
Santaló, s/n, 17071, Girona, Spain.
E mail: isabel.villaescusa@udg.es

Abstract.- Results from two mathematical approaches to predict the toxicity of all the possible binary equitoxic mixtures of Co, Cd, Cu, Zn and Pb were compared to the observed toxicity of these mixtures to *Vibrio fischeri* bacteria. Combined effect of the metals was found to be antagonistic for Co-Cd, Cd-Zn, Cd-Pb and Cu-Pb, synergistic for Co-Cu and Zn-Pb and merely additive in other cases, revealing a complex pattern of possible interactions. Besides, Cd appears much less toxic to the bacterial model than to animal cells. The synergistic effect of the Co-Cu combination and the strong lowering of Pb toxicity in the presence of Cd deserve much attention when establishing environmental safety regulations.

Keywords.- Microtox[®], EC50, metal interaction models, equitoxic mixtures, antagonism, synergism

Article 3. Fulladosa, E., Murat, J.C., Martinez, M and Villaescusa, I.
"Effect of pH on arsenate and arsenite toxicity to luminescent bacteria
(*Vibrio fischeri*)". *Archives of Environmental Contamination and
Toxicology*. Vol. 46, no. 2 (March 2004) : 176-182.

I.4 DISCUSSIÓ

En global, els resultats obtinguts en aquest capítol, posen de manifest la gran influència que diversos factors com el pH, composició del medi d'assaig, altres ions metàl·lics o el temps d'exposició, provoquen sobre la toxicitat final de metalls pesants i l'arsènic determinada utilitzant el bacteri *Vibrio fischeri*.

Els primers estudis realitzats utilitzant l'assaig Microtox es varen dedicar a obtenir les corbes dosi-resposta dels diversos metalls pesants analitzats i l'arsènic. Aquestes corbes dosi-resposta no havien estat descrites en estudis anteriors on, en la majoria dels casos, la toxicitat s'avalua utilitzant paràmetres de toxicitat com els valors EC50 i les unitats de toxicitat (TU) que, encara que molt útils i representatius, no donen informació sobre el mode d'acció d'aquests agents agressors sobre aquests microorganismes. Els resultats presentats en l'Article 1 mostren que l'acció dels diferents metalls analitzats és molt diferent. Es poden distingir bàsicament tres tipus de corba dosi-resposta. D'una banda trobem metalls com el mercuri i l'argent que provoquen una disminució molt sobtada de la llum en un rang de concentracions molt petit i a concentracions de metall molt febles mentre que altres metalls com el coure, plom i zinc provoquen una inhibició de la llum progressiva donant lloc a una corba exponencial negativa en un rang de concentracions petit. Així mateix, metalls com el cadmi, cobalt, arsenat, arsenit i cromat, també produeixen aquest tipus de corba però en un rang de concentracions molt més gran, indicant que provoquen una baixa toxicitat sobre aquest bacteri. En alguns casos, s'observen fins i tot, corbes exponencials negatives on no s'aconsegueix mai una reducció completa de la llum. Aquest seria el cas del cromat i l'arsenat en les solucions ajustades a pH 6.0 on, tot i analitzar concentracions molt elevades, no s'aconsegueix mai una reducció total de la llum emesa pel bacteri (inhibició < 50%). Aquesta manca de toxicitat trobada en determinades condicions d'assaig pels oxianions de cromat, d'arsenat i d'arsenit fa pensar que aquest bacteri utilitza algun mecanisme de resistència que caldria que fos investigat. D'altra banda, la rapidesa d'actuació d'un metall o metal·loide també ens parla del seu mecanisme d'acció. Alguns dels metalls analitzats tenen una acció ràpida i directa sobre els organismes vius com és el cas del mercuri, l'argent, el plom o el coure, els quals ja han provocat el màxim efecte després de només 5 minuts d'exposició. En altres metalls, l'efecte és més lent com per exemple en el cas del cadmi, cobalt, crom hexavalent, arsenat o arsenit, ja que s'observen diferències significatives entre 5 i 15 minuts d'exposició.

Així mateix, les corbes dosi-resposta presentades en aquest article també posen de manifest una toxicitat diferencial, en alguns casos més significativa que altres, quan s'analitzen els mateixos metalls o arsènic en solucions ajustades a diferents pHs. Tot i això, cal dir que quan es comparen els valors EC20 dels diferents metalls presentats en l'article esmentat

anteriorment, les diferències de toxicitat no són significativament diferents. Només en el cas de Cr(VI), s'observen valors de toxicitat EC20 significativament diferents entre solucions ajustades a pH 6.0 i 7.0. En canvi, quan es comparen els valors de les EC50 d'aquests mateixos metalls i metal·loides en solucions de diferent pH s'observen diferències més significatives. Tal i com es pot veure a l'Article 3, els valors de les EC50 de l'arsenat i l'arsenit als diferents pH varien molt significativament.

El pH té un efecte molt important sobre les espècies químiques d'alguns dels metalls analitzats (Puigdomènech, 2004), la biodisponibilitat de les quals per al bacteri *Vibrio fischeri* pot variar significativament, esdevenint més o menys tòxiques depenent d'aquest paràmetre. És evident que la precipitació dels metalls a pHs bàsics provoca la disminució de la toxicitat de les mostres. Nogensmenys, altres metalls com el cromat i l'arsenat no precipiten amb l'augment del pH de la solució sinó que pateixen un canvi en la proporció relativa de les seves espècies, la qual cosa pot fer augmentar o disminuir la toxicitat de la mostra. Els resultats presentats a l'Article 3 mostren que hi ha un augment de la toxicitat de l'arsenat a mesura que augmenta el pH de la solució on es troben. Atès que a mesura que augmenta el pH de la solució, s'observa un augment de la toxicitat i també un augment de la proporció relativa de l'espècie HAsO_4^{2-} , podem afirmar que aquesta és l'espècie més tòxica. D'altra banda, en el cas de l'arsenit, la toxicitat als diferents pHs analitzats és molt semblant excepte a pH 9.0 on s'observa un augment de la toxicitat amb l'aparició de l'espècie H_2AsO_3 . Aquestes variacions de toxicitat en funció del pH no havien estat documentades anteriorment per altres autors, els quals en molts casos no diferencien els dos estats d'oxidació, l'As(V) i l'As(II), i tampoc especifiquen el pH de la solució analitzada. Tal i com demostren els nostres resultats, si no es té en compte aquest paràmetre, la toxicitat reportada per un determinat metall o metal·loide pot variar significativament.

Així, a partir dels resultats obtinguts en aquest estudi, i tenint sempre en compte el pH del medi d'assaig, es pot establir un ordre de toxicitats. El següent ranking de toxicitats s'ha realitzat a partir de valors EC20 determinats després de 15 d'exposició, en solucions ajustades a pH 6.0, però utilitzant sempre el medi 0.34M NaCl com a medi d'assaig (la toxicitat de l'Ag(I) no s'inclou perquè ha estat analitzat en NaNO_3). Així, podem dir que la toxicitat dels metalls analitzats disminueix amb el següent ordre de més a menys tòxics: $\text{Pb(II)} < \text{Hg(II)} = \text{Cu(II)} < \text{Zn(II)} < \text{As(V)} < \text{Cd(II)} < \text{Co(II)} < \text{As(III)} < \text{Cr(VI)}$.

Nogensmenys, els metalls presentats anteriorment no solen trobar-se aïlladament en el ambient i quan es troben conjuntament en solució es poden produir interaccions entre ells. Els resultats presentats en l'Article 2 indiquen que entre les espècies metàl·liques de diferents metalls en mesclades binàries es poden produir diferents tipus d'interaccions; additives, antagonístiques i

sinergístiques. Majoritàriament, es produeixen interaccions antagonístiques com és el cas de mescles binàries de Co-Cd, Cd-Zn, Cd-Pb i Cu-Pb o interaccions additives en les mescles binàries de Co-Pb, Cu-Cd, Cu-Zn i Co-Zn. En altres ocasions es produeix un sinergisme com és el cas de la interacció entre el Co-Cu i Zn-Pb. Atès que el tractament estadístic de les dades obtingudes és molt important, s'han utilitzat dos models estadístics per analitzar el tipus d'interaccions que es produeixen. Els mètodes estadístics utilitzats en aquest estudi es basen en conceptes diferents. Nogensmenys, tant en l'estadística basada en l'acció similar (Ribó i Rogers, 1990) com en l'acció independent (Ince et al., 1999), no difereixen en la determinació del tipus d'interacció tot i que sí que s'observen diferències en la seva significància.

Així mateix, també cal tenir en compte les possibles interaccions entre espècies metàl·liques d'un mateix element. En el cas de l'arsenat, tal i com s'ha descrit en l'Article 3, es produeixen interaccions o una competència entre les dues espècies d'arsenat presents en solució concretament a pH 6.0 o 7.0. En aquest estudi, la interacció existent entre les diferents proporcions de l'espècie monohidrogenarsenat i dihidrogenarsenat es va estudiar utilitzant un model estadístic basat en l'acció independent, determinant que existeix un antagonisme entre les dues espècies d'arsenat, la H_2AsO_4^- i HAsO_4^{2-} .

Així doncs, tant les interaccions entre els metalls presents en el medi com les variacions de toxicitat degudes a l'efecte del pH del medi d'assaig poden influir en la sensibilitat de l'assaig Microtox. Atès que l'assaig Microtox és un bioassaig de toxicitat homologat per entitats com la Generalitat de Catalunya per a la determinació de la toxicitat d'afluents industrials, els nivells de detecció haurien de ser adequats per a detectar els valors establerts per la normativa actual. Les comparacions dels valors límit d'aquesta normativa amb les concentracions llindar (EC20) de l'assaig Microtox presentades en l'Article 1 i 3, posen en evidència una manca de sensibilitat d'aquest assaig per determinats metalls i l'arsènic. La sensibilitat de l'assaig Microtox és molt bona pel zinc, el plom i el coure. Contràriament, per altres metalls i metal·loides com el mercuri, el cadmi, el crom hexavalent, l'arsenat i l'arsenit, la sensibilitat del bioassaig no és només insuficient sinó també, en alguns casos, molt superior a les concentracions límit d'abocament permeses per la normativa vigent establerta per la Generalitat de Catalunya.

Capítol II. Bioassaigs de toxicitat crònica: Efectes tòxics del Cd(II), Cr(VI) i As(V) en cultius de *Vibrio fischeri*. Capacitat d'aquest bacteri per reduir el Cr(VI).

Part del treball realitzat a Institut National des Sciences Appliquées (INSA) de Lyon (França)

II.1 INTRODUCCIÓ

Atesa la baixa toxicitat trobada per alguns metalls utilitzant el bioassaig de toxicitat aguda Microtox, sobretot en el cas del cromat, l'arsenat i l'arsenit, es va decidir desenvolupar altres bioassaigs de toxicitat microbians per tal d'avaluar la toxicitat crònica d'aquests, mesurant paràmetres de toxicitat diferents a l'anterior.

II.1.1 Assaigs microbians de toxicitat crònica

Per avaluar l'efecte de substàncies que tenen un actuació en un període de temps més llarg, s'utilitzen els assaigs de toxicitat crònica. Entre els diferents models biològics utilitzats en assaigs de toxicitat crònica, els microorganismes compleixen una sèrie de característiques que fan d'ells un model biològic molt apropiat per a ser utilitzats en testos de toxicitat; 1) són fàcils d'aconseguir i manipular obtenint-ne grans quantitats en poc temps; 2) no són cars de mantenir i cultivar; 3) el seu cicle cel·lular és molt curt i per tant responen ràpidament als canvis ambientals o a les substàncies tòxiques i 4) cada assaig consta de milions de bacteris (una població homogènia) donant molta fiabilitat al resultat i reduint al màxim la possible variació entre organismes. Alguns d'aquests assaigs es presenten a continuació:

II.1.1.1 Assaigs d'inhibició de la viabilitat

L'assaig d'inhibició de la viabilitat avalua la capacitat de tornar a formar colònies (en condicions normals) del bacteri després de l'exposició a agents agressors durant diferents temps d'exposició.

Aquest tipus de bioassaig ha estat utilitzat anteriorment per diversos autors. En un dels seus estudis, Trevors et al (1981) varen proposar un assaig de toxicitat ràpid basat en la determinació de la viabilitat en *Pseudomonas fluorescens* després de l'exposició a diferents agents agressors. L'efecte de diverses barreges de metalls sobre la viabilitat de *Salmonella enteritidis* (Di Pietro et al., 2000) així com l'efecte del Ag(I), Hg(II) i substàncies orgàniques sobre diverses comunitats microbianes (Jonas et al., 1984) també es va avaluar mitjançant assaigs d'inhibició de la viabilitat. Utilitzant aquest mètode, Di Pietro et al (2000) va calcular les concentracions letals de barreges de metalls en bacteris. Així mateix, la toxicitat de Ag(I) i Hg(II) sobre *Candida albicans* i *maltosa* també va avaluar-se amb aquesta metodologia i per citometria de fluxe. Nogensmenys, tot i la extensa revisió bibliogràfica no es varen trobar una gran quantitat d'estudis relacionats amb aquest assaig i cap d'ells utilitza el bacteri *Vibrio fischeri*.

II.1.1.2 Assaigs d'inhibició del creixement

L'assaig d'inhibició del creixement avalua l'efecte sobre la capacitat de divisió i creixement dels microorganismes en presència d'un determinat agent agressor.

Diversos autors han utilitzat aquest paràmetre per a l'estudi de la toxicitat de diversos substàncies contaminants utilitzant tot tipus de soques bacterianes com *Pseudomonas putida* (Slabbert, 1986), *Vibrio fischeri* (Schmitz et al., 1998; Gellert et al., 1999; Gellert, 2000), *Bacillus cereus* (Castillo et al., 2000) entre d'altres. En aquests assaigs de toxicitat, suspensions bacterianes són incubades durant diverses hores en presència de substàncies tòxiques en diferents medis de cultiu i s'avalua el creixement, el qual estarà més o menys inhibit segons el tipus i concentració de l'agressor. Slabbert (1986) va utilitzar el bacteri *Pseudomonas putida* en un nou assaig de toxicitat basat en la mesura de l'efecte sobre el creixement de diversos metalls pesants (Cu, Cd, Zn) i altres agents agressors en diferents medis de cultiu. En aquest estudi es va veure que depenent del medi de cultiu la resposta del microorganisme era més o menys gran. Així mateix, Schmitz et al (1998) varen posar a punt un assaig de toxicitat basat en l'avaluació de les cinètiques de creixement de *Vibrio fischeri* i *Pseudomonas putida*. Aquest estudi avalua la toxicitat de Mn(II), Cr(VI), Se(IV) entre d'altres i insisteix en la importància de la manera de calcular els paràmetres ambientals de toxicitat com són els EC50 i EC20 anteriorment descrits. Aquest mateix autor, també va estudiar la inhibició del creixement deguda a diferents metalls com el Cd(II), Cr(VI), Mn(II), Zn(II) i Se(IV) sobre el bacteri *Photobacterium luminescens* (Schmitz et al., 1999). Gellert et al (1999) varen estudiar la influència dels components del medi de cultiu en la resposta de creixement de *Vibrio fischeri* en presència de diversos metalls pesants (Cd(II), Zn(II), Cu(II) i Hg(II)). Així mateix, també varen comparar la sensibilitat dels testos basats en la inhibició del creixement en cultius de *Vibrio fischeri* exposats a Cu(II), Cr(VI), Zn(II), Hg(II), Pb(II) i Cd(II), entre altres (Gellert, 2000). Cal remarcar que en tots aquests estudis, han utilitzat medis de cultiu que contenen substàncies orgàniques que poden interferir en la toxicitat de les substàncies analitzades sobre els bacteris. En estudis anteriors ja es va descriure la capacitat de complexació d'alguns components del medi de cultiu, la qual pot reduir considerablement la toxicitat dels agents agressors analitzats (Corpe, 1975; Kumer Sani et al., 2001).

II.1.1.3 Assaigs de toxicitat crònica a nivell molecular

També poden utilitzar-se altres paràmetres, en aquest cas a nivell molecular, per avaluar la toxicitat crònica d'una determinada substància o agent agressor. Diversos autors han avaluat la toxicitat crònica de diverses substàncies paral·lelament sobre el creixement bacterià (nivell cel·lular) i sobre la bioluminescència (nivell molecular) emesa del bacteri *Vibrio fischeri* (Backhaus et al., 1997; Gellert, 2000; El-Alawi et al., 2002) o *Photobacterium luminescens* (Schmitz et al., 1999). Backhaus et al (1997) i El-Alawi et al (2002) varen estudiar la toxicitat crònica de substàncies orgàniques mesurant el seu efecte sobre la inhibició de la llum emesa i el creixement. Gellert (2000) i Schmitz et al (1999) varen estudiar l'efecte de diversos metalls pesants utilitzant el mateix tipus d'assaigs. En aquests estudis es va veure que, en general, la

resposta sobre la taxa de creixement era més feble que la resposta d'inhibició de l'emissió lumínica. Altres autors també han utilitzat assaigs de toxicitat crònica com el Microtox chronic toxicity test, el qual mesura la inhibició d'emissió lumínica després de 22 hores d'exposició (Hsieh et al., 2004).

II.1.1.4 Anàlisis morfològiques utilitzant el SEM

Altres autors analitzen les alteracions morfològiques en els bacteris després de les exposicions als agents agressors ja que s'ha vist que aquest anàlisi dona molta informació sobre el tipus d'acció de l'agent agressor. L'exposició de *Rhodocyclus rubrum* a oxyanions com l'arsenat, selenat i cromat provoquen canvis morfològics importants com el canvi de mida del bacteri (Nepple et al., 1999). L'exposició a medis àcids-bàsics també provoquen canvis en la morfologia de *Propionibacterium freudenreichii* (Jan et al., 2001) i *Vibrio parahaemolyticus* (Koga et al., 2002).

II.1.2 Mecanismes de resistència microbiana als metalls: aspectes generals

En resposta a les agressions per metalls pesants, els microorganismes han desenvolupat mecanismes de resistència i diferents funcions que fan possible la resistència bacteriana d'alguns bacteris als metalls pesants. Alguns d'aquest sistema es troben en tots els bacteris però, alguns d'ells, són molt específics i només es troben en alguns bacteris.

II.1.2.1 Adsorció de metalls a les membranes bacterianes

Un mecanisme general de resistència que té lloc en tots els microorganismes és l'adsorció de metalls a les membranes bacterianes. La majoria dels metalls, per tal de produir un efecte fisiològic o tòxic, han d'entrar a l'interior de la cèl·lula. Atès que els metalls pesants poden adsorbir-se i quedar immobilitzats a les membranes bacterianes, es pot afirmar que aquestes membranes actuen com a primera línia de defensa. L'adsorció de metalls per part de les membranes bacterianes és un fenomen relacionat bàsicament amb els grups funcionals que aquestes contenen (grups carboxílics, amina i fosfat), amb les concentracions de metalls i amb les forces de van der Waals. L'adsorció es produeix bàsicament en els exopolímers secretats pels microorganismes els quals estan compostos de carbohidrats, polisacàrids, i algunes vegades àcids nucleics i àcids grassos. Una altra molècula extracel·lular secretada pels microorganismes són els sideròfors, compostos orgànics de baix pes molecular complexadors de ferro, que concentren i faciliten l'entrada de ferro a l'interior de la cèl·lula en ambients on hi ha una carència d'aquests ions. Aquests sideròfors poden interaccionar amb altres metalls de química similar al Fe^{3+} (Al^{3+} , Ga^{3+} i Cr^{3+}), disminuint la biodisponibilitat i per tant la toxicitat d'aquests (Maier et al., 2000).

Aquest fenomen d'adsorció, s'ha posat de manifest en diversos estudis (Beveridge i Murray, 1976; Bitton i Freihofer, 1978; Morozzi et al., 1986). Altres estudis suggereixen que les membranes extracel·lulars de *Pseudomonas fluorescense* actuen de barrera contra els metalls pesants ja que es detecta un augment de la toxicitat quan no hi ha aquesta membrana (Bauda i Block, 1990). Darrerament, Wang i xiao (2003) varen descriure la capacitat d'adsorció del Cu^{2+} en diferents components de les membranes de *Pseudomonas putida*, demostrant que la capacitat d'adsorció és superior en les membranes aïllades que en cèl·lules intactes.

II.1.2.2 Precipitació de metalls

La biodisponibilitat de les espècies metàl·liques també pot estar influida per metabolits secundaris del metabolisme bacterià. Per exemple, en condicions aeròbiques, *Citrobacter* spp. pot produir fosfat el qual provoca la precipitació de plom i coure, disminuint la seva disponibilitat i per tant, la seva toxicitat. En condicions anaeròbiques, la producció d'altres concentracions de H_2S dels bacteris reductors de sulfat com *Desulfovibrio* també poden provocar la precipitació de metalls. D'altra banda, també es coneix que determinades soques bacterianes tenen la capacitat de reduir les formes tòxiques de Cr(VI) a formes de Cr(III) insolubles que precipiten (Losi et al., 1994; Wang i Xiao, 1995; Smith et al., 2002; Desjardin et al., 2003).

II.1.2.3 Mutació dels sistemes d'entrada

Tot i l'adsorció dels metalls en aquestes membranes bacterianes i a la precipitació d'alguns metalls, alguns d'aquests ions acaben interaccionant amb lligands cel·lulars específics i aconseguixen entrar a l'interior de la cèl·lula.

L'entrada dels ions biodisponibles que no han estat retinguts per aquestes membranes pot produir-se de diferents maneres. Bàsicament, l'entrada dels ions descrits anteriorment pot produir-se mitjançant sistemes d'entrada ràpida i inespecífica, els quals poden estar conduïts per gradients quimiosmòtics o també, mitjançant sistemes específics on l'entrada dels ions es produeix d'una manera específica, lenta i amb un cost energètic (la hidròlisi d'ATP). La mutació d'aquests sistemes d'entrada, els quals en condicions normals permeten l'entrada dels ions a l'interior de la cèl·lula, pot conferir una resistència als bacteris davant determinats metalls pesants. Si es produeix una mutació cromosòmica en els gens que codifiquen per algunes proteïnes que formen part del sistema de transport, es produiran alteracions en els productes d'aquests gens donant lloc a plegaments erronis o expressions incompletes de les proteïnes que formen els sistemes de transport transmembrana. Aquestes alteracions poden produir la inactivació d'aquests transportadors i conferir així, una resistència als metalls pesants (Silver, 1996; Silver i Phung, 1996).

Per exemple, la resistència als ions CrO_4^{2-} descrita anteriorment en fongs *Neurospora Crassa* (Marzluf, 1970), en llevats *Saccharomyces cerevisiae* (Smith et al., 1995) i en el bacteri *Salmonella thyphimurium* (Ota et al., 1971) podria ser deguda a la mutació cromosòmica del sistema de transport sulfat. En condicions normals, els ions cromat poden penetrar dins les cèl·lules amb el mateix sistema transportador proteic que incorpora els ions SO_4^{2-} , és l'anomenat complex sulfat permeasa. El fet que les càrregues i les mides dels ions cromat siguin semblants a les dels ions sulfats, permet que els ions cromat puguin penetrar a l'interior de la cèl·lula a través d'aquest porus. Si es produeix una mutació en els gens que codifiquen per aquest sistema, ni els ions cromat ni els ions sulfat podran penetrar a l'interior de la cèl·lula, conferint certa resistència al bacteri davant els ions cromat.

II.1.2.4 Proteïnes d'estrès i metal·lothioneïnes

D'altra banda, existeixen diversos mecanismes de resistència intracel·lulars, els quals poden intervenir en la tolerància que certs microorganismes tenen davant determinats metalls pesants. Un d'aquests mecanismes és la sobreexpressió de proteïnes d'estrès que ajuda a mantenir l'estructura de determinades proteïnes (Park et al., 2001). La homeostasi que ajuden a mantenir les metal·lothioneïnes bacterianes davant determinats metalls pesants mitjançant la retenció d'aquests metalls pesants també es pot considerar com a un mecanisme de defensa intracel·lular (Silver i Ji, 1994; Maier et al., 2000).

II.1.2.5 Inducció de sistemes d'expulsió

Una altre línia de resistència bacteriana als metalls pesants és la que confereixen els sistemes d'expulsió. Alguns microorganismes tenen plasmidis que codifiquen per aquests sistemes (normalment ATPases) que tenen la funció d'excretar a l'exterior els metalls pesants tòxics de l'interior de la cèl·lula (Nies, 2003; Silver i Ji, 1994).

Aquests mecanismes de resistència són molt específics per a cada un dels metalls pesants i no tots els microorganismes en disposen. Un exemple, seria la inducció de la proteïna ChrA, la qual permet expulsar els ions cromat presents a l'interior de les cèl·lules (Alvarez et al., 1999). Aquest sistema d'eflux de membrana ha estat descrit anteriorment en *Ralstonia metallidurans* (Peitzsch et al., 1998). La inducció de la síntesi de les proteïnes ArsA i ArsB permet expulsar, en aquest cas, ions d'arsenit de l'interior de la cèl·lula (Nies, 2003; Maier et al., 2000).

II.1.3 Reducció bacteriana del Cr(VI)

Un dels mecanismes de detoxificació pel qual alguns microorganismes són resistents al Cr(VI) és la reducció. Tot i que els determinants genètics de la resistència al Cr(VI), com la mutació del sistema de transport sulfat o la inducció de la proteïna ChrA, han estat molt estudiats, els mecanismes de resistència basats en la reducció del Cr(VI) són molt més desconeguts ja que els processos pels quals es produeix la reducció poden ser molt diversos.

D'una banda, existeix la reducció del Cr(VI) directa també anomenada enzimàtica, que és aquella que es produeix gràcies a proteïnes solubles o presents en les membranes cel·lulars i que té lloc intra o extracel·lularment (Horitzu et al., 1987; Myers et al., 2000). D'altra banda, la reducció del Cr(VI) indirecta també ha estat descrita en diverses soques bacterianes. Aquest seria el cas dels bacteris sulfatoreductors, els qual en condicions anaeròbiques excreten com a metabolit secundari, el H₂S, que redueix indirectament el Cr(VI) present al medi (Fude et al., 1994; Sisti et al., 1996).

De fet, la capacitat de reducció de Cr(VI) a formes menys solubles i menys tòxiques de Cr(III) s'ha descrit en diverses espècies bacterianes i sota diferents condicions de treball. Bopp i Ehrlich (1988) varen veure que *Pseudomonas fluorescens* era capaç de reduir el Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III) en condicions aeròbiques i anaeròbiques. Aquesta capacitat va resultar estar codificada per plasmidis. Altres bacteris com *Bacillus subtilis* també redueixen aeròbicament el Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III) (Garbisu et al., 1998). Així mateix, Campos et al (1995) varen demostrar que *Bacillus* sp tenen la capacitat de fer-ho aeròbica i anaeròbicament. Desjardin et al (2003) també varen demostrar la capacitat de *Streptomyces thermocarboxidus* per reduir el Cr(VI). Aquesta capacitat de reducció també es va detectar en cultius de *Streptomyces griseus* (Laxman i More, 2002) i en un estudi portat a terme sobre *Pseudomonas putida*, en el qual es va demostrar que la reducció tenia lloc en el sobrenedant del cultiu (Ishibashi et al., 1990). L'agent reductor dels sobrenedant va ser en aquest cas de naturalesa proteica.

II.1.4 Antecedents

En estudis anteriors, s'ha vist que hi ha determinats metalls pesants i metal·loïdes que no poden detectar-se sensiblement utilitzant l'assaig de toxicitat Microtox. La baixa toxicitat que el crom hexavalent (Villaescusa et al., 1997) o l'arsenat i l'arsenit (Article 3) provoquen sobre el bacteri *Vibrio fischeri* utilitzant l'Assaig Microtox és un exemple clar de la tolerància d'aquest bacteri davant determinats metalls i metal·loïdes. Aquest fet posa en dubte l'eficàcia de l'assaig Microtox per a la detecció de determinats agents agressors. Així doncs, seria necessària la utilització d'altres assaigs de toxicitat més sensibles que poguessin detectar concentracions més petites d'aquests oxianions. D'altra banda, aquesta tolerància també posa de manifest la possible actuació de mecanismes de resistència (Silver i Phung, 1996; Cervantes i Silver, 1992; Cervantes, 1991). Específicament en el cas del Cr(VI), s'ha vist que alguns bacteris poden utilitzar diferents estratègies, entre elles la reducció del Cr(VI) a formes menys solubles i menys tòxiques de Cr(III) (Laxman i More, 2002), la qual cosa podria disminuir la toxicitat d'aquest metall. Tot i el gran nombre d'estudis i la gran diversitat de bacteris utilitzats en aquests, no s'han trobat estudis sobre la capacitat de reducció de Cr(VI) a Cr(III) del bacteri *Vibrio fischeri*. Atès que la reducció de Cr(VI) a Cr(III) és el principal mecanisme de detoxificació d'un ampli

ventall de microorganismes, es va voler estudiar si aquesta capacitat podria ser utilitzada per *Vibrio fischeri* com a mecanisme de resistència contra els ions cromat.

II.2 MATERIAL I MÈTODES

II.2.1 Material i equipament específic

Durant la realització dels experiments s'ha utilitzat el material comú d'un laboratori de microbiologia com és la campana de flux laminar, l'agitador orbital ((Innova TM 4335, New Brunswick Scientific, Co., Inc, Edison, New Jersey, USA)), micropipetes, i altre material descrit anteriorment. També s'ha utilitzat l'incubador Bioscreen (Labsystems, Basingstoke, United Kingdom).

II.2.2 Reactius i productes

Totes les sals i els productes químics utilitzats són de qualitat per anàlisi. En els estudis de viabilitat i creixement, les solucions de Cd(II), Cr(VI) i As(V) varen ser preparades a partir de la dissolució de les sals de $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, H_2AsO_4 i $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en solucions 0.34M de NaCl. Aquestes solucions varen ser ajustades a pH 6.0 amb solucions 0.1M de HCl i NaOH, autoclavades durant 20 min a 121°C i emmagatzemades a 4°C.

En l'estudi de la reducció del Cr(VI), es varen preparar dissolucions mare de Cr(VI) a partir de la dissolució de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ en aigua de qualitat Milli-Q. Així mateix, les solucions de Cu^{2+} varen ser preparades a partir de la dissolució de sal de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ també en aigua de qualitat Milli-Q.

Les solucions de difenilcarbazida per a l'anàlisi espectrofotomètrica de la concentració de Cr(VI) de les mostres es varen preparar de la següent manera: Es varen dissoldre 0.3 g de difenilcarbazide químicament pura (Sigma, St Louis, MO, USA) en 100 ml d'etanol 95%. En paral·lel, es varen preparar 400 ml d'àcid sulfúric d'una concentració de 176 g/L i es barregen ambdós volums. Aquesta dissolució es va mantenir a les fosques, a 4°C. Cal tenir en compte que no es pot conservar més d'un més degut a la seva ràpida degradació.

II.2.3 Medis i tampons

Durant la realització d'aquest estudi, han estat utilitzats diferents medis de cultiu amb diferents objectius. La composició i preparació d'aquests medis de cultiu es descriu a continuació.

Medi de cultiu Sea Water Medium (SWM):

El medi conté 10 g/L d'extracte de carn, 10 g/L de peptona i 20 g/L agar (l'agar, només quan es prepara medi sòlid) de la casa comercial Oxoid LTD (Basingstoke, Hampshire, England) i diferents salts de qualitat per anàlisi per a la preparació de l'aigua de mar artificial (ASW): 28.1 g/L NaCl, 0.77 g/L KCl, 1.6 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.8 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.11 g/L NaHCO_3 , 3.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de Panreac (Barcelona, Spain).

Preparació: L'extracte de carn i la peptona es dissolen en ebullició en 250 ml d'aigua. Aquesta solució s'ajusta a pH 7.8 i es bull durant 10 min i finalment s'ajusta el pH a un valor 7.3. Si es prepara medi sòlid, en aquest punt s'afegeixen 20 g d'agar. En paral·lel, es prepara la ASW la

composició de la qual ha estat descrita anteriorment. Les dues solucions són autoclavades separatament a 121°C durant 20 min i quan es refreden, es barregen els 250 ml del medi orgànic amb 750 ml de ASW.

Medi osmòtic 0.34M NaCl

Es dissolen 20 g NaCl (Panreac) en 1 L d'aigua i posteriorment la solució s'ajusta al pH desitjat amb solucions de 0.1N de NaOH i HCl.

Medi mínim M63 modificat (mM63)

El medi conté 13,6 g/L de KH_2PO_4 , 10 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 20%(w/v), 1 ml de FeSO_4 al 0.1%(w/v), 1 ml de MgSO_4 al 20%(w/v), 3 μM thiamina i també s'afegeixen 20g/L de NaCl (modificació per obtenir un medi d'osmolaritat apropiada per *Vibrio fischeri*). La solució és ajustada a pH 7.0 amb KOH 0.6M i després s'afegeix el ml de MgSO_4 descrit a la composició del medi. Finalment, el medi és autoclavat a 121°C durant 20 min. Aquest medi pot complementar-se amb diferents fonts de carboni com són la glucosa o el glicerol (Tesi doctoral Desjardin, 2002).

Medi mínim Vogel-Bonner modificat (mVB)

El medi conté 20 g/L de K_2HPO_4 , 12 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 1.8 g/L NH_4Cl , 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L d'àcid cítric i també s'afegeixen 20 g/L de NaCl (modificació per obtenir un medi d'osmolaritat apropiada per *Vibrio fischeri*). La solució és ajustada a pH 7.0 amb KOH 0.6M i autoclavada a 121°C durant 20 min. Aquest medi es suplementa amb 7.5 g/L de glucosa (Tesi Doctoral Desjardin, 2002).

II.2.4 Metodologia

II.2.4.1 Soca bacteriana i condicions de cultiu

El bacteri gram negatiu *Vibrio fischeri* (NRRLB-11177), obtingut de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), va ser utilitzat com a organisme prova en els assaigs de toxicitat i de capacitat de reducció. Els cultius es varen fer créixer a 20°C i condicions aeròbiques en un agitador orbital a 130 rpm. El creixement es va seguir mitjançant el recompte de viables i per les variacions de la densitat òptica del cultiu a una absorbància de 600 nm del cultiu. Els medi de cultiu d'aquest bacteri va ser el SWM descrit anteriorment.

II.2.4.2 Avaluació del creixement bacterià

El creixement bacterià es va avaluar mitjançant la determinació de l'absorbància dels cultius a una longitud d'ona de 600 nm. Normalment, les determinacions de l'absorbància es varen realitzar amb l'espectrofotòmetre Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan).

En els assaigs d'inhibició del creixement, el creixement es va determinar mitjançant l'anàlisi de l'absorbància a 600 nm utilitzant el sistema d'assaig Bioscreen (Labsystems, Basingstoke, United Kingdom). El Bioscreen és un incubador que mesura simultàniament els canvis

d'absorbància de 200 mostres, generant automàticament les dades que s'utilitzaran per dibuixar les corbes de creixement (densitat òptica *versus* temps).

II.2.4.3 Avaluació de la viabilitat bacteriana

La viabilitat es va determinar avaluant les unitats formadores de colònies (ufc/ml) d'una mostra en concret i un moment determinat mitjançant el mètode de la gota. Aquest mètode consisteix en fer tres sèries de dilucions de les mostres objecte d'estudi i seguidament dipositar 50 µL de cada una d'elles sobre una placa de petri. Després de 24 hores d'incubació a 20°C, es compten les ufc en aquelles dilucions sembrades on han crescut entre 30 i 300 ufc.

II.2.4.4 Determinació de la concentració de Cr(VI)

La concentració de Cr(VI) va ser mesurada amb el mètode de la Difenilcarbazida (Desjardin et al., 2003). Així, per conèixer la concentració de Cr(VI) de les mostres objecte del nostre estudi, es varen afegir 50 µL de la solució de difenilcarbazida descrita anteriorment en 1 mL de mostra diluïda a la concentració més adequada (per obtenir un valor d'absorbància dins la recta patró). La difenilcarbazida reacciona amb el Cr(VI) formant un complex de color lil·lós que té un màxim d'absorbància a 540 nm. Així doncs, per relacionar l'absorbància amb la concentració de Cr(VI) va ser necessari fer una corba patró amb solucions que contenen entre 0 i 50 µM de Cr(VI). Les mesures d'absorbància es varen realitzar a una longitud d'ona de 540 nm. Cal destacar que abans de fer l'anàlisi, les alíquotes han de ser centrifugades per eliminar les cèl·lules en suspensió que podrien interferir en l'anàlisi.

II.2.4.5 Microscòpia Electrònica de Rastreig (SEM)

Les mostres de bacteris obtingudes per analitzar els canvis morfològics i les alteracions de les seves estructures varen ser tractades de la següent manera: Les mostres de cultiu varen ser centrifugades a 3000 rpm i el *pellet* obtingut va ser rentat dues vegades amb ASW. Seguidament, es va procedir a la fixació de les cèl·lules mitjançant la incubació de com a mínim 48 hores en glutaraldehyd 2.5% en una solució d'ASW (pH 7.0) a una temperatura de 2-4°C. Després d'això, les mostres varen ser osmificades amb una solució d'osmi 1% en ASW (pH 7.0) durant 2 h a 4°C. Seguidament, les mostres varen ser deshidratades amb etanol 50, 70, 90 i 100%. Això es va fer mitjançant la resuspensió de les cèl·lules en 1 ml de les solucions esmentades anteriorment i deixant-les incubar durant 20 minuts a temperatura ambient. L'últim rentat amb etanol al 100% es va fer per triplicat. Finalment, es va fer l'asseccament de les mostres pel mètode del punt crític (amb un aparell Emitech, model K550 sputter coater, Alemanya) i varen ser contrastades amb un capa d'or de 40 nm.

Les observacions es varen fer en un microscopi electrònic de rastreig (Zeiss, model DSM 960, Alemanya). Les imatges es varen enregistrar digitalment i varen ser tractades amb el programa Quarz PCI.

II.2.5 Protocols de treball

II.2.5.1 Avaluació de la toxicitat a nivell cel·lular

Per tal d'avaluar l'efecte de diferents concentracions de metall sobre la viabilitat del bacteri *Vibrio fischeri* o la seva influència en la taxa de creixement, es varen posar en contacte diferents dissolucions de Cd(II), Cr(VI) i As(V) amb cultius exponencials del bacteri. A continuació es descriuen detalladament els tractaments i els protocols de treball seguits per a la realització d'assaigs d'inhibició de la viabilitat i també d'inhibició del creixement.

II.2.5.1.1 Assaigs d'inhibició de la viabilitat

Per tal de portar a terme aquests experiments, es va sembrar el bacteri *Vibrio fischeri* en el medi de cultiu líquid SWM i es va deixar créixer tota la nit a 20°C i amb una agitació de 150 rpm. Quan els cultius varen arribar en fase exponencial (absorbància al voltant de 0.8), es varen centrifugar separatament diverses alíquotes de 50 ml i es va recuperar el pel·let. Seguidament, aquests pel·lets es varen rentar dues vegades amb la solució 0.34M NaCl.

Abans de començar els experiments, es va avaluar l'efecte del medi d'exposició (0.34M NaCl) ajustat a diferents pHs (5.0, 7.0 i 8.0) sobre la viabilitat de *Vibrio fischeri* per tal de conèixer l'efecte d'aquest sense la presència de metalls.

Per a la determinació de l'efecte de diferents metalls pesants, es varen resuspendre els *pellets* en 45 mL de NaCl 0.34M (pH 6.0). En aquest moment, es va avaluar el nombre inicial de bacteris mitjançant el mètode de la gota descrit anteriorment. El resultat obtingut en aquesta mesura es considerarà com a blanc i caldrà que sigui multiplicat pel factor 0.9 ja que el volum en el qual està dissolt el *pellet* és de 45 ml (i no de 50 ml). Seguidament, es varen afegir 5 mL de solució de metalls de la concentració corresponent 10 vegades concentrada (500, 5000, 10000 i 20000 µM). Així doncs, les concentracions finals analitzades varen ser de 50, 500, 1000 i 2000 µM de Cd(II), As(V) i Cr(VI) en una solució de pH al voltant de 6.0. Després d'això, es va avaluar la viabilitat, o sigui, el nombre de bacteris que tenen la capacitat de tornar a dividir-se en condicions normals després de 15 min, 1, 3, 6, 24 i 48 hores d'exposició a les diferents concentracions de metalls. Es varen realitzar tres rèpliques de tots els tractaments analitzats i cada una de les determinacions es va realitzar com a mínim per duplicat.

A partir de les corbes dosi resposta determinades anteriorment es varen avaluar les concentracions efectives, valors EC50, que provoquen un 50% de reducció de la viabilitat del bacteri *Vibrio fischeri*.

II.2.5.1.2 Assaig d'inhibició del creixement

En els assaigs d'inhibició del creixement, es varen realitzar utilitzant el Bioscreen (Labsystems, Basingstoke, United Kingdom), el qual mesura els canvis d'absorbància a 600 nm cada hora

durant un període de temps determinat. Per fer això es varen utilitzar plaques estèrils que contenen 100 pous, en cada un dels quals es varen realitzar diferents assaigs.

En els assaigs d'inhibició del creixement, el creixement es va realitzar seguint el protocol de treball descrit a continuació. Es varen barrejar 175 μL de SWM (20% més concentrat), 5 μL de suspensió bacteriana ($\text{OD}_{600}=0.3$) i 20 μL de la solució de metall objecte del nostre estudi (10 vegades més concentrada). La utilització de medi de cultiu i solucions de metalls més concentrades és deguda a la dilució que pateixen al barrejar-les amb altres productes. També varen analitzar-se controls negatius, en els quals no s'hi va introduir bacteri així com, controls positius on es va introduir aigua en comptes de solució metàl·lica concentrada. En tots els casos obtenim un volum final de 200 μL /pou. Es varen fer com a mínim 3 rèpliques per cada una de les concentracions analitzades.

Les dades generades per aquest aparell es recullen en arxius d'Excel. Les concentracions de metall analitzades en aquest estudi són 0, 25, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 μM de Cd(II), Cr(VI) i As(V).

La determinació de la inhibició del creixement de cada una de les concentracions de metalls objecte del nostre estudi es va fer mitjançant el càlcul de l'àrea existent sota la corba de creixement dibuixada amb les dades d'absorbància. Això es va fer utilitzant la següent equació (Reynolds i Neher, 1997).

$$A_i = \sum_i^{n-1} \left[\left(\frac{\text{OD}_i + \text{OD}_{i+1}}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right] \quad (\text{Equació 13})$$

on OD_i és la densitat òptica d'un pou al moment i , n és el nombre de mesures i t és el temps de mesura. Els resultats es varen expressar com a percentatge d'inhibició comparat amb els controls positius (que no contenen metall). Per fer això, el percentatge d'inhibició per cada una de les concentracions de metalls analitzades es va calcular amb l'equació 2., i.e;

$$I (\%) = \frac{A_o - A_i}{A_o} \cdot 100 \quad (\text{Equació 14})$$

on A_o i A_i són les àrees de sota les corbes obtingudes quan es cultiva el bacteri sense o amb una determinada concentració d'agent agressor (i), respectivament. Les concentracions efectives que causen un 50% (EC50) d'inhibició del creixement varen ser determinades utilitzant el model Probit, el qual diu que la resposta davant de substàncies tòxiques d'una població bacteriana té una distribució Log-Normal (Chen et al., 2004; Van Leeuwen i Hermens, 1996).

II.2.5.2 Avaluació de la capacitat de reducció de Cr(VI)

Per avaluar si el bacteri *Vibrio fischeri* té la capacitat de reduir el Cr(VI) a Cr(III) així com per determinar l'efecte de diferents factors en la seva capacitat de reducció es varen realitzar diferents experiments. A continuació es descriuen els diferents tractaments realitzats.

II.2.5.2.1 Efecte del medi de cultiu

II.2.5.2.1.1 Medi 0.34M NaCl

Es va avaluar la capacitat de reducció de Cr(VI) del bacteri *Vibrio fischeri* en medi 0.34M NaCl. Aquest medi de cultiu inorgànic sense nutrients es va assajar perquè és el medi de l'assaig utilitzat en el bioassaig de toxicitat Microtox.

Per començar, es varen centrifugar 50 mL d'un cultiu de *Vibrio fischeri* en SWM en fase exponencial i una densitat òptica al voltant de 0.8 a una longitud d'ona de 600 nm. Els pellets obtinguts es varen rentar dues vegades amb 0.34M NaCl, es varen dissoldre en 50 ml de 0.34M NaCl (pH 6.0) i s'hi va afegir la quantitat de crom hexavalent necessària per obtenir una dissolució de concentració 50, 100, 250 i 500 μM . Seguidament, aquests cultius es varen incubar a 20°C i agitació constant de 150 rpm i la concentració de Cr(VI) del medi es va analitzar periòdicament (24, 48, 72 i 96 hores). Així mateix, també es va analitzar la concentració de Cr(VI) després de 15, 30, 45 i 60 min per tal d'avaluar la capacitat de reducció del bacteri en els temps d'exposició de l'assaig Microtox.

II.2.5.2.1.2 Altres medis de cultiu

Es va avaluar la capacitat de reducció de Cr(VI) del bacteri *Vibrio fischeri* en diferents medis de cultiu. En un primer assaig preliminar, es varen avaluar 3 medis d'assaig diferents: el medi mínim mM63 suplementat amb glucosa 1g/100mL i glicerol 0.3 g/100mL, el medi mínim mVB i el medi nutritiu SWM.

Per fer això, el *pellet* obtingut a partir de cultius en fase exponencial es va resuspendre en 50 mL del medi de cultiu corresponent. Seguidament, aquests nous cultius es varen deixar aclimatar durant 24 hores i després, igual que en experiments anteriors, es va afegir la quantitat de crom hexavalent necessària per obtenir un cultiu amb una concentració 250 o 500 μM Cr(VI). Concretament, es varen afegir 50 o 100 μl d'una solució concentrada de 250 mM Cr(VI). Finalment aquests cultius es varen incubar a 20°C i en agitació constant de 150 rpm i la concentració de Cr(VI) del medi es va analitzar periòdicament. Totes les anàlisis es varen fer per duplicat.

D'altra banda, també es va avaluar l'efecte de la concentració de diferents fonts de carboni en la capacitat de reducció del bacteri *Vibrio fischeri*. Així, es va avaluar la capacitat de reducció del bacteri en el medi mM63 suplementat amb glucosa i glicerol a una concentració de 0.1, 1 i 10 g/100mL. En aquest cas, la concentració inicial de Cr(VI) analitzada va ser 250 μM . Per fer

això, es varen seguir els mateixos protocols de treball descrits en aquest mateix apartat però modificant la concentració de la font de carboni del medi de cultiu assajat.

La capacitat reductora del medi de cultiu suplementat amb diferents concentracions de glucosa i glicerol i sense l'agent biològic també es va avaluar, serà l'anomenat control abiòtic. Així, es determinarà si el medi de cultiu té, en la seva composició, algun agent amb capacitat reductora.

II.2.5.2.2 Localització de l'activitat reductora de Cr(VI)

Per tal de localitzar l'activitat reductora del bacteri *Vibrio fischeri*, els cultius que varen assolir la reducció total de la concentració de Cr(VI) inicial, varen ser utilitzats per a realitzar els experiments complementaris de localització. Concretament, els cultius estudiats varen ser els que havien estat estudiats en medi mM63+Glucosa 1g/100 mL i mM63+Glicerol 0.3g/100 mL. Així, per tal de determinar si l'activitat reductora de Cr(VI) es troba a la fracció cel·lular o al sobrenedant del medi, els cultius varen ser centrifugats i es varen separar les dues fraccions.

D'una banda, es va recuperar el *pellet*, es va rentar dues vegades amb una solució de 0.34M NaCl i es va tornar a resuspendre en el medi de cultiu fresc corresponent. Seguidament, es va afegir el volum de Cr(VI) necessari per obtenir la mateixa concentració inicial del cultiu en qüestió, essent 250 o 500 μM segons el cas.

D'altra banda, els sobrenedants es varen esterilitzar per filtració amb un filtre de porus 0.2 μM de diàmetre i, igual que en el *pellet*, es va afegir la quantitat de Cr(VI) per obtenir altre vegada la concentració inicial del cultiu en qüestió.

Així mateix, cada una de les mostres anteriorment descrites va dividir-se en dues al·lòquotes, en una de les quals es va afegir una concentració 10 vegades menys concentrada que la concentració de Cr(VI) inicial. Concretament, es va afegir una concentració de 25 o 50 μM de Cu^{2+} per les concentracions de Cr(VI) de 250 o 500 μM , respectivament. Finalment, les diferents mostres es varen incubar a 20°C i una agitació constant de 150 rpm i la concentració de Cr(VI) del medi es va analitzar periòdicament.

II.2.5.2.3 Investigacions sobre la molècula responsable de la reducció del Cr(VI)

Per tal de determinar la naturalesa de la substància(es) responsable(s) de la reducció del Cr(VI) en els sobrenedants dels cultius de *Vibrio fischeri*, cultivats en mM63+Glucosa 1g/100mL es varen fer diversos experiments.

D'una banda, es varen agafar diverses al·lòquotes dels diferents sobrenedants i se'ls hi va fer un tractament tèrmic. Es varen incubar diferents al·lòquotes a 50, 75, 100 i 120°C durant 20 min. Seguidament, s'hi va afegir la quantitat de Cr(VI) necessària per obtenir una concentració de 250 o 500 μM de Cr(VI) i es va mesurar la concentració d'aquest metall periòdicament. Si es tractés d'un agent reductor de tipus enzimàtic, després de l'aplicació d'aquests agents tèrmics, l'activitat reductora seria nul·la o inferior.

D'altra banda, també es varen tractar aquests sobrenedants amb un agent desnaturalitzant, el SDS, el qual desnaturalitza les molècules de tipus proteic. Així doncs, es varen afegir 100 μL d'una solució de SDS 1% en 900 μL de sobrenedant donant a lloc a una solució de 0.1% SDS. Seguidament, s'hi va afegir la quantitat de Cr(VI) necessària per obtenir una concentració de 250 o 500 μM de Cr(VI) i es va mesurar la concentració de Cr(VI) periòdicament. Si es tractés d'un agent reductor de tipus proteic, després de l'aplicació d'aquests agents desnaturalitzants, l'activitat seria nul·la o inferior.

També es va fer un tractament amb proteïnasa K, un enzim el qual degrada proteïnes. Així doncs, es va afegir en una alíquota de sobrenedant aquest enzim per obtenir una concentració de 1 mg/mL de proteïnasa K. Atès que la temperatura òptima d'actuació de l'enzim és a 37°C, es va fer la incubació d'aquesta mostra a 37°C mentre es va portar a terme l'experiment. Seguidament, s'hi va afegir la quantitat de Cr(VI) necessària per obtenir una concentració de 250 o 500 μM de Cr(VI) i es va mesurar la concentració de Cr(VI) periòdicament.

II.3 RESULTATS

A continuació es presenten els resultats obtinguts en aquest estudi en els dos articles científics que s'adjunten a continuació. En un primer article, que actualment està enviat per publicació a la revista *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, es presenten els resultats de l'efecte de Cd(II), Cr(VI) i As(V) sobre la viabilitat i el creixement de *Vibrio fischeri* després de temps d'exposició de 24, 48, 72 i 96 hores a aquests metalls (EC50) i es comparen amb els resultats obtinguts amb l'assaig Microtox. Així mateix, es presenten diverses fotografies obtingudes amb el microscopi electrònic de rastreig on es poden veure les diferents alteracions morfològiques que es produeixen en els bacteris degut a l'exposició als diferents metalls pesants.

Seguidament, es presenta un segon article, aquest enviat per publicació a la revista *Environmental Toxicology and Chemistry*. Aquest article tracta de la capacitat de reducció del Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III) per part del bacteri *Vibrio fischeri*, la qual ajuda a explicar la tolerància d'aquest bacteri davant aquests oxianions. L'efecte de diferents medis de cultiu i altres paràmetres així com la localització i naturalesa d'aquest agent reductor també es discuteixen en aquest article.

Article 4. Fulladosa, E and Villaescusa, I. "Effect of cadmium(II), chromium(VI) and arsenic(V) on long-term growth and viability inhibition assays using *Vibrio fischeri* marine bacteria". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (enviat per publicació).

Chemical Engineering Dept., Universitat de Girona, Avda. Lluís Santaló, s/n.
17071 Girona, Spain.

Email: isabel.villaescusa@udg.es

Abstract.- As a complement to previous results obtained using the standard Microtox[®] acute toxicity test, which is based on rapid decrease of bioluminescence in *Vibrio fischeri* bacteria in the presence of toxicants, the long-term effects of Cd(II), Cr(VI) and As(V) were studied on growth rate and viability of the same biological model. Surprisingly, these poisonous chemicals were found to be not very toxic to this bacteria when measuring their effect on viability or growth. Nevertheless, in the case of Cr(VI), the inhibition viability assay resulted to be more sensitive than Microtox acute toxicity test. Interestingly, it was possible to observe a clear hormesis phenomenon, especially for Cd(II), under the conditions of the viability assay.

Keywords.- Microtox[®] acute toxicity test, bacterial growth and viability, hormesis, morphological analysis, chronic toxicity

Article 5.- Fulladosa, E., Desjardin, V., Villaescusa, I., Gourdon, R.
"Toxic effect and reduction of Cr(VI) in *Vibrio fischeri* bacteria".
Environmental Toxicology and Chemistry (enviat per publicació).

Abstract.- Hexavalent chromium, an industrial pollutant, is much more toxic to eucaryotic cells than to many bacteria. *Vibrio fischeri* bacteria, used as the biological target in the Microtox® toxicity test, show such a resistance to Cr(VI) which could be attributed to the capacity of the bacteria to convert CR (VI) into Cr(III). This reducing capacity depends on culture medium composition, initial concentration of chromium, incubation time and the presence of a carbon source. It also depends on the nature of the carbon source, glucose being more efficient than glycerol his is probably related to differences in bacterial metabolism when given either luose or glycerol. The thermostable Cr(VI)-reducing activity found in the supernatants of *Vibrio fischeri* cultures grown on glucose suggests that, under these conditions, the bacteria release non-proteic reducing substances which have not been identified.

Keyword.- Cr(VI) toxicity, non-enzymatic reduction, bacterial reducing capacity, glucose, glycerol

IV. DISCUSSIÓ

En el capítol primer d'aquesta memòria, es va veure que l'assaig Microtox no era prou sensible per detectar eficientment concentracions febles d'alguns dels metalls analitzats. Així mateix, es va veure que en el cas de l'arsenat, en determinades condicions, no era possible ni tan sols determinar el valor EC50 degut a la manca de toxicitat d'aquest metal·loide. Aquesta manca d'eficiència podria ser deguda als curts temps d'exposició i/o a la utilització d'indicadors inadequats. Aquest fet posa de manifest la necessitat de desenvolupar nous bioassaigs de toxicitat més sensibles que l'assaig Microtox; que utilitzin temps d'exposició més llargs i que analitzin paràmetres ecològicament més rellevants com el creixement o la mortalitat.

Els estudis de toxicitat realitzats utilitzant els assaigs d'inhibició de la viabilitat i del creixement de *Vibrio fischeri* que es presenten en l'Article 4 d'aquest capítol mostren que aquests bioassaigs són més o menys eficients segons el metall analitzat.

El cadmi provoca efectes nocius sobre *Vibrio fischeri* utilitzant qualsevol dels bioassaigs analitzats però a concentracions força elevades. En el cas del cadmi, l'assaig de toxicitat més sensible és l'assaig Microtox. Cal destacar que l'exposició dels bacteris a concentracions molt febles d'aquest metall provoca un efecte d'hormesis, el qual es pot observar tan en els assaigs d'inhibició del creixement com en els assaigs d'inhibició de la viabilitat.

En el cas de l'arsenat, no s'observen efectes tòxics importants en cap dels bioassaigs utilitzats. En els assaigs d'inhibició de la viabilitat, s'observa fins i tot un augment de la viabilitat d'aquests bacteris després de 6 hores d'incubació amb aquest oxianió. Així mateix, els resultats de l'anàlisi morfològica presentats en aquest mateix article mostren que les alteracions produïdes durant les primeres tres hores d'exposició desapareixen després de 6 hores d'exposició. Aquest fet, corrobora els resultats anteriors i posa de manifest la probable existència de mecanismes de resistència, els quals estan encara per determinar. Un dels possibles mecanismes de resistència de *Vibrio fischeri* davant l'arsenat podria ser el transport actiu cap a l'exterior d'oxianions d'arsenit. L'arsenat seria reduït a arsenit per a ser posteriorment excretat a l'exterior utilitzant transportadors intermembrana específics i evitant l'acumulació d'aquests ions tòxics (arsenat i arsenit) a l'interior de la cèl·lula. Els primers assaigs realitzats ens indiquen que el bacteri *Vibrio fischeri* és capaç de reduir el As(V) a As(III), donant indicis que *Vibrio fischeri* possiblement utilitzi aquest mecanisme de resistència.

D'altra banda, l'assaig més sensible per la detecció del cromat és l'assaig d'inhibició de la viabilitat tot i obtenir una resposta a concentracions força elevades i després de 24 hores d'exposició (EC50=799 µM). Utilitzant l'assaig Microtox i l'assaig d'inhibició del creixement, s'obtenen valors EC50>2000 µM quan s'analitzen dissolucions de cromat ajustades a pH 6.0. La tolerància de *Vibrio fischeri* a determinades concentracions de Cr(VI) podria ser deguda a la

capacitat d'aquest bacteri de reduir el Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III). Aquesta hipòtesi inicial ha quedat demostrada en l'Article 5 d'aquest capítol, on es mostra que el bacteri *Vibrio fischeri* és capaç de reduir les formes més tòxiques de Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III). Els resultats presentats en aquest estudi demostren que aquesta capacitat reductora depèn molt de les condicions de treball com la concentració de Cr(VI) inicial, el temps d'incubació, el pH, el nombre de bacteris inicial, entre d'altres. La capacitat reductora del bacteri també depèn molt del seu metabolisme, el qual es pot veure fortament modificat depenent de la composició del medi de cultiu. El metabolisme que *Vibrio fischeri* porta a terme depèn bàsicament de la font de carboni disponible per obtenir energia (la glucosa o el glicerol). Això queda demostrat amb l'aparició de dos mecanismes de reducció de Cr(VI) diferents; un mecanisme enzimàtic lligat a les cèl·lules en els cultius suplementats amb glicerol i un altre mecanisme de reducció no-enzimàtic que es porta a terme en els sobrenedants del cultiu suplementats amb glucosa. Actualment, la molècula que produeix aquesta reducció no enzimàtica en els sobrenedants no es coneix però els primers assaigs indiquen que és el diacetil o algun dels seus derivats. Tot i això, caldria la realització d'experiments complementaris abans de confirmar aquesta hipòtesi.

Capítol III. Línies cel·lulars *in vitro* com a models biològics per a l'avaluació de la toxicitat de metalls pesants utilitzant biomarcadors moleculars.

III.1 INTRODUCCIÓ GENERAL

La utilització de bioassaigs de toxicitat microbians no és suficient per avaluar la toxicitat de metalls pesants i altres substàncies contaminants en el medi ambient. Per determinar d'una manera fiable la nocivitat d'un metall pesant o metal·loïde és necessari utilitzar una bateria de bioassaigs, que utilitzin diferents models biològics com organismes prova. Així mateix, per tal d'extrapolar els efectes d'aquests agents tòxics en humans, és necessari utilitzar models biològics més propers a aquests.

Així doncs, aquest capítol s'ha dedicat a l'estudi de dos models biològics que seran utilitzats per avaluar la nocivitat de metalls i altres substàncies contaminants mitjançant l'anàlisi de biomarcadors moleculars de contaminació ambiental com les proteïnes d'estrès i les metal·lotioneïnes, les quals han estat descrites anteriorment en la introducció d'aquesta memòria.

Els diferents bioassaigs de toxicitat i els models biològics que aquests utilitzen han estat descrits i classificats en apartats anteriors, no gensmenys, abans de començar aquest estudi s'ha volgut establir una classificació d'aquests bioassaigs segons el tipus de material biològic que aquests utilitzen.

III.1.1 Models biològics: classificació segons el tipus de material biològic utilitzat

Els bioassaigs de toxicitat poden dividir-se en 3 categories d'experiments segons el tipus de material utilitzat. Una primera categoria és aquella que utilitza organismes enters. Una segona categoria és aquella que utilitza línies cel·lulars establertes permanentment *in vitro*. Finalment, una tercera categoria d'experiments és aquella que necessita de la preparació d'un cultiu primari de cèl·lules abans de cada experiment ja que aquestes només poden mantenir-se en cultiu durant un temps determinat. A continuació, es descriuen les característiques de cada una d'elles, així com els seus avantatges i inconvenients (Iwama et al., 1998).

III.1.1.1 Organismes enters

Els organismes enters poden utilitzar-se com a models biològics per a l'estudi de la contaminació ambiental. En aquests organismes enters es mesuren paràmetres de creixement o la mortalitat i també paràmetres a nivell molecular com les proteïnes d'estrès en teixits determinats. Un dels avantatges més importants d'utilitzar organismes enters és que els resultats obtinguts donen una informació molt acurada de la toxicitat real de la substància en qüestió sobre el medi ambient i sobre els organismes que hi viuen, evitant els problemes d'extrapolació dels resultats. Nogensmenys, també existeixen inconvenients importants com la interferència de molts factors sobre els resultats obtinguts. L'estrès o les variacions ambientals

causades per diferents paràmetres és superior a les dels cultius cel·lulars. A més a més, en la majoria dels casos és necessària la mort de l'organisme amb els problemes ètics que això comporta (Segner, 1998; Carvalho et al., 2004). Així, per tal de mesurar l'efecte de diversos agressors ambientals poden utilitzar-se organismes molt diversos des de microorganismes (*Vibrio fischeri*), crustacis (*Daphnia magna*) i invertebrats (*Lumbricus terrestris*) fins a vertebrats inferiors (*Sparus sarba*). Una vegada els organismes enters han estat exposats a l'agressió ambiental corresponent, poden utilitzar-se diferents teixits de l'organisme per tal d'avaluar diferents paràmetres.

III.1.1.2 Línies cel·lulars establertes

Les línies cel·lulars establertes poden definir-se com a tipus cel·lular diferenciat que pot mantenir-se en cultiu indefinidament. La utilització de línies cel·lulars establertes té diversos avantatges; es tracta de cèl·lules fàcils de mantenir, uniformes, fàcils d'aconseguir en abundància i que han estat descrites anteriorment com a bons models experimentals per avaluar l'efecte de diferents agressions ambientals. Així, aquestes línies cel·lulars han estat vitals per a l'estudi bàsic dels processos cel·lulars de plegament de proteïnes i les interaccions que es produeixen, entre d'altres fenòmens. D'altra banda, la utilització d'aquestes línies cel·lulars també presenta diversos desavantatges. Per començar, els efectes obtinguts després de l'exposició de les línies cel·lulars establertes a determinades agressions no es poden extrapolar sempre a l'efecte que aquestes mateixes causarien sobre organismes enters. Les línies cel·lulars establertes són cèl·lules no diferenciades o canceroses que en molts casos no representen l'estat metabòlic d'aquestes mateixes cèl·lules *in vivo*. Així mateix, l'estrès és un fenomen que es detecta a nivell de comportament o a nivell fisiològic en els organismes enters, no en una determinada part o teixit cel·lular. La informació aconseguida a partir de les línies cel·lulars pot no donar una visió global del que passa en l'organisme enter. Nogensmenys, l'avaluació dels efectes de determinades agressions sobre aquestes línies cel·lulars són útils per aconseguir una perspectiva general de la resposta cel·lular generada i de la toxicitat de l'agressor en concret. Un gran nombre de línies cel·lulars establertes han estat utilitzades anteriorment per tal de caracteritzar l'efecte sobre el creixement, la inducció de proteïnes d'estrès o altres paràmetres. Línies cel·lulars humanes com la HT29, HepG2 o A549 han estat utilitzades per estudiar l'efecte de diferents d'agressions ambientals mitjançant l'anàlisi de la taxa de creixement i la inducció de l'expressió de proteïnes d'estrès (Delmas et al., 1995, 2000; Gaubin et al., 2000). La línia cel·lular RTG-2 procedent de *Rainbow trout* (Mosser et al., 1986; Kothary i Candido, 1981), la CHSE-214 procedent de *Chinook salmon* (Heikkila et al., 1982), entre d'altres també es varen utilitzar per avaluar la nocivitat de diferents agents agressors mitjançant l'anàlisi de diferents proteïnes d'estrès.

III.1.1.3 Cultius de cèl·lules primàries

Les cèl·lules primàries són aquelles cèl·lules obtingudes d'organismes enters que només poden mantenir-se en cultiu durant un temps determinat. El principal avantatge de les cèl·lules primàries, a diferència de les cèl·lules establertes, és que aquestes cèl·lules conserven el seu estat diferenciat i per tant, les característiques corresponents. D'aquesta manera, representen millor l'estat metabòlic de la cèl·lula en qüestió i per tant, la resposta avaluada després de l'exposició de l'agressor és més fiable. Nogensmenys, per alguns tipus cel·lulars (cèl·lules hepàtiques, cèl·lules renals, etc) és necessari matar l'organisme cada vegada que es vol realitzar un experiment per tal d'aconseguir les cèl·lules desitjades, la qual cosa suposa un desavantatge important dels cultius primaris.

Diversos investigadors han utilitzat aquest tipus de cèl·lules per estudiar agressions d'origen natural com el xoc tèrmic o l'efecte tòxic de substàncies contaminants. Brown et al (1992) varen estudiar l'efecte del xoc tèrmic en cultius primaris de cèl·lules renals de *Pleuronectes americanus* i altres autors com Koban et al (1987) varen estudiar l'efecte d'acimatiació de temperatura en cèl·lules d'hepatòcits de *Ictalurus punctatus*. Així mateix, substàncies contaminants també poden induir HSP70 i MTs en cultius de cèl·lules primàries hepàtiques i renals (Currie i Tufts, 1997; Vijayan et al., 1998).

III.1.2 Descripció teòrica de les tècniques utilitzades.

En aquest capítol, la sobreexpressió de diverses proteïnes d'estrès i metal·lotioneïnes ha estat avaluada sobre dos models biològics diferents, cultius establerts de la línia cel·lular HT29 i cultius primaris de cèl·lules sanguïnes de *Sparus sarba*, després de l'exposició d'aquests a metalls pesants. Atès que aquests experiments han estat efectuats en laboratoris diferents, el protocol experimental de l'anàlisi de les proteïnes d'estrès ha variat considerablement. Tot i això, la metodologia utilitzada és la mateixa, la qual es descriu a grans trets a continuació. Es tracta només d'una visió global dels mètodes utilitzats, ja que el protocol i el material específic utilitzat en cada cas s'especifica en els apartats corresponents.

III.1.2.1 Quantificació de proteïna total: Mètode Bradford.

El contingut de proteïna total d'una mostra abans i després dels diferents tractaments és de gran importància, ja que la sobreexpressió de proteïnes d'estrès (MT i HSPs) s'expressa relativa a una quantitat de proteïna total constant. El contingut de proteïna total de cada una de les mostres obtingudes després dels tractaments aplicats ha estat determinat mitjançant el mètode Bradford. Aquest mètode es basa en el canvi d'absorció que experimenta el colorant Comassie Brilliant blue en resposta a les diferents concentracions de proteïna (Bradford, 1976). Les mostres es dilueixen amb la solució Bradford i una vegada s'ha produït la reacció es llegeix

l'absorbància a 595 nm. La quantificació es basa en una recta patró realitzada a partir de concentracions creixents de la proteïna estàndard albúmina bovina.

III.1.2.2 Electroforesi amb SDS sobre un gel de poliacrilamida (SDS-page)

L'electroforesi SDS-page permet la separació de proteïnes segons el seu pes molecular (Laemmli, 1970). El gel i les mostres contenen SDS (detergent iònic que dóna una càrrega negativa a totes les proteïnes) de manera que la migració no està influenciada per la càrrega, obtenint-se una separació inversament proporcional al pes molecular de la proteïna. La capacitat de separació del gel depèn de la mida dels porus d'aquest (la qual depèn de la seva composició). Una vegada separades les proteïnes de la mostra segons el seu pes molecular, cal que siguin transferides sobre un suport adequat per a la immunodetecció específica amb anticossos. Aquesta transferència de proteïnes es realitza mitjançant l'anomenat Western Blot.

III.1.2.3 Electrotransferència de proteïnes (Western Blot)

En presència d'un camp elèctric, les proteïnes del gel carregades negativament, migren de l'ànode al càtode per ser transferides sobre una membrana de nitrocel·lulosa o PVDF (diflorur de polivinilidè). En aquesta membrana, la qual està en contacte amb el gel i completament impregnada del tampó de transferència, hi quedaran retingudes totes les proteïnes del gel. Una vegada les proteïnes estan retingudes a la membrana, es procedeix a fer una immunodetecció específica de les proteïnes estudiades mitjançant anticossos específics contra les proteïnes objecte del nostre estudi.

III.1.2.4 Immunodetecció

La immunodetecció consisteix en la identificació antigènica de les proteïnes estudiades. Les membranes de PVDF (en el cas de les HSP70) i les membranes de nitrocel·lulosa (en el cas de les MTs), sobre les quals hi ha unides les proteïnes, es posa en contacte amb l'anticòs primari el qual s'uneix amb la proteïna de la qual n'és específic. Seguidament, s'introdueix l'anticòs secundari, que té una gran afinitat per l'anticòs primari. Finalment, aquest segon anticòs, gràcies a l'enzim peroxidasa al qual està conjugat, pot detectar-se fàcilment sobre aquesta membrana. El mètode utilitzat es basa en la quimioluminiscència resultant de l'oxidació de l'anell cíclic del luminol pel peròxid d'hidrogen. Quan la peroxidasa de l'anticòs secundari es posa en contacte amb el seu substrat (luminol), s'excita la peroxidasa i emet llum a una longitud d'ona de 428 nm. Aquesta emissió de llum s'impressiona, després d'una exposició, en el film autoradiogràfic. Després del revelat i la fixació d'aquest film, es poden analitzar les bandes obtingudes i quantificar la densitat d'aquestes mitjançant una anàlisi densitomètrica.

III.1.2.5 Assaig Dot-Blot per la detecció de Metal·lotioneïnes

El mètode de detecció directe de metal·lotioneïnes sobre la membrana de nitrocel·lulosa permet la detecció quantitativa i específica de les MTs presents a la mostra analitzada. Es tracta d'un

mètode en el qual la proteïna és immobilitzada sobre la membrana de nitrocel·lulosa i es detecta específicament amb la utilització d'anticossos contra MT (Heinicke et al., 1992).

III.1.3 Models biològics i línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi

A continuació es presenten els dos models biològics utilitzats en aquest estudi per a l'avaluació de la nocivitat de metalls pesants i altres agents agressors mitjançant l'anàlisi de l'expressió de les proteïnes d'estrès i metal·lotioneïnes abans i després de l'exposició als agents agressors. Nogensmenys, cada un dels models es descriurà extensament en cada una de les parts d'aquest capítol.

A la **primera part** d'aquest capítol s'ha utilitzat una línia cel·lular humana d'origen intestinal, concretament la línia cel·lular HT29 establerta en cultiu *in vitro* per avaluar la toxicitat de diferents agents agressors. D'una banda, s'avaluarà la capacitat potencial d'utilització d'aquest model biològic com a bioassaig per a l'anàlisi de la contaminació ambiental d'una manera més eficient i precoç que altres bioassais actuals. D'altra banda, s'avaluarà la toxicitat de diferents metalls pesants separada i conjuntament amb extractes solubles de fangs de depuradora.

A la **segona part** d'aquest capítol, s'han utilitzat cultius primaris de cèl·lules sanguínies d'un vertebrat inferior, concretament *Sparus sarba* per avaluar l'efecte de solucions per metalls sobre aquest model cel·lular. Els avantatges i desavantatges així com, el seu potencial ús com a bioassaig per a la detecció de la contaminació ambiental es posaran de manifest en aquest capítol.

Primera part.- La línia cel·lular HT29 com a model biològic per a l'avaluació de la toxicitat de metalls pesants i extractes de fangs de depuradora.

Part del treball realitzat a la Universitat Paul Sabatier de Toulouse (França)

III.A.1 INTRODUCCIÓ

III.A.1.1 Descripció del model biològic utilitzat: la línia cel·lular HT29

La línia cel·lular HT29 va ser establerta en cultiu permanent pel doctor J.Fogh (Sloan Kettering Institut for Cancer Research, Rye, N.Y., USA ; Fogh i Trempe, 1975) a partir d'un adenocarcinoma còlic humà. Després, aquesta línia cel·lular ha estat àmpliament estudiada; ha servit de model en diferents línies de recerca relacionades amb el mecanisme glucocídic (Rousset et al. 1980, Denis et al. 1984, Denis-Pouxviel et al., 1987, Franklin et al., 1988, Babia et al., 1989), en la receptivitat hormonal (Laburthe et al., 1980, Couvineau et al., 1985, Cézard et al., 1981, Carpéné et al., 1983, Paris et al., 1985) i la diferenciació cel·lular (Wice et al., 1985). En les condicions estàndard de cultiu, les cèl·lules HT29 resten indiferenciades i fortament glucolítics però segons les condicions de cultiu pot ser induïda una diferenciació de tipus intestinal caracteritzada per l'aparició d'unions estretes i per un augment de les activitats enzimàtiques (Zweibaum et al., 1985, Pinto et al., 1991, Wice et al., 1985, Viillard et al., 1986). En aquesta línia cel·lular, es poden analitzar diversos paràmetres per tal d'avaluar la resposta a nivell cel·lular i molecular davant d'una determinada substància contaminant (Delmas et al. 1995, 1998). A nivell cel·lular, l'efecte d'un determinat agent agressor, pot avaluar-se mitjançant l'anàlisi de la capacitat de divisió i la viabilitat de les cèl·lules en cultiu. Amb les dades que s'obtenen, es poden determinar les corbes dosi-resposta, les quals ens donen informació sobre l'efecte a baixes i elevades concentracions i sobre el tipus de patró de toxicitat. A més a més, els paràmetres a nivell cel·lular ajuden a entendre i complementen els resultats que s'obtenen a nivell molecular. Així mateix, a partir d'aquestes corbes, es pot determinar la concentració llindar (EC20) a partir de la qual comença a observar-se un efecte perjudicial significatiu de la població cel·lular (20% de mortalitat) i la concentració EC50, concentració a partir de la qual el 50 % de la població cel·lular mor. A nivell molecular, es pot determinar la sobreexpressió de proteïnes d'estrès i metal·lotioneïnes, després de l'exposició dels cultius cel·lulars a les substàncies contaminants. La detecció de la sobreexpressió d'aquest biomarcador podria utilitzar-se per detectar precoçment les agressions produïdes per aquestes substàncies nocives. Tal i com s'ha descrit anteriorment, tant les proteïnes d'estrès com les metal·lotioneïnes, han estat utilitzades anteriorment per a la detecció de contaminació ambiental (Delmas et al., 1995, 1998; Croute et al., 2000).

En aquest estudi, cultius *in vitro* de la línia cel·lular HT29 han estat utilitzats per avaluar la nocivitat de metalls pesants i fangs de depuradora conjunta i separadament, així com altres substàncies contaminants.

III.A.1.2 Estesa de fangs de depuradora en sòls agrícols

Els fangs de depuradora, també anomenats biosòlids, són principalment generats durant el procés de tractament d'aigües residuals domèstiques. Aquests fangs, estan formats bàsicament de biomassa orgànica i nutrients (nitrogen, fòsfor, potassi) però també poden contenir constituents potencialment tòxics com organismes patògens, metalls pesants, compostos orgànics sintètics, entre d'altres.

Aquests fangs són el residu d'un procés necessari per evitar la contaminació del medi ambient però, a la vegada, la seva destrucció suposa un problema ambiental. Algunes aplicacions d'aquests fangs no són ambientalment correctes i fins i tot poden provocar problemes a curt i llarg termini. L'enterrament d'aquests fangs genera fonts de contaminació ja que es concentren grans quantitats de matèria orgànica que a la llarga poden provocar problemes ambientals. Les incineradores, correctament construïdes per prevenir la contaminació de l'aire, són cares, així com l'assecat dels fangs per que aquests puguin ser cremats. Una altre aplicació, cada vegada més utilitzada, és l'estesa de fangs en sòls agrícols i boscos.

La utilització d'aquests fangs com a fertilitzants en sòls agrícols és l'aplicació més atractiva, ja que el fang actua com a font de nutrients degut al seu gran contingut en matèria orgànica. La major part del nitrogen en els fangs està lligat a la matèria orgànica, la qual pateix canvis químics i va alliberant lentament aquest nitrogen fent que esdevingui disponible per les plantes. Tot i això, els riscos associats a l'aplicació d'aquests fangs en sòls han estat tema de polèmica els darrers anys. Aquests fangs cal que estiguin correctament processats per reduir la quantitat de patògens fins a nivells acceptables. Així mateix, les concentracions de metalls pesants i altres substàncies contaminants que aquests puguin contenir han de ser baixes. Un augment de la concentració de metalls pesants en aquests fangs de depuradora pot donar lloc a l'augment dels contingut d'aquests metalls en sòls agrícols (Goldstone et al., 1990; Gibs i Angelidi., 1988). Aquest fet provoca una certa preocupació sobre el potencial tòxic que aquests metalls poden provocar en els cultius de sòls on s'utilitzen fangs de depuradora com a adobs. Aquests, han d'estar estesos en els sòls amb les taxes agronòmiques correctes determinades a partir de l'anàlisi de les deficiències de nutrients del sòl en qüestió i de la composició del fang de depuradora. Una estesa excessiva de fangs de depuradora en el sòl agrícol podria suposar un problema ambiental si el control d'inoqüitat d'aquest fang abans de l'estesa no és estricte.

Tot i que la determinació total dels metalls que contenen els fangs pot donar molta informació sobre els nivells de contaminació potencial que generen, no hi ha criteris suficients per estimar el seu efecte biològic. És la forma química del metall en el fang la que determina la capacitat de mobilització i el seu comportament en el medi ambient. És important tenir en compte que el comportament dels metalls depèn de la química de l'aigua. La salinitat és un dels factors a tenir en compte ja que les sals a altes concentracions poden crear una competència entre cations i

metalls pels llocs d'unió. Un disminució del potencial redox també pot modificar la composició dels complexos metàl·lics els quals s'alliberen en aigua. Tot i això, el factor més important és el pH, ja que una disminució del pH pot dissoldre els complexos carboni-metall alliberant ions metàl·lics en l'aigua (Zufiarre et al., 1998).

Així doncs, per tal d'avaluar la inoqüitat dels fangs de depuradora abans de ser estesos en sòls agrícoles, serà necessària la determinació del contingut total de metall existent. Així mateix, també serà necessari la utilització d'assaigs biològics.

III.A.1.3 Antecedents de l'estudi

La toxicitat de fangs de depuradora ha estat avaluada per diferents autors, utilitzant diferents bioassaigs i diferents paràmetres de toxicitat. Singh et al (2003) varen avaluar l'impacte de l'estesa de fangs de depuradora, conclouent que aquests podien tenir un impacte perjudicial en el medi ambient. Altres estudis afirmen que no hi ha una evidència de l'acumulació en sòls de substàncies contaminants potencialment tòxiques que els fangs de depuradora puguin contenir (Kress et al., 2004). Nogensmenys, estudis de camp realitzats amb els cargols *Helix aspersa* demostren que existeix una transferència de metalls des dels sòls tractats amb fangs que contenen metalls pesants fins a aquests organismes. Així doncs, aquests organismes podrien ser utilitzats com a eina de camp per avaluar la biodisponibilitat, capacitat de transferència de metalls a la biota i de la toxicitat de fangs de depuradora. L'efecte de l'estesa de fangs de depuradora també ha estat avaluada mitjançant l'estudi de les comunitats d'invertebrats en les àrees tractades amb fangs i amb fangs que contenen metalls (Cole et al., 2001).

Tot i aquests estudis de camp, també es necessiten bioassaigs que avaluin la toxicitat d'aquests fangs d'una manera ràpida i abans que aquests siguin estesos en sòls agrícoles. Amb aquest objectiu, Crouau et al (2002) varen desenvolupar un test per determinar la toxicitat d'aquests residus, el qual utilitza la col·lembola *Folsomia candida* com a organisme indicador. Un altre bioassaig de toxicitat, el qual avalua l'efecte dels fangs de depuradora i els metalls que conté, utilitza els ciliats *Colpoda steini* com a organismes prova (Campbell et al., 1997).

Tot i els diversos assaigs de toxicitat descrits anteriorment, per avaluar l'efecte d'aquests fangs en la salut pública, també seria important utilitzar models biològics més propers als humans. Cultius cel·lulars humans establerts *in vitro* podrien donar una idea més aproximada del possible efecte d'aquests fangs en humans.

Diversos tipus de cultius cel·lulars *in vitro* han estat utilitzats anteriorment per avaluar d'una manera ràpida, eficaç i precoç la toxicitat de determinats metalls pesants o altres substàncies contaminants. S'han utilitzat des de línies cel·lulars d'insectes (Braeckman et al. 1997), de teleostis (Schlenk i Rice, 1998) o de rates (Riley et al., 2003; Bauman et al., 1993) fins a cultius de cèl·lules humanes. Concretament, Delmas et al (1995, 1996, 1998) varen utilitzar cultius *in vitro* de cèl·lules humanes intestinals (HT29), hepàtiques (HepG2) i pulmonars (A549) per

avaluar la toxicitat de metalls pesants (i.e. cadmi, níquel o cromat) i altres substàncies contaminants (etanol, propanol, substàncies aromàtiques) a nivell cel·lular i molecular. Així mateix, Croute et al (2000) varen estudiar l'efecte d'exposicions a cadmi en la sobreexpressió de HSP72 i MTs en la línia cel·lular humana HepG2. Gaubin et al (2000) varen estudiar la sobreexpressió de HSP70, HSP72 i HSP27 després de l'exposició del mateix agent agressor sobre aquesta mateixa línia cel·lular. Altres línies cel·lulars humanes, concretament de ronyò, també han estat anteriorment utilitzades per estudiar la inducció de HSP70 després d'exposicions de cadmi o arsenit (Somji et al., 2002) o la inducció de MTs després d'exposicions de cadmi, mercuri, zinc o bismut sobre aquesta mateixa línia cel·lular (Rodilla et al., 1998). Així doncs, la nocivitat dels fangs de depuradora abans de la seva estesa en sòls podria analitzar-se utilitzant alguna d'aquestes línies cel·lulars descrites anteriorment ja que la seva efectivitat com a model biològic per a la detecció de toxicitat ha estat anteriorment demostrada.

III.A.2 MATERIAL I MÈTODES

III.A.2.1 Material i equipament específic.

Els experiments d'aquest capítol es varen portar a terme al "Laboratoire de Biologie cellulaire et pollution" de la Université Paul Sabatier de Toulouse.

En aquest laboratori es va utilitzar el material general d'un laboratori bioquímic i de biologia cel·lular/molecular. Es varen utilitzar: tubs de plàstic estèrils, tubs de vidre, guants de làtex, paper de parafilm, tubs Eppendorf 1.5 ml, agitadors magnètics (Rotamag C10), Vortex (bioblock scientific), autoclau (Ferte), Centrífuga (Laborzcentrifugen 3K10 Sigma), Nevera 4°C, Sonicador (VibraCell, Bioblock scientific), Balança (Mettler P100), Balança (Sartorius 2474), pHímetre (Bioblock Scientific), Plataforma mòbil, Xeringues amb adaptador a filtres estèrils 0.22 µm (Nunclon), Microcubetes d'espectrefotòmetre (Kartell, 5 ml), Bany maria (JULABO 13A), Termòmetre (JULABO), flascons 250 ml (GREIMER), Plaques de petri 35x10 mm (EASY GRIP™), Plaques de 24 pous (NUNCLON™), Pipetes de vidre (1, 5, 10 ml), Pipetes serològiques de plàstic estèrils (FALCON 1, 5, 10 ml).

L'equipament específic per a cultiu cel·lular, quantificació proteica i immunodetecció de proteïnes d'estrès s'especifica a continuació:

Pel cultiu cel·lular

Microscopi òptic invers, WILL CK OLYMPUS; Micropipeta automàtica, BIOHIT PROLINE (0.5-10µl, 10-50µl, 50-200µl, 200-1000µl); Cambra de flux laminar, ADS Laminaire; Estufa, IG150 JOUAN; Diòxid de carboni, AGA per l'estufa; Freezing point osmometer, Beckman.

Per la quantificació cel·lular o proteica

Espectrefotòmetre, Anthalíe Data, SECOMAN; Citòmetre, Coulter electronics counter, COULTER^RZ1, COULTRONICS, France.

Per la detecció de proteïnes d'estrès.

Electroforètic Bioblock system ; plaques, espaiadors,...etc; Electroforesis power supply PS 304, APELEX; Semi-dry transfer cell. TRANS-BIORATR SD, Power pac 200; Membrana de transarència de nitrocel·lulosa, (talla dels porus 0.45 µm) MICRON; Paper Cromatogràfic, 1mm WHATMAN; Film autofotogràfic, AMERSHAM; Revelador GEVAMATIC 60; ECL, BIOTECH; Densitòmetre, Bioblock Scientific acoplat a un processador.

III.A.2.2 Reactius i productes

Les solucions de metalls (Cd, Cr, Pb, Ni, Zn i Cu de Merck) utilitzades per la preparació de les dissolucions dels experiments de toxicitat eren de concentració 1000 mg/L i estaven dissoltes en una solució d'àcid nítric 0.5 mol/L. Totes les sals inorgàniques utilitzades en la preparació de solucions són de qualitat per anàlisi.

També varen utilitzar-se productes específics com: Serum Fetal Boví, GIBCO BRL, South America. Ref. 10270-098: Els flascons de 50 ml de serum es conserven estèrils a -20°C . Abans de la utilització cal (1) Descongelar a temperatura ambient i (2) Descomplementar (incubar durant 30 min al bany-maria a -55°C); Gentamicina, Sigma. Els anticossos utilitzats en aquest estudi es presenten a la Taula 3.

Taula 3. Anticossos utilitzats per a la detecció de HSP72 i i MTs en cultius *in vitro* de la línia cel·lular HT29.

Anticossos primaris	
HSP 72i	Ref. SPA 810, Stressgen biotechnologies, Canadà. Anticòs monoclonal de ratolí contra la forma induïble HSP72i
MTs	DAKO-MT E9 anticòs monoclonal de ratolí contra metal·lothioneïnes
Anticòs secundari	
Ref.2554, Sigma Anti-IgG de ratolí conjugat amb peroxidasa.	

III.A.2.3 Medis i Tampons

El medi de cultiu orgànic Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM) i el medi inorgànic Hank's Balanced Salts Solution (HBSS), GIBCO BRL varen ser utilitzats com a medi de cultiu i d'exposició respectivament, la composició i preparació dels quals es descriu a l'Annex 2 .

Altres solucions pel cultiu i la quantificació cel·lular varen ser la tripsina, tripsina-EDTA, PBS, àcid tricloroacètic 50%, àcid acètic 1%, solució de sulforodamina B, trizma base 10 mM, o la solució de treball Bradford.

Per la detecció de proteïnes d'estrès també es varen utilitzar diverses solucions o tampons: Persulfat amònic 10 %, Lower Gel buffer x 4 (amortidor de gel separador), Upper Gel buffer x 4, (amortidor de gel apilador), acrilamida, temed, tampó de càrrega, tampó de Migració, tampó de transferència, tampó W, tampó de rentat 2, tampó PBS-etanolamina 50 mM, Roig de Panceau. Totes aquestes solucions també han estat descrites a l'Annex 2.

III.A.2.4 Metodologia

III.A.2.4.1 Optimització dels protocols de treball

Els protocols de treball utilitzats en aquest estudi havien estat estandarditzats en treballs anteriors. Al "Laboratoire de biologie cellulaire et pollution" de la Universitat Paul Sabatier on es va realitzar aquest treball, fa anys que utilitzen cultius cel·lulars *in vitro* i treballen concretament amb la línia cel·lular HT29. Per tant, el manteniment dels cultius, els mètodes de quantificació proteica i procediments generals utilitzant aquesta línia cel·lular es varen realitzar tal i com es va fer en estudis anteriors. Així mateix, el protocol a seguir per detectar la sobreexpressió de proteïnes d'estrès i MT en la línia cel·lular HT29 també havia estat posat a punt. A continuació, es descriuen els protocols de treball específics utilitzats en aquest treball.

III.A.2.4.2 Cultiu i manteniment de la línia cel·lular HT29

Les cèl·lules HT29 es cultiven en flascons de 25 cm³ en el medi de cultiu Dubbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de Gibco amb una concentració del 5% de sèrum fetal boví i s'incuben a 37°C en una atmosfera humida saturada de vapor d'aigua al 5% de CO₂. El medi DMEM es suplementa amb l'antibiòtic gentamicina per disminuir el risc de la contaminació bacteriana.

El protocol de rèplica comença amb l'aspiració del medi de cultiu. Seguidament, es fa un rentat de la capa cel·lular adherida al flascó amb la solució de tripsina-EDTA per eliminar el sèrum que inhibeix l'acció de la Tripsina. Després d'això, es realitza una incubació amb 4 mL d'aquesta solució a 37°C per desenganxar el tapis cel·lular, s'afegeixen 6 mL de medi de cultiu i es fan desprendre les cèl·lules adherides a la superfície tot i homogeneïtzant la mostra amb la pipeta per tal de dissociar les cèl·lules que formen agregats. A continuació s'introdueix una alíquota de la suspensió cel·lular en un flascó amb 15 cm³ del medi de cultiu DMEM i s'incuba fins a obtenir un teixit confluent o fins al moment de realitzar l'experiment. Els subcultius es realitzen dues vegades per setmana i el medi es renova cada 48 h. Cal treballar sempre en condicions estèrils, sota una cambra de flux laminar.

Aquesta línia cel·lular pot conservar-se durant anys per crioconservació en nitrogen líquid. Per tal d'inactivar-les i reactivar-les adequadament i aconseguir el màxim de supervivència és necessari el seguiment del següent protocol.

El protocol d'inactivació de HT29 utilitza la congelació a -196 °C però abans, és necessari un tractament de la suspensió cel·lular. Després de desenganxar les cèl·lules del seu suport utilitzant el Tampó PBS-Tripsina-EDTA es transfereix la suspensió cel·lular al tub de centrifugació. Es centrifuga durant 5 min a 2000 rpm i s'elimina el sobrenedant. A continuació, es resuspèn el *pellet* obtingut en el medi de cultiu DMEM 20% sèrum i 8% DMSO (2 mL per 3·10⁶ cèl·lules). Es transfereixen diferents alíquotes de la solució als criotubs. Es posen 30 min a 4°C, 1 h a -20°C i finalment una nit a -80°C. Finalment es conserven en nitrogen líquid a -196°C. En cas de necessitar cèl·lules viables ràpidament, també es poden conservar algunes alíquotes a -80 °C per tal d'aconseguir una activació cel·lular més ràpida.

El protocol d'activació s'inicia amb la descongelació de la suspensió cel·lular, emmagatzemada a -196 °C al bany maria a 37°C. Després d'introduir 1 mL de la suspensió cel·lular en un flascó de 5 mL, s'afegeixen 3 mL del medi DMEM 30 % de sèrum. Cal substituir aquest medi de cultiu pel medi DMEM 5% de sèrum en el moment en què les cèl·lules estan enganxades al suport. Finalment, es resembra el flascó per obtenir les rèpliques necessàries. La taxa de supervivència és normalment del 30%.

III.A.2.4.3 Quantificació proteica pel mètode Sulforodamina B (SRB)

L'avaluació de la taxa de proliferació o viabilitat cel·lular després de diferents tractaments es va realitzar utilitzant el mètode de la sufrodamina B descrit a continuació.

Durant una exposició a agents tòxics, les cèl·lules mortes es desenganxen del suport on estan unides però les vives continuen adherides. Així doncs, el nombre de cèl·lules supervivents es quantifica mesurant la quantitat de proteïna per superfície (en aquest cas el pou de la placa Nunclon). S'observa una relació lineal entre la quantitat de proteïna i el nombre de cèl·lules que resten adherides. Es tracta del mètode descrit en el treball de Skehan et al (1990) modificat posteriorment per Delmas (Delmas et al., 1995).

Per començar, es realitza la fixació cel·lular per aconseguir una conservació del material biològic fins al moment de la coloració i quantificació. Per fer això, s'afegeixen 250 µL/pou de TCA 50% fred i es manté durant 1 h a 4°C. Per tal d'eliminar completament el TCA 50%, s'aspira aquesta solució i es renten els pous 3 vegades amb aigua destil·lada abans d'emmagatzemar les plaques a temperatura ambient o continuar amb la coloració. Seguidament, es realitza la tinció de proteïnes: s'afegeixen 250 µL de solució SRB 4% durant 15 min i seguidament s'elimina aquest colorant i es fan 3 rentats amb l'àcid acètic 1%. A continuació, es solubilitza el colorant SRB que continua unit a les proteïnes de les cèl·lules adherides al suport amb 1 mL del Tampó Tris Base i s'homogeneïtza fins a dissoldre'l completament. Per acabar, es pren una mostra de 100 µL per fer una dilució 1/20 amb el mateix tampó i es llegeixen les absorbàncies. La lectura de la densitat òptica a 564 nm es realitza amb l'espectrofotòmetre, on hi ha establerta una recta patró amb la qual es poden extrapolar el nombre de cèl·lules a partir de l'absorbància obtinguda.

III.A.2.4.4 Quantificació proteica pel mètode Bradford

Una vegada finalitzada l'exposició a l'agent l'agressor descrit posteriorment, es segueix el següent protocol per tal de determinar la concentració de proteïnes total per a realitzar posteriorment la detecció de HSP70 i MTs.

Les plaques de petri amb el material biològic adherit tractades es congelen a -4°C per aconseguir una conservació del material biològic fins al moment de la quantificació proteica. El teixit cel·lular de la placa de petri tractada es resuspèn amb el tampó PBS utilitzant una mànega de plàstic estèril i s'introdueix la suspensió cel·lular a l'interior d'un eppendorf. Cal sonicar aquesta mostra durant 10 segons als ultrasons i seguidament pot conservar-se a -20°C fins a l'hora de l'anàlisi.

La quantificació de proteïna total s'inicia amb la digestió de 100 µL de la suspensió cel·lular anteriorment esmentada amb 900 µL de NaOH 0.1N durant durant almenys 1 h a temperatura ambient. Finalment, les mostres es dilueixen amb la solució Bradford de treball i es llegeix la densitat òptica a 595 nm amb l'espectrofotòmetre al cap de 20 min per assegurar que la reacció colorimètrica hagi tingut lloc. Cal destacar, que en aquest tipus de mostra no és necessària una dilució abans de l'addició de la solució Bradford degut a que no existeix un gran contingut proteic. En cas de l'obtenció de coloracions massa intenses, caldria fer una dilució de la mostra

abans d'afegir el colorant. Igual que en mètodes anteriors, la quantitat de proteïnes corresponent a l'absorbància mesurada es calcula gràcies a una corba patró realitzada a partir de concentracions creixents d'albumina bovina.

III.A.2.4.5 Avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès

III.A.2.4.5.1 Electroforesi amb SDS sobre un gel de poliacrilamida

Les mostres de teixit cel·lular conservades a -20°C es dilueixen en una proporció 1:1 amb el tampó de càrrega i s'incuben durant 5 minuts a 100°C per aconseguir la desnaturalització de les proteïnes de la mostra. Seguidament, es carrega un volum adequat de mostra (volum necessari per obtenir $25\ \mu\text{g}$ de proteïna total segons la quantificació pel mètode Bradford) a les butxaques del gel electroforètic d'un 12% d'acrilamida. Gràcies al tampó de migració pot aplicar-se una diferència de potencial de 250 V i un corrent de 18 mA/gel. En aquest cas, gràcies a la mida del gel electroforètic, es deixen migrar les mostres a través del gel durant 3 h a temperatura ambient. Cal tenir en compte la formació de bombolles d'aire a la part inferior del gel i les fuites de tampó, les quals podrien afectar a la migració electroforètica. Els tampons, composició i preparació de gels electroforètics es descriuen a l'Annex 2.

III.A.2.4.5.2 Electrotransferència de proteïnes (Western Blot)

Després de la separació electroforètica per pes molecular, es recupera el gel i s'equilibra el seu pH amb el tampó de Transferència durant 30 min. Seguidament, es prepara el sistema format per 3 fulls de paper Whattman, una membrana de nitrocel·lulosa $0.45\ \mu\text{m}$ (Micron), el gel, i tres fulls més de paper Whattman. S'equilibren tots ells amb el mateix Tampó de Transferència durant 1 h. Es prepara el sandwich en aquest mateix ordre i es procedeix a la transferència de proteïnes amb el sistema Semi-dry Transfer Cell a una diferència de potencial de 25 V durant 30 min i una vegada acabat es tenyeix la membrana amb el colorant Roig de Panceau per verificar si la transferència ha estat correcta.

III.A.2.4.5.3 Immunodetecció de HSP70

S'incuba la membrana de nitrocel·lulosa en el tampó de saturació durant 1 h per saturar els punts d'adsorció lliures de la membrana. Tot seguit, s'incuba la membrana durant almenys 2 h amb l'anticòs primari diluït a la proporció adequada amb el tampó de saturació per tal d'afavorir la unió específica d'aquest amb les proteïnes. Després, es realitzen una sèrie de rentats successius amb el tampó W (2 rentats de 5 min), el Tampó de rentat 2 (durant 15 min) i una altra vegada el tampó W (2 rentats de 5 min) per eliminar els anticossos que no han estat fixats a la membrana. A continuació, s'incuba a temperatura ambient i sense llum durant 2 h amb l'anticòs secundari, el qual es dilueix en el tampó W + 3% de llet. Els mateixos rentats successius fets anteriorment també es realitzen després de la incubació amb l'anticòs secundari i abans del revelat. Després, s'introdueix la membrana en la solució ECLTM (5 ml de cada una de

les solucions 1 i 2) que és substrat de la peroxidasa durant 6-7 min. Es deixa assecar i es procedeix a fer el revelat. Finalment, es posa en contacte amb un film autoradiogràfic, de manera que els fotons impressionin el film sensible a la llum.

Per tal de determinar la dilució d'anticòs primari i secundari més adequada per detectar correctament la proteïna desitjada es varen realitzar diversos experiments preliminars. Després de diversos assaigs es va decidir utilitzar una dilució 1:40000 per l'anticòs primari i 1:20000 per l'anticòs secundari en el cas de la detecció de HSP72i.

III.2.A.4.5.4 Assaig Dot-Blot per la detecció directa de Metal·lotioneïnes

Es dipositen 5 µg de proteïna total de la mostra sobre una membrana de nitrocel·lulosa. Es deixa assecar uns minuts i es realitza una fixació durant almenys 1h amb gluteraldehid 2.5 %, amb les mesures de seguretat que comporta treballar amb aquest producte (guants, mascareta...etc). Gràcies a aquest conegut fixador les proteïnes són menys solubles i resten adherides més fortament a la membrana. Seguidament, es renta la membrana amb PBS (2 vegades durant 5 minuts) i durant 15 minuts amb PBS-etanolamina, el qual actua com a tampó mantenint l'estructura terciària d'aquestes proteïnes. A continuació, es segueix el protocol establert d'immunodetecció de l'apartat III.1.2.4 fins a finalitzar-lo, utilitzant en aquest cas, un anticòs específic contra les MTs. Concretament, es va utilitzar una dilució 1:5000 per l'anticòs primari i 1:10000 per l'anticòs secundari.

III.A.2.5 Protocols experimentals

III.A.2.5.1 Procedència de les mostres de fang

En el present estudi es van analitzar els extractes solubles de fangs de depuradora obtinguts de diverses depuradores de la Regió Midi-Pyrénées, França, la localització de les quals es pot veure a la Figura 5. De la mateixa manera, el tractament aplicat als fangs de cada una d'elles abans de la seva estesa en sòls agrícols queda reflectida a la Taula 4.

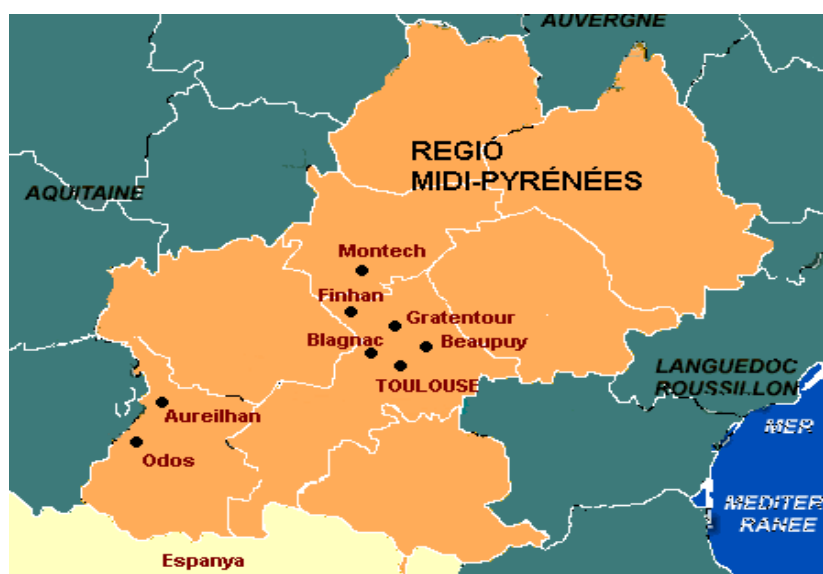


Figura 5 Situació geogràfica de les depuradores de la Regió Midi-Pyrénées estudiades

Taula 4 Característiques principals de les depuradores de la Regió Midi-Pyrénées seleccionades en l'estudi.

Depuradora	Característiques de les depuradores
Toulouse (A)	Xarxa separativa – Residus domèstics i industrials. Fangs deshidratats per centrifugació. Estabilitzats per calor i estesos.
Blagnac (B)	Xarxa separativa – Residus domèstics i industrials. Fangs deshidratats per centrifugació. Estabilitzats per calor i estesos.
Aureilhan (C)	Xarxa separativa a 90%- Residus domèstics i un d'industrial. Fangs assecats per filtre-pressió i estesos.
Gratentour (D)	Xarxa separativa – Residus domèstics. Fangs líquids enviats a la depuradora de Ginestous.
Montech (E)	Xarxa unitària – Residus domèstics. Fangs espesseïts en sils i estesos.
Odos (F)	Xarxa separativa – Residus domèstics. Fangs assecats i escalfats.
Beaupuy (G)	Xarxa domèstica – Residus domèstics. Fangs líquids enviats a Ginestous.
Finhan (H)	Xarxa separativa – Residus domèstics. Fangs espesseïts en sils i estesos.
Seissan (I)	Xarxa unitària – Residus domèstics i d'escorxador. Fangs assecats en llits d'assecat i enviats a Auch.

Les lletres especificades a la dreta del nom de la depuradora fan referència a la classificació dels fangs presentada a l'Article 6.

III.A.2.5.2 Caracterització dels fangs i preparació dels extractes solubles

A continuació, es descriu el procediment que es va seguir per obtenir els extractes solubles de les mostres de fangs recollits de les diferents depuradores objecte del nostre estudi.

Les mostres de fangs líquids varen ser acidificades amb àcid clorhídric (pH 3) i les mostres pastoses varen ser barrejades amb aigua ultrapura amb una relació de 10 g de matèria seca en

100 mL d'aigua acidificada amb aquest mateix àcid. L'acidificació és necessària per dissoldre el màxim de metalls, els quals es troben fixats a la part sòlida dels fangs o que precipiten a pH alcalí. Després de 24 h d'agitació, les mostres es van centrifugar (1 h a 18000 rpm), el sobrenedant es va ajustar a pH 7.2 i les solucions es varen esterilitzar per filtració amb un filtre de porus 0.22 µm abans de ser congelades. Finalment es va corregir la pressió osmòtica, en cas que fos necessari, fins a obtenir una osmolaritat de 330 mOsm per tal d'evitar el xoc hiperosmòtic que perjudicaria les cèl·lules.

Paral·lelament i per tal de conèixer el contingut de metalls pesants que contenen cada una de les fraccions de les mostres, part solubles i insolubles, aquestes es van analitzar per ICPMS. Aquestes anàlisis han estat realitzades per Ecole Nationale Supérieur de Chimie de Toulouse. El contingut de cada un dels metalls, determinat en la fracció insoluble del fang, es mostra a la Taula 5. Amb aquesta anàlisi es va demostrar que els metalls presents en fangs de depuradora estan fixats a la matèria orgànica o en argiles i silicats formant espècies insolubles i que per tant, no intervenen en l'efecte biològic generat per l'extracte soluble. El contingut de metalls en l'extracte soluble és inferior als mínims detectables.

Taula 5 Concentració de cada un dels metalls analitzats determinada en la fracció insoluble després de la quantificació per ICPMS de cada un dels fangs estudiats.

Fangs	Concentració de metalls (mg metall/Kg de MS)					
	Cadmi	Crom	Coure	Níquel	Plom	Zinc
Toulouse (A)	1.4	16	248	10	77	330
Blagnac (B)	1	26	213	12	23	335
Aureilhan (C)	4	32	280	56	59	451
Gratentour (D)	2	26	201	16	34	458
Montech (E)	8	45	225	49	46	441
Odos (F)	5	31	222	20	53	422
Beaupuy (G)	2	18	101	12	45	312
Finhan (H)	2	24	84	35	51	250
Seissan (I)	1	12	77	15	29	354

Les lletres especificades a la dreta del nom de la depuradora fan referència a la classificació dels fangs presentada a l'Article 6.

III.A.2.5.3 Avaluació de l'efecte de concentracions febles d'extractes solubles de fang i determinació dels valors EC20 (Article 6).

Es varen determinar les corbes dosi-resposta de concentracions febles d'extractes solubles de fangs procedents de les diverses depuradores de la regió Midi-Pyrénées descrites anteriorment mitjançant l'anàlisi de la taxa de proliferació cel·lular. Després, a partir d'aquestes corbes dosi-resposta, es varen determinar el valors EC20 de cada un d'aquests fangs.

III.A.2.5.3.1 Preparació de les solucions a analitzar

Per començar, es varen realitzar diversos assaigs per tal de determinar el rang de concentracions adequat a analitzar. A partir d'aquests resultats i a partir dels extractes solubles de fang en stock (100 g Matèria seca (MS)/L) es va preparar una concentració mare de

l'extracte soluble, diferent en cada un dels fangs, a partir de la qual es varen preparar diferents dilucions utilitzant el medi HBSS com a diluent. Aquesta concentració mare inicial és diferent en cada un dels fangs, ja que la toxicitat varia segons el fang estudiat. El rang de concentracions estudiat va ser (g MS/L): 0-8 pel fang de Toulouse (D); 0-60 pel fang de Blagnac (F); 0-32 pel fang de Aureilhan (B); 0-13.5 pel fang de Gratentour (G); 0-40 pel fang de Montech (C); 0-40 pel fang de Odos (A); 0-14 pel fang de Beupuy (E) i de 0-24 pel fang de Seissan (H). Finalment, aquestes solucions es varen ajustar a pH 7.2 i seguidament varen esterilitzar-se per filtració.

III.A.2.5.3.2 Tractament aplicat

Es va estudiar l'efecte a nivell cel·lular de l'exposició durant 24 h dels diferents extractes solubles de fang anteriorment esmentats. A continuació, es descriu el protocol utilitzat per l'avaluació de la taxa de proliferació cel·lular.

III.A.2.5.3.2.1 Avaluació de la taxa de proliferació cel·lular

Les cèl·lules es varen sembrar en plaques Nunclon de 24 pous (amb 1 mL per pou) a una densitat de $2.5 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL en el medi de cultiu DMEM i van incubar-se durant 24 h per assegurar la seva adhesió a la placa i una capa cel·lular de densitat adequada. Seguidament, es varen incubar aquestes cèl·lules durant 24 h amb 1 mL de les solucions de cada un dels fangs descrites anteriorment. Cal remarcar que després i abans de l'aplicació del tractament, les cèl·lules es van esbandir amb el medi HBSS per evitar la precipitació dels metalls degut a les restes del medi de cultiu convencional DMEM. Després del tractament es van tornar a incubar a condicions normals amb el medi DMEM durant 24 h per aconseguir una recuperació cel·lular i veure més clarament l'efecte real del tractament. L'avaluació de la proliferació cel·lular dels diferents tractaments es va determinar amb el mètode de quantificació proteica per Sulforodamina B descrit anteriorment.

III.A.2.5.4 Avaluació de l'efecte de metalls pesants separada i conjuntament amb extractes solubles de fang de depuradora (Article 7).

En els extractes solubles dels fangs de depuradora analitzats anteriorment no hi ha metalls ja que aquests queden retinguts a la matèria orgànica. És per això, que es va voler avaluar l'efecte d'aquests mateixos extractes de fangs quan hi ha dissoltes artificialment les concentracions de metalls que conté la part insoluble del fang. Per estudiar això, es varen analitzar solucions més concentrades d'extracte soluble de fang en les quals s'hi va addicionar les concentracions equivalents dels metalls trobades en el fang original.

III.A.2.5.4.1 Preparació de les solucions a analitzar

Es va partir dels extractes solubles de fangs que s'havien utilitzat en l'estudi anterior per estudiar l'efecte biològic (sobre la proliferació cel·lular) d'aquestes mostres a baixes concentracions. Així, a partir de les mostres conservades a -20°C , es va voler avaluar l'efecte biològic dels metalls pesants (normalment retinguts a la fracció insoluble del fang) dintre de la pròpia matriu (extracte soluble) a nivell cel·lular i a nivell molecular.

Per tal d'aconseguir el nostre objectiu es van preparar les tres solucions descrites a continuació:

Solució 1: HBSS + Extracte soluble del fang \Rightarrow Diferents dilucions de l'extracte soluble del fang, amb un contingut en metalls inferior als mínims detectables, ja que els metalls existents estan adherits a la matèria orgànica.

A partir de les mostres en stock dels fangs estudiats de concentració 100 g MS/L es va preparar una concentració mare de l'extracte soluble, diferent en cada un dels fangs, a partir de la qual es varen realitzar les diferents dilucions. Les concentracions lliandar de l'extracte soluble dels fangs descrits a la Taula 6 varen ser un punt de referència per determinar les concentracions mare de cada un dels fangs dels nous experiments.

Taula 6 Concentracions lliandar de l'efecte biològic sobre la proliferació cel·lular de la fracció soluble dels fangs de les 9 depuradores de la Regió Midi-Pyrénées.

Depuradores	C. lliandar (mg/gMS/L)	C. mare (mg/g MS/L)	Dilucions (mg/g MS/L)
Toulouse (A)	10-20	40	20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3
Blagnac (B)	4-8	10	10, 5, 2.5, 1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.07
Aureilhan (C)	10-20	40	40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3
Gratentour (D)	4-5	8	8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06
Montech (E)	10-14	14	14, 10, 8, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.325
Odos (F)	20-40	60	60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2.5
Beaupuy (G)	> 13.5	12	12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.15, 0.07
Finhan (H)	15-20	24	24, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6
Seissan (I)	> 8	40	1.2, 1, 0.8, 0.6, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06

Les lletres especificades a la dreta del nom de la depuradora fan referència a la classificació dels fangs presentada a l'Article 6. Concentracions mare preparades i dilucions assajades en el nostre estudi (g MS/L: matèria seca per litre).

Solució 2 : HBSS + Extracte soluble del fang + Metall pesants \Rightarrow Es tracta de les mateixes dilucions emprades en la Solució 1 per l'extracte soluble, on van afegir-se artificialment les concentracions de metalls reals que estan fixats normalment a la matèria orgànica dels fangs (que normalment romanen insolubles). Es tracta de l'avaluació del potencial tòxic que tindria el fang en cas de dissolució total dels metalls retinguts a la part sòlida del fang. Aquests metalls varen ser afegits en quantitat equivalent de matèria seca (g MS/L) a l'extracte soluble corresponent. Finalment, les solucions es van esterilitzar per filtració amb filtres de porus de $0.22\ \mu\text{m}$ de diàmetre i es va ajustar a pH 7.2. Aquestes solucions es varen preparar a partir de les concentracions de metalls determinades en la part insoluble del fang (Taula 6).

A la Taula 7 s'indiquen les concentracions lliardar de l'efecte biològic d'aquests mateixos metalls aïlladament sobre la taxa de proliferació de la línia cel·lular HT29 determinades en estudis anteriors (Delmas et al., 2000). També es mostren les concentracions de metalls afegides a l'extracte soluble de cada un dels fangs per preparar la solució 2 (CE, concentració equivalent). Cal afegir la quantitat adequada de cada un dels metalls segons la quantitat (g de MS) a partir de la qual s'ha preparat l'extracte soluble, per tal que la concentració afegida representi la concentració real que s'obtidria en cas de total dissolució d'aquests metalls en la matriu.

Taula 7 Concentracions de metalls adherits a la matèria orgànica que han estat afegits a l'extracte soluble del fang de manera proporcional a la quantitat de matèria seca del fang de depuradora introduït i concentracions lliardar de cada un dels metalls analitzats separatament.

Metalls	C. lliardar (C _{LL})	Toulouse (A)	Blagnac (B)	Aureilhan (C)	Gratentour (D)
	(mg/l)	CE (mg/40gMS/L)	CE (mg/10gMS/L)	CE (mg/40gMS/L)	CE (mg/40gMS/L)
Cadmi	0.37	0.056	0.01	0.160	0.160
Crom	20	0.64	0.26	1.280	1.280
Coure	0.03	9.92	2.13	11.2	11.2
Níquel	0.125	0.4	0.12	2.240	2.240
Plom	4	3.08	0.23	2.36	2.36
Zinc	0.234	13.2	3.35	18.04	18.04

Metalls	Montech (E)	Odos (F)	Beaupuy (G)	Seissan (I)	Finhan (H)
	CE (mg/14gMS/L)	CE (mg/60gMS/L)	CE (mg/12gMS/L)	CE (mg/40gMS/L)	CE (mg/24gMS/L)
Cadmi	0.112	0.3	0.024	0.0012	0.048
Crom	0.540	1.86	0.216	0.0144	0.576
Coure	3.15	13.32	1.212	0.0924	2.016
Níquel	0.686	1.2	0.144	0.018	0.84
Plom	0.644	3.18	0.54	0.0348	1.224
Zinc	6.174	25.32	12.48	0.04248	6.0

CE : Concentració equivalent en matèria seca de cada un dels metalls analitzats (segons la concentració mare preparada). CLL : Concentració lliardar de cada un dels metalls analitzats a partir de la qual es veu afectada la proliferació cel·lular. Les lletres especificades a la dreta del nom de la depuradora fan referència a la classificació dels fangs presentada a l'Article 6.

Solució 3: HBSS + Metalls pesants ⇒ Van afegir-se artificialment en el medi de cultiu HBSS les concentracions de metalls reals que estan fixats normalment a la matèria orgànica dels fangs (que normalment romanen insolubles). S'introdueix la concentració de metalls corresponent a cada un dels fangs analitzats però en aquest cas no s'introdueix l'extracte soluble del fang. A continuació, les solucions es van esterilitzar per filtració amb filtres de porus de 0.22 µm de diàmetre i es va ajustar a pH 7.2. D'aquesta manera es pot determinar l'efecte dels metalls aïlladament.

III.A.2.5.4.2 Tractament aplicat

Es va estudiar l'efecte biològic de l'exposició de les tres solucions, anteriorment esmentades, dels 9 fangs de depuradora de la Regió Midi-Pyrénées. L'efecte provocat sobre la taxa de

proliferació cel·lular i sobre la inducció de l'expressió de proteïnes d'estrès i les MTs va ser determinada en cada un dels fangs després de 24 h d'exposició a aquestes solucions i 24 h de recuperació en el medi de cultiu. A continuació es descriuen els protocols utilitzats per l'avaluació de la taxa de proliferació i l'expressió de proteïnes d'estrès.

III.A.2.5.4.2.1 Avaluació de la taxa de proliferació cel·lular

Els procediment seguit per avaluar la taxa de proliferació cel·lular ha estat descrit anteriorment a l'apartat III.A.2.4.3.

III.A.2.5.4.2.2 Avaluació de l'expressió de proteïnes d'estrès.

Les cèl·lules es varen sembrar en plaques de petri de 25 mm de diàmetre a una densitat de $2.5 \cdot 10^5$ cèl·lules/mL (2 mL per placa) i varen incubar-se fins a obtenir un teixit quasi confluent (en aquest cas 24 h). Quan les cèl·lules van arribar a la fase exponencial, es va eliminar el medi de cultiu i es va aplicar el nou tractament incubant les cèl·lules durant 24 h amb les solucions descrites anteriorment. A continuació es va fer una recuperació de 24 h per permetre la síntesi de proteïnes d'estrès en el medi DMEM. Finalment, es va procedir a fer el raspai i la quantificació proteica de la mostra amb el mètode Bradford.

L'avaluació de la inducció de la síntesi de proteïnes d'estrès es va realitzar mitjançant la separació proteica amb el mètode electroforètic en gel de poliàcrilamida-SDS amb una posterior electrotransferència de proteïnes sobre membrana de nitrocel·lulosa. Es va intentar detectar les HSP72i en cada una de les mostres preparades dels fangs presentats, utilitzant anticossos monoclonals IgG de conill contra les HSP72i (1:40000). Així mateix, amb l'assaig Dot Blot, es va intentar detectar la inducció de MTs, utilitzant també anticossos monoclonals IgG de conill específics (1:5000) per aquestes proteïnes de baix pes molecular. Tots aquests anticossos són reconeguts posteriorment per un anticòs secundari conjugat a una peroxidasa (1:20000 o 1:5000 depenent del cas), la qual permetrà la seva detecció després del revelat.

III.A.2.6 Anàlisi estadística dels resultats

Les diferències observades sobre la viabilitat cel·lular entre els tres tractaments aplicats en l'estudi dels fangs de depuradora es van determinar amb una anàlisi de variància d'un sol factor per cada una de les concentracions estudiades (model ANOVA; SPSS for Windows; SPSS Inc.) amb un nivell de confiança del 95 %.

Totes les mostres varen ser expressades com la mitjana o el percentatge respecte al control \pm la desviació estàndard obtinguda a partir d'almenys tres experiències independents. Els valors de p es consideren significatius quan $p < 0.05$ i molt significatius quan $p < 0.01$.

III.A.3 RESULTATS

A continuació, es presenten els resultats d'aquest estudi en els dos articles científics publicats a la revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

En un primer article s'avalua l'efecte nociu de concentracions febles d'extractes solubles de fangs de depuradora i de diversos fertilitzants sobre cultius *in vitro* de la línia cel·lular humana HT29. En aquest article, la meua contribució va ser en l'avaluació de la nocivitat de concentracions febles d'extractes solubles dels fangs. És per això, que el procediment experimental de l'anàlisi dels fertilitzants no ha estat descrita en l'apartat de material i mètodes. Nogensmenys, tots els resultats es discuteixen i es comparen en la discussió d'aquest capítol.

En el segon article, en el qual jo en soc l'autora principal, s'avalua l'efecte tòxic que provoca l'addició de metalls pesants (normalment retinguts a la matèria orgànica dels fangs) en els extractes solubles de fang, avaluant així, la toxicitat potencial d'aquests fangs en cas de dissolució dels metalls. Això s'avalua a nivell cel·lular amb l'avaluació de la taxa de proliferació cel·lular. Una part d'aquests resultats també es presenten a la Figura 6 inclosa com a resultats complementaris no publicats d'aquest article. Així mateix, els resultats de l'avaluació a nivell molecular (avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès i metal·lotioneïnes) de tres dels fangs analitzats en aquest estudi també es presenten en aquest segon article.

Article 6. Delmas, F., Maisonnave V., Fulladosa, E., Villaescusa, I Soleilhavoup JP and Murat JC. "Comparative evaluation of the potential noxiousness in domestic sludge used in agriculture and in commercial fertilizer". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 47, issue 3 (November 2000) : 292-297

[doi: 10.1006/eesa.2000.1984](https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1984) <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.2000.1984>

Received 26 January 2000. Available online 25 March 2002

Abstract.- The noxiousness of actual sludge collected in eight water treatment plants around the city of Toulouse, France, was evaluated using a biological test based on the growth rate of cultured human cells. Results were compared with those obtained from 18 fertilizers and culture supports that are commercially available in gardening shops. Surprisingly, it was found that sludge extracts, at low concentrations (below 5 g of dry material/liter), were improving the cell growth rate, which suggests the presence of useful oligoelements. At higher concentrations, a noxious effect, expressed as inhibition of cell growth, was observed. However, this negative effect was of the same order of magnitude as that obtained, under the same experimental conditions, with commercial garden fertilizers which are available and used without any restriction. It is concluded that discarding the sludge, after submission to the biological test, in controlled amount as an agricultural fertilizer should not be hazardous to the environment.

Article 7. Fulladosa, E., Delmas, F., Jun Li., Villaescusa I and Murat JC. "Cellular stress induced in cultured human cells by exposure to sludge extracts from water treatment plants". *Ecotoxicology and environmental safety*. Vol. 53, issue 1 (September 2002) : 134-140.

[doi: 10.1006/eesa.2002.2199](https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2199) <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.2002.2199>

Received 26 July 2001. Available online 6 March 2003

Abstract.- Sludge extracts from three water treatment plants, corresponding either to the readily water-soluble fraction or to the heavy metal content found in the solid fraction were tested separately or in combination on human cultured cells for their ability to affect the growth rate and/or to trigger a synthesis of the stress-related hsp72 and metallothionein proteins. When given separately, the soluble extract or the metal mixture corresponding to the solid fraction of sludge failed to exert significant effects on cell growth rate and expression level of the stress proteins. However, when given in combination, they were found to exert a strong synergistic effect, as they impaired cell growth and induced a significant overexpression of both hsp72 and metallothionein. This result points out the complex molecular interactions in actual environmental samples when acting on biological structures. It underscores the need for biological tests to complement chemical analyses in environment monitoring.

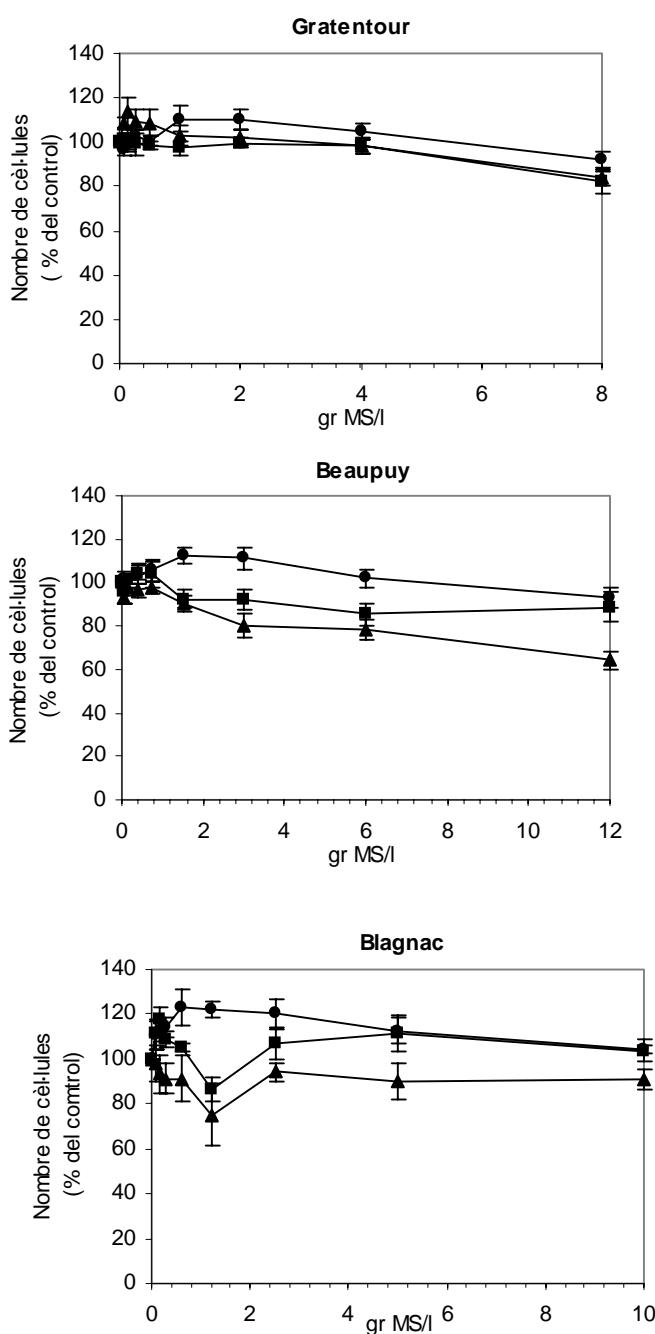
Author Keywords.- cell stress; sewage sludge; heavy metals; heat shock proteins; metallothionein

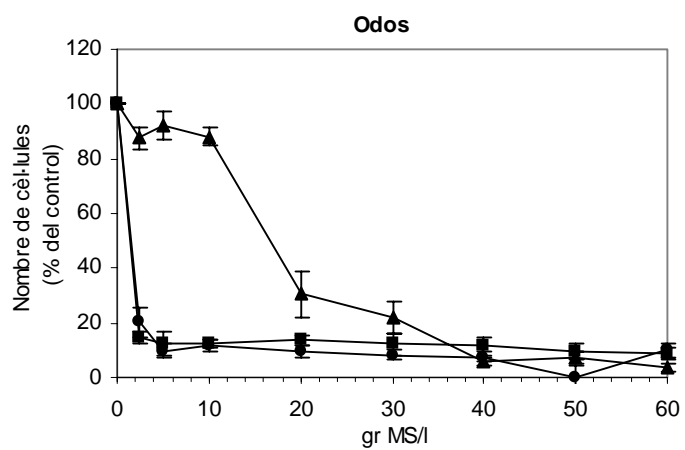
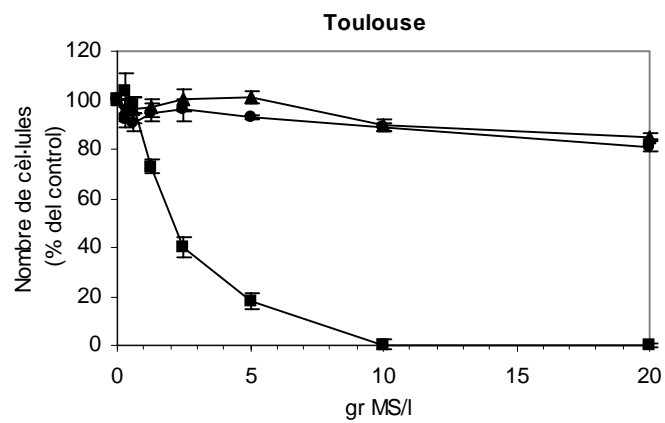
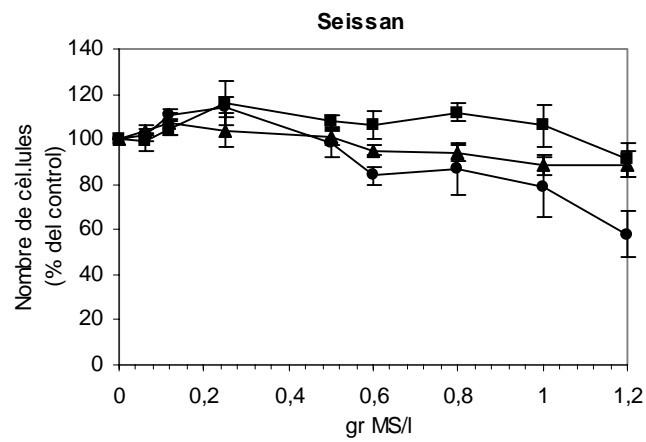
Tot i que en l'Article 7 només es presenten 3 dels 9 fangs de depuradora analitzats, l'avaluació de l'efecte d'aquests fangs sobre la taxa de proliferació cel·lular es va portar a terme en tots els fangs presentats anteriorment. Així, a la Figura 6, es presenten els resultats complementaris no publicats d'aquest estudi.

RESULTATS COMPLEMENTARIS DE L'ARTICLE 7 NO PUBLICATS

Figura 6 Efecte sobre la línia cel·lular de les solucions de fangs de depuradora de la Regió Midi-Pyrenées descrites a continuació després de l'exposició durant 24 hores:

Solució 1 : Extracte soluble del fang de depuradora; Solució 2: Extracte soluble del fang de depuradora + Concentració equivalent de metalls pesats afegits; Solució 3: Concentració equivalent de metalls pesats afegits. En el cas de la Solució 3 (on no s'introdueix l'extracte soluble), aquests valors representen la concentració de metalls equivalents afegida corresponent a la dilució d'extracte soluble assajada (en aquest cas inexistent).





Entre els 9 fangs de depuradora estudiats se'n poden distingir 3 tipus segons l'efecte causat pel tractament amb la fracció soluble dels fangs i els metalls conjunta i separatament.

El primer grup correspondria a aquells fangs, la toxicitat dels quals no varia d'una manera molt important amb l'addició dels metalls a l'extracte soluble. Són els fangs de Grangentour, Beaupuy, Blagnac i Seissan. Per aquests fangs, l'efecte de la solució 2 (extracte soluble del fang + metalls pesats) no és superior a l'efecte provocat per les solucions 1 i 3, no arribant mai a una total inactivació de les cèl·lules.

El segon grup correspondria a aquells fangs que presenten una toxicitat més elevada durant el tractament amb la solució 2 (extracte soluble + metalls afegits). Són els fangs d'Aureilhan, Montech, Finhan i Toulouse. Per aquests fangs, el tractament amb la solució 2; que conté els 2 components (extracte soluble del fang + metalls) presenta una toxicitat que no s'aprecia quan els 2 components són exposats separatament. Podem afirmar que existeix un sinergisme entre els diferents components presents en el medi. Cal remarcar que els fangs corresponents a aquest grup no presenten una estimulació cel·lular per cap de les concentracions assajades, contràriament als resultats obtinguts pels fangs del grup anterior. Els fangs pertanyents a aquest grup tenen en comú la presència de concentracions més elevades de coure, níquel i zinc que les concentracions llindar d'aquests metalls.

El tercer grup correspondria a aquells fangs que la seva toxicitat és deguda a l'extracte soluble (solució 1). En el cas d'Odos, la solució 1 i 2 (solucions preparades amb l'extracte soluble) presenten una alta toxicitat, arribant a una inhibició del 80 % a concentracions de matèria soluble de 2.5 g MS/l. En canvi, la solució 3 (solució preparada amb el medi de cultiu HBSS) no comença a tenir un efecte sobre el creixement cel·lular fins a concentracions més elevades (20 g MS/l). En aquest cas, els metalls semblen no contribuir a la toxicitat observada, així aquesta és totalment atribuïble al fang assajat.

III.A.4 DISCUSSIÓ

La necessitat d'utilitzar diferents models biològics per a l'avaluació de manera fiable i sensible de l'efecte nociu de metalls pesants i altres substàncies contaminants al medi ambient, ens ha portat a la utilització de cultius *in vitro* de cèl·lules humanes, concretament la línia cel·lular HT29.

Els resultats obtinguts indiquen que la línia cel·lular HT29 és un model biològic sensible i apropiat per a ser utilitzat en estudis de toxicologia ambiental. Aquesta línia cel·lular ha demostrat tenir una resposta sensible davant diversos agents contaminants com els fangs de depuradora i metalls pesants (Article 6 i 7) tant a nivell cel·lular com a nivell molecular (sobreexpressió de proteïnes d'estrès).

Concretament, els resultats de l'Article 6 mostren que els extractes solubles dels fangs analitzats provoquen una resposta a nivell cel·lular sobre la línia cel·lular HT29. Aquests extractes solubles de fang provoquen un efecte bifàsic; o sigui, una estimulació cel·lular a baixes concentracions i una inhibició de la proliferació cel·lular a concentracions més elevades. Concretament, l'estimulació cel·lular observada a concentracions baixes s'atribueix a l'acció d'oligonucleòtids que podrien activar la divisió cel·lular o bé a un efecte d'hormesis. D'altra banda, els resultats d'aquest estudi indiquen que els fangs analitzats no suposen una nocivitat pel medi ambient si l'estesa de fangs es porta terme en les condicions establertes per la normativa (3 tones/ha.any). Val a dir que els fertilitzants analitzats que s'utilitzen normalment com adobs en sòl agrícola provoquen una toxicitat similar a la produïda pels fangs de depuradora.

Nogensmenys, els resultats de l'Article 6, no tenen en compte la possible acumulació de metalls pesants i les interaccions que es poden produir. Els resultats de toxicitat presentats a la Figura 6 (resultats complementaris de l'Article 7 no publicats) indiquen que l'addició de metalls pesants (normalment retinguts en el fang) a l'extracte soluble de fang pot provocar diferents tipus d'efectes. L'addició d'aquests metalls en els extractes solubles dels fangs de Gratentour, Beaupuy, Blagnac i Seissan no provoca un efecte nociu significativament superior. Al contrari, l'addició de metalls als extractes solubles dels fangs de Toulouse, Aureilhan, Montech i Finhan mostren que en alguns casos es produeix un clar sinergisme entre els metalls introduïts i l'extracte soluble.

Aquest sinergisme s'observa a nivell cel·lular on es produeix un augment molt significatiu de la inhibició de la taxa de proliferació cel·lular. A nivell molecular, la sobreexpressió de proteïnes d'estrès i metal·lotioneïnes en aquest mateix tractament, torna a posar de manifest aquest fenomen. Aquest sinergisme s'atribueix a les diferents espècies metàl·liques que es formen quan aquests estan en contacte amb l'extracte soluble de fang (Article 7).

En global, els resultats obtinguts en aquest estudi, posen de manifest 1) la toxicitat potencial d'aquests fangs de depuradora en sòl agrícola en presència de metalls pesants i 2) la necessitat d'utilització de bioassaigs de toxicitat, a més de l'anàlisi química de la composició d'aquests fangs, per avaluar correctament la nocivitat d'aquests abans de la seva estesa.

Segona part.- Cultius primaris de cèl·lules sanguínies d'*Sparus sarba* com a model biològic per a l'avaluació de la toxicitat de metalls pesants.

Part del treball realitzat a la Chinese University of Hong Kong (Xina)

III.B.1 INTRODUCCIÓ

III..B.1.1 Descripció del model biològic utilitzat; cèl·lules sanguínies d'*Sparus sarba* (Orada)

La família dels espàrids (Sparidae) està composta per 29 generes i té al voltant d'unes 100 espècies, dintre de les quals s'inclouen *Sparus sarba*, *Mylio macrocephalus*, *Chrysophrys major* i *Sparus aurata*. Aquestes espècies es poden trobar en una gran varietat d'habitats, des d'aigües tranquil·les com estuaris i badies fins en les aigües profundes de la placa continental. Normalment marins, es troben en aigües tropicals i temperades com el mar del sud de la Xina o el mar Mediterrani. Es tracta d'una espècie que es caracteritza per sobreviure en un ampli rang de temperatura ambiental (www.fishbase.org/summary).

En aquest estudi es va utilitzar específicament l'espècie *Sparus sarba*, els trets morfològics dels quals es mostren a la Figura 7. Es tracta de peixos de cos comprimit amb una llargada mitjana de 120 cm, els hàbits alimentaris dels quals són principalment carnívors. S'alimenten d'una gran varietat d'invertebrats i peixos petits i a vegades també d'algues.



Figura 7 Fotografia de *Sparus sarba*

Concretament, el teixit utilitzat en aquest estudi com a model biològic és la sang, una suspensió de cèl·lules diferenciades en un fluid extracel·lular especialitzat anomenat plasma. Les cèl·lules més abundants són els eritròcits, també anomenats glòbuls vermells, que contenen l'hemoglobina, la qual s'encarrega de transportar l'oxigen des de les brànquies fins als teixits. D'altra banda, en aquesta suspensió cel·lular també existeixen els leucòcits i els neutròfils, tot i ser-hi presents en molta menys abundància (www.fishbase.org). Els diferents tipus de cèl·lules sanguínies de peix han estat estudiades per altres autors sobre diferents espècies de vertebrats inferiors. Esteban et al. (2000) varen aïllar i caracteritzar microscòpicament la població de cèl·lules sanguínies de *Dicentrarchus labrax*. Així mateix, les cèl·lules sanguínies de sang perifèrica, en aquest cas de *Sparus aurata*, també han estat estudiades utilitzant diferents tincions i diferents tipus de microscopis (Lopez-Ruiz et al., 1992). Els peixos, a diferència dels

mamífers i altres organismes, tenen eritròcits nucleats, la forma i mida dels quals varia àmpliament segons l'espècie. Els components d'aquest nucli permeten la síntesi de les proteïnes necessàries per a la supervivència d'aquestes cèl·lules (www.student.monterey.edu).

En aquest estudi s'han utilitzat cultius primaris de cèl·lules sanguínies d'*Sparus sarba*, ja que suposen una sèrie d'avantatges que fan d'aquestes un bon model biològic. En primer lloc, a diferència dels glòbuls vermells sense nucli dels mamífers i altres vertebrats superiors, els glòbuls vermells dels peixos tenen un metabolisme aeròbic molt elevat (Boutilier i Ferguson, 1989). Això permet que en aquestes cèl·lules tinguin lloc molts processos cel·lulars de manera molt intensa (Specker et al., 1989), entre ells la síntesi de proteïnes d'estrès davant d'agressions ambientals. En segon lloc, la sang és fàcil d'obtenir i fàcil de manipular a l'hora de la realització dels experiments. En tercer lloc, la sang de peix podria utilitzar-se per avaluar l'estrès (de tipus natural o antropogènic) d'aquests organismes en ambients naturals o piscifactories sense sacrificar els animals. En quart lloc, la sang és un cultiu cel·lular primari que no presenta modificacions com altres cultius cel·lulars establerts. Així, és un model cel·lular molt útil per fer experiments *in vitro*. Per acabar, cal remarcar, que les mostres per a l'investigació científica es poden aconseguir sense matar als animals, la qual cosa elimina els problemes ètics de vegades derivats de la investigació científica.

III.B.1.2 Agressors d'organismes marins

En organismes marins, poden definir-se tres tipus d'agressors; els agressors ambientals, els agressors físics i els agressors biològics. En organismes aquàtics, es defineixen com agressions ambientals aquelles condicions extremes o canvis en els paràmetres de qualitat de l'aigua com l'oxigen dissolt, amoni, duresa, pH, contingut de gasos, pressions parcials, temperatura i sòlids en suspensió entre altres (Iwama et al., 1999). Entre els agressors ambientals també estan inclosos els metalls pesants com el coure, cadmi o ferro els quals poden causar estrès o provocar la mort en peixos. Contaminants com l'arsènic, substàncies clorades i diversos fenols també estan considerats com agressors ambientals, així com els insecticides, pesticides, fungicides (Kothary i Candido, 1981; Heikkila et al., 1982; Misra et al., 1989; Anadu et al., 1989; Delvalls et al., 1998). D'altra banda, els agressors físics fan referència a aquelles agressions provocades per la manipulació dels peixos, pel confinament d'aquest en espais reduïts i pel transport i altres formes físiques de distorsió. La pesca i la persecució també s'inclouen en aquest grup. En piscifactories, poden detectar-se les seqüeles d'aquests tipus d'agressors (Ackerman et al., 2000). Per acabar, els agressors biològics, es posen de manifest en cas que es produeixin jerarquies dominants en tancs experimentals i possiblement també en ambients naturals. Els patògens que provoquen malalties també es podrien considerar com a agressors biològics d'aquests organismes.

Els diferents tipus d'agressors descrits anteriorment provoquen una resposta de defensa per part de l'organisme que pateix l'agressió. Aquesta resposta de defensa pot avaluar-se a nivell molecular utilitzant biomarcadors. A continuació, es revisen i es classifiquen els diferents tipus de biomarcadors induïts en organismes marins davant d'agressions ambientals antropogèniques, els quals seran objecte del nostre estudi.

III.B.1.3 Biomarcadors de contaminació ambiental en vertebrats inferiors

Canvis subtils en el medi aquàtic d'origen antropogènic poden provocar canvis a nivell molecular i bioquímic sobre diferents organismes (Iwama et al., 1999; Sanders, 1993; Hofmann et al., 1995). Depenent de l'agressió, es poden induir diferents biomarcadors d'estrès, els quals poden detectar-se en diferents nivells d'organització biòtica, a nivell molecular, bioquímic o a nivell de resposta cel·lular.

III.B.1.3.1 Biomarcadors no específics

Existeixen marcadors moleculars que s'indueixen davant d'un ampli rang d'agressors ambientals. Així, a partir d'aquests, no es pot conèixer l'origen o el tipus d'agressió al qual l'organisme ha estat exposat. Un exemple clar és el sistema hormonal, el qual és normalment estimulat davant d'agressions o variacions externes a l'organisme. Així, es pot considerar que nivells elevats de determinades hormones com el cortisol i les catecolamines, són un indicador d'estrès general de l'organisme. Així, un augment del nivell de cortisol en plasma indica que l'organisme ha estat exposat a alguna forma d'estrès, incloent malalties, temperatures, salinitat, nivells d'oxigen (Wendelaar-Bonga, 1997), contaminants orgànics (Jorgensen et al., 1999) o nitrats i amoni (Woo i Chiu, 1995). Així mateix, les respostes immunològiques en vertebrats inferiors, també poden estar relacionades amb agressors ambientals. L'exposició d'aquests organismes a estressos pot disminuir o suprimir determinades respostes immunològiques, disminuint la resistència a malalties. Diversos autors han estudiat aquest fenomen, trobant que quan *Salmo trutta* està exposat a concentracions subletals de Cu, hi ha un augment de la susceptibilitat de l'organisme per contraure malalties de tipus víric (Hetrick et al., 1979) o bacterianes (Knittel, 1981).

Dins aquest grup, les proteïnes d'estrès també es defineixen com a bons marcadors d'estrès ambiental no específic. Hi ha molts estudis realitzats en aquest camp, i en molts tipus d'organismes, que demostren aquesta inducció. HSP70 és induïda en brànquies de *Hyppoglossus stenolepis* després de l'exposició a mercuri (Scofield et al., 1999). Així mateix, les proteïnes d'estrès també són induïdes per variacions de paràmetres ambientals com la temperatura o salinitat entre altres (Currie et al., 1997).

III.B.1.3.2 Biomarcadors específics

A diferència de les anteriors, algunes respostes bioquímiques o moleculars només estan induïdes en resposta a determinats agressors ambientals indicant així, el tipus d'agressor que ha causat el dany. D'aquesta manera, també donen informació del mode d'acció d'aquest agressor i de la seva toxicitat. Aquesta categoria inclou les alteracions generals del metabolisme de l'organisme, les quals poden ser induïdes per la presència de determinats contaminants en l'aigua. Un exemple clar és la disminució d'àcid escòrbic (Vitamina C) en els teixits de *Mugil cephalus*. Tot i que els nivells d'àcid escòrbic en *Mugil cephalus* tendeixen a fluctuar aleatòriament amb la variació de diversos factors ambientals (salinitat i temperatura), apareix una disminució d'aquest àcid escòrbic en teixits després de l'exposició de l'individu a determinades concentracions de cadmi (Thomas et al., 1982). Així mateix, diferents tipus de contaminants orgànics, com pesticides, insecticides i dioxines, indueixen ràpidament la síntesi d'un sistema enzimàtic de detoxificació, conegut com sistema monoxigenasa Citocrom P-450 (Jimenez i Stegeman, 1990). Aquest sistema enzimàtic disminueix la solubilitat lipídica dels contaminants orgànics, facilitant la seva excreció. El fet que aquest sistema enzimàtic sigui induït ràpidament i específicament per contaminants orgànics, fa que sigui un bon biomarcador d'aquest tipus de contaminació. En diversos peixos, i també en *Salvelinus namaykush*, s'ha trobat una activitat elevada d'aquest sistema enzimàtic en resposta a contaminació per olis (Davis, 1985) o en resposta a hidrocarburs aromàtics (Luxon et al., 1987; Monod et al., 1988). També existeixen altres sistemes enzimàtics que pateixen una marcada inhibició de la seva activitat després de l'exposició a determinades substàncies contaminants. Així, aquests sistemes enzimàtics també poden utilitzar-se com a marcadors bioquímics específics. Les metal·lothioneïnes també poden considerar-se com a biomarcadors específics de l'exposició a agressions per metalls pesants. L'exposició de peixos a metalls pesants com el zinc, coure, cadmi i mercuri indueixen la síntesi d'aquestes proteïnes específiques en diversos teixits (brànquies, fetge, ronyó, etc.) (Boleas et al., 1998).

III.B.1.4 HSP70 i Metallothioneïnes en peixos; biomarcadors moleculars de toxicitat

L'estudi de les proteïnes d'estrès en peixos encara està en els seus primers estadis d'investigació comparat amb els estudis realitzats en mamífers. L'estudi de HSPs en peixos es troba en els estadis descriptius de detecció de noves proteïnes que es sintetitzen en diversos teixits en resposta de diferents agressors biòtics i abiòtics. Així mateix, la sobreexpressió de HSPs en peixos també ha estat detectada en cultius cel·lulars establerts (Kothary i Candido, 1981; Misra et al., 1989; Ryan i Hightower, 1994), en cultius cel·lulars primaris (Currie i Tufts, 1997; Currie et al., 1999, 2000; Feng et al., 2003), així com en diferents teixits d'organismes

enters després de l'exposició d'aquests a diferents agressors ambientals (Ueng et al., 1996; Dethloff et al., 1999; Wu et al., 1999; Carvalho et al., 2004). Concretament, la HSP70 ha estat la més estudiada, demostrant la homologia en la seva seqüència d'aminoàcids en altres vertebrats inferiors, aus, i humans (Welch, 1993). En la majoria dels estudis s'avalua l'efecte del xoc tèrmic i només en alguns casos s'avalua l'efecte d'altres agents agressors. Koban et al (1991) va descriure la inducció de HSPs en brànquies, fetge, cor, eritròcits i múscle esquelètic i cervell de *Fundulus heteroclitus*, els quals havien estat exposats a elevades temperatures. Així mateix, diversos autors també han avaluat els nivells de HSPs en organismes enters de zones més o menys contaminades per a la monitorització i avaluació de la contaminació de determinades zones (Schröder et al., 2000).

Les MTs han estat encara menys estudiades en vertebrats inferiors. Alguns autors han trobat diferències immunològiques entre les MTs de mamífers i peixos (Norey et al., 1990), tot i això, aquestes diferències són mínimes. Aquestes proteïnes han estat detectades en diferents teixits de diverses espècies quan aquests han estat exposats *in vitro* a hormones o metalls pesants com el zinc o el coure (Burgess et al., 1993). En estudis realitzats sobre *Sparus aurata*, es va veure clarament un augment de la quantitat de MT hepàtica després de l'exposició d'aquest organisme a cadmi i al pesticida malathion (Boleas et al., 1998). Tot i això, Hylland et al (1998) varen remarcar que, en *Platichthys flesus*, la inducció de MTs estava molt influenciada per factors com l'estat nutricional o l'estat de maduració sexual. En el cas de *Strongylocentrotus droebachiensis*, els nivells de MT en intestins i gònades es va veure que eren superiors quan aquests organismes havien estat exposats a aigües contaminades per cadmi (Aspholm i Hylland, 1998). L'efecte de diversos pesticides, així com de l'arsenit i l'arsenat sobre la sobreexpressió de MT hepàtica i sobre la peroxidació lipídica també han estat avaluats en *Channel catfish* (Schlenk et al., 1997). Així mateix, igual que amb les proteïnes d'estrès, aquesta proteïna també pot utilitzar-se com a biomarcador de contaminació per a la biomonitorització de zones contaminades.

III.B.1.5 Antecedents

Concretament, els cultius primaris de cèl·lules sanguínies de peix són d'especial interès degut a les característiques úniques, que fan d'aquest model biològic un sistema ideal per a l'estudi dels efectes de l'estrès ambiental. Diversos autors ja havien avaluat l'efecte del xoc tèrmic i l'anoxia sobre cèl·lules sanguínies de *Oncorhynchus mykiss* sobre l'expressió de proteïnes d'estrès i mRNA HSP70 (Currie i Tufts, 1997; Currie et al., 1999). Així mateix, també s'havia estudiat l'efecte de diverses hormones (Deane et al., 1999) sobre aquest model biològic, l'efecte de l'edat cel·lular en la capacitat de síntesi de proteïnes i s'havien fet comparacions entre els assaigs *in vivo* i *in vitro* (Currie et al., 2000). Així mateix, en aquest mateix model, ja s'havien estudiat altres marcadors moleculars d'estrès oxidatiu com són la inhibició d'activitats

enzimàtiques (Akahori et al., 1999) entre altres. Nogensmenys, les cèl·lules sanguínies només s'havien utilitzat per estudiar els estressos ambientals naturals com el xoc tèrmic. Els estressos antropogènics com els metalls pesants havien estat avaluats en diferents línies cel·lulars primàries o establertes de peix (Vijayan et al., 1998) però en cap cas s'havia estudiat l'efecte d'aquests metalls pesants sobre cèl·lules sanguínies. D'altra banda, tampoc no s'han trobat estudis que facin referència a l'expressió de MTs en aquest tipus de cultiu cel·lular primari.

III.B.2 MATERIAL I MÈTODES

III.B.2.1 Material i equipament específic

Els experiments presentats en aquest estudi es varen realitzar, en part, al "Laboratory of Fish Biology" de la Chinese University of Hong Kong (Xina) (obtenció de les mostres). Les anàlisis de l'expressió de proteïnes d'estrès es va portar a terme a la Universitat de Girona.

Per portar a terme aquests experiments, es va utilitzar el material general d'un laboratori de biologia marina i d'un laboratori de biologia cel·lular/molecular. Es varen utilitzar: xeringues i agulles (Terumosyringe, Terumo with needle. 25Gx5/8"(0.5-16 mm)), centrífuga amb control de temperatura (Transsonic, ELMA), Bany amb control de temperatura (Thermolyse 17600 Dry-bath), Balança (Sartorius 1212 MP, Zeiss), Vortex (Velp scientifica), Filtres Stericup (Millipore, Bedford), Sistema aigua Milli-Q (Millipore iberica), Spectofotòmetre (Shimadzu corporation, Kyoto, Japan), Cubetes de plastic 1.5 ml (Kartell, Barcelona), Mini protein 3 Cell, (Bio-rad, USA), Power pac 300 (Bio-rad, USA), Micropiptetes de precisió 0.5-10 μ L, 2-20 μ L, 10- 100 μ L, 100-1000 μ L (Labmate).

III.B.2.2 Reactius, productes i preparació de dissolucions

Totes les sals de metall utilitzades són de qualitat per anàlisis ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, PbCl_2 , Merck (Darmstadt, Germany), HCl , NaOH i NaCl , Merck (Darmstadt, Germany).

Les dissolucions mare de cadmi, plom i crom varen preparar-se a partir de sals de metalls de qualitat per anàlisi descrites anteriorment $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Aquestes sals de metalls es varen dissoldre en el medi inorgànic HBSS modificat (Delmas et al 1995), per tal d'evitar la precipitació dels metalls o la formació de complexos amb els productes orgànics presents en els medis de cultiu convencionals (DMEM). Es varen preparar solucions de concentració 150 μ M per a cada un dels metalls analitzats i varen ajustar-se al pH desitjat (pH 7.0). Seguidament, aquestes dissolucions varen ser esterilitzades per filtració. Així, a partir d'aquesta solució mare, es van preparar les dilucions necessàries amb el mateix medi de cultiu per aconseguir les diverses concentracions desitjades. Les concentracions finals de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI) varen ser de 150, 50, 10, 1 i 0.1 μ M.

També es va utilitzar diferents productes com: Heparine (Bio-rad, USA), BSA (Bovine serum albumine) de (Bio-rad, USA), Tris base (Bio-rad, USA), SDS (Bio-rad, USA), 30% acrilamida/Bis solution 29:1 (3,3%C) (Bio-rad, USA), Temed (N,N,N,-Tetramethylenediamine) (Bio-rad, USA), APS (Amonium persulfate) (Bio-rad, USA), Tween-20 (Bio-rad, USA), Gluteraldehid solució 50% (Panreac, Barcelona), Etanolamina (Panreac, Barcelona), Immobilon-P transfer membranes (PVDF, 0.45 μ m) (Millipore, Bedford), membranes de nitrocel·lulosa 0.2 μ m (Schleicher & Schuell, Dassel, alemanya), Gel blotting paper (Schleicher & Schuell, Dassel,

Alemania), Hyperfilm, photographic paper (Amersham, Spain), Super Signal, West pico Chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford), Revelador Rodinal (Agfa, Leverkusen), Fixador AGEFIX (Agfa, Leverkusen).

Així mateix, els anticossos utilitzats en aquest estudi, juntament amb la corresponent dilució de treball es presenten a la Taula 8.

Taula 8. Anticossos utilitzats en aquest estudi.

Proteïna	Anticòs primari	Dilució	Anticòs secundari	Dilució
HSP70	Monoclonal Anti-Heat shock protein 70. Clone BRM-22 (Ref.H5147), Sigma	1:10000	Anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Ref.A-9044), Sigma	1:10000
MT	Monoclonal Anti-MT, E9-Dako, Copenhagen, Denmark.	5:10000	Anti-mouse IgG (Fc específic) peroxidasa (Ref. A2554) Sigma	1:10000

Per tal de fer els tractaments i analitzar les mostres de sang obtingudes, va ser necessària la preparació de diversos medis i dissolucions com el medi de cultiu DMEM, medi de cultiu HBSS modificat, tampó de càrrega, tampò BUS, tampó de treball electroforesi, tampó de transferència, PBS, PBS-T, PBS-etanolamina 0.3%, solució de glutaraldehid 5%, entre d'altres, la composició i preparació dels quals es presenten a l'Annex 2.

III.B.2.3 Protocols experimentals

III.B.2.3.1 Peixos

Les Orades (*Sparus sarba*) d'uns 200 g, es varen obtenir d'una piscifactoria localitzada a Tolo Harbour, a la vora de Hong Kong. Aquesta piscifactoria va ser escollida perquè està situada en una zona poc contaminada i molt tranquil·la, on els peixos poden créixer en condicions no estressants. Les orades varen ser transportades en aigua de mar fins al Laboratori de Ciències marines de la Chinese University of Hong Kong, en menys de dues hores. Durant el transport, va ser necessària l'oxigenació de l'aigua així com la introducció de gel en els recipients on els peixos eren transportats per tal que aquests es mantinguessin en les condicions adequades i evitar la mort o estrès que es pogués generar. Seguidament, les orades es varen dipositar en tancs d'aigua de mar i es varen deixar aclimatar en aigua oxigenada a 15-20°C almenys durant una setmana abans de començar els experiments. Cal remarcar, que l'aigua dels tancs era bombejada i recirculada de Tolo Harbour (zona costera on està situat el laboratori) i filtrada abans d'introduir-la als tancs. El procés d'acimatització és completament necessari per evitar que els nivells d'estrès dels peixos utilitzats en aquests experiment no sigui superior als nivells basals i per tal d'evitar la variabilitat dels resultats obtinguts amb peixos diferents.

III.B.2.3.2 Extracció i rentats de la sang obtinguda

Una vegada obtingut un *stock* de peixos no estressat, aquests es varen anar agafant amb una salabret, molt ràpidament i un per un. Una vegada immobilitzats, es va extreure entre 1 i 2 mL

de sang mitjançant una punció via caudal utilitzant una xeringa de 2 mL. Seguidament, la sang extreta es va posar dins un tub Eppendorf que contenia 100 µl d'heparina al 3% en solució salina evitant així, la coagulació de la sang.

Aquest procediment, es va repetir fins a obtenir el nombre de mostres de sang necessàries per a la realització de l'experiment. A partir d'aquestes mostres, les cèl·lules sanguínies es varen obtenir mitjançant la centrifugació de la mostra a 6500 rpm durant 10 min. Acabat aquest procés, es va conservar el *pellet*, corresponent a les cèl·lules sanguínies i es va descartar el sobrenedant, corresponent al sèrum i altres factors continguts en la sang. Finalment, abans de continuar l'experiment, es varen fer dos rentats d'aquestes cèl·lules sanguínies, majoritàriament glòbuls vermells, utilitzant el medi HBSS.

III.B.2.3.3 Assaigs previs

Per tal de determinar el rang de concentracions adequat de cada un dels metalls a analitzar, Cd(II), Pb(II) i Cr(VI), es varen fer diversos assaigs previs a la realització dels experiments. Així mateix, es varen consultar els treballs realitzats per altres autors sobre diferents models biològics i/o línies cel·lulars (Heikkila et al., 1982; Kothery i Candido, 1981; Misra et al., 1989; Ryan i Hightower, 1994) per tal de planificar i encertar el rang de concentracions a utilitzar.

III.B.2.3.4 Primera sèrie d'experiments: Efecte del temps de recuperació en l'expressió de proteïnes d'estrès en cèl·lules sanguínies

En aquest experiment, es va voler determinar el temps de recuperació òptim de les cèl·lules sanguínies després de ser exposades a metalls per aconseguir una màxima sobreexpressió de proteïnes d'estrès després d'agressions ambientals. Això és de gran importància degut a que el temps d'activació de la maquinària cel·lular és variable depenent del tipus d'agressor i del tipus cel·lular (Parsell i Linqvist, 1993), sobretot quan es realitzen temps curts d'exposició a l'agressor. En estudis on s'utilitzen cultius cel·lulars *in vitro* establerts s'efectuen diversos temps de recuperació al voltant de 24 h, temps que correspon aproximadament al temps de divisió del tipus cel·lular en qüestió (Delmas et al., 1995). D'altra banda, en estudis on s'utilitzen organismes enters *in vivo*, no es solen realitzar períodes de recuperació degut a que les exposicions als agents agressors són prou llargues i les concentracions d'agent agressor prou febles per induir el procés d'activació de la maquinària cel·lular sense provocar la mort de l'organisme (Hollis et al., 2001). Nogensmenys, alguns autors, que realitzen experiments *in vivo* amb concentracions elevades d'agent agressor, també es veuen obligats a efectuar períodes de recuperació. Específicament, en cultius primaris de cèl·lules sanguínies, no es coneix el període òptim de recuperació per tal d'aconseguir una màxima inducció de proteïnes d'estrès.

Per tal d'avaluar l'efecte del temps de recuperació després d'exposicions a metalls, els *pellets* de les cèl·lules sanguínies obtinguts de 5 peixos independents després del procediment descrit a

l'III.B.2.3.2 es va resuspendre en una solució de HBSS contenint 20 μM de Cd(II) durant 2 h a temperatura ambient (20°C). En aquest cas, s'utilitza un medi inorgànic (HBSS modificat) per tal d'evitar la precipitació de part del metall degut a la formació de complexos amb molècules orgàniques (Delmas et al 1995, 2000). Així, una vegada acabat el tractament d'exposició, les cèl·lules sanguínies es varen recuperar per centrifugació a 6500 rpm i es van rentar amb el medi DMEM dues vegades. Seguidament, les cèl·lules es varen resuspendre en medi DMEM i es varen deixar incubar durant diferents temps de recuperació (0, 1.5, 3 i 6 h), tal i com s'especifica a les Taula 9.

Taula 9 Tractament aplicat a les cèl·lules sanguínies *in vitro* per a l'avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès per part d'aquestes després de l'exposició a 20 μM cadmi i diferents temps de recuperació.

Tractament	Exposició	N	Temps de recuperació	Mostres analitzades*
Sense tractament	2 h 20°C 0 μM Cd	5	0 h	1, 2, 3, 4, 5
		5	0 h	6, 7, 8, 9, 10
Exposició a metalls	2 h 20°C 20 μM Cd	5	1.5 h	11, 12, 13, 14, 15
		5	3 h	16, 17, 18, 19, 20
		5	6 h	21, 22, 23, 24, 25

*Cada un dels números de les mostres analitzades corresponen a un peix diferent. N: nombre de mostres

III.B.2.3.5 Segona sèrie d'experiments: Avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès en cèl·lules sanguínies després de l'exposició a diferents concentracions de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI)

Una vegada determinat (1) el rang de concentracions adequat de cada un dels metalls que es volen analitzar i (2) el temps òptim de recuperació de les cèl·lules sanguínies per obtenir una màxima sobreexpressió de les proteïnes d'estrès, es va procedir a avaluar l'efecte que tenen diferents concentracions metàl·liques després de diferents concentracions i temps d'exposició sobre les cèl·lules sanguínies. L'efecte de concentracions de 0.1, 1, 10, 50 i 150 μM de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI) es va avaluar després de 1 i 2 h d'exposició i 1.5 h de recuperació, tal i com es resumeix a la Taula 10.

Taula 10 Tractament aplicat a les cèl·lules sanguínies *in vitro* per a l'avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès per part d'aquestes davant l'exposició a Cd(II), Cr(VI) i Pb(II).

Metall analitzat	Tractament aplicat		Temps de recuperació
	Temps d'exposició	Concentracions analitzades	
Cd(II)	1 h exposició	0.1 – 1 – 10 – 50 – 150 μM (en medi HBSS)	1.5 h de recuperació (en medi DMEM)
	2 h exposició		
Pb(II)	1 h exposició	0.1 – 1 – 10 – 50 – 150 μM (en medi HBSS)	1.5 h de recuperació (en medi DMEM)
	2 h exposició		
Cr(VI)	1 h exposició	0.1 – 1 – 10 – 50 – 150 μM (en medi HBSS)	1.5 h de recuperació (en medi DMEM)
	2 h exposició		

El procediment seguit és el mateix que el realitzat en experiments anteriors. Després del rentat de la mostra, descrit a l'III.B.2.3.2, es va resuspendre el *pellet* recuperat en les solucions de Cd(II), Cr(VI) i Pb(II) de diferent concentració preparades en medi HBSS i es varen incubar a temperatura ambient (20°C) durant 1 o 2 hores segons convingués. Seguidament, una vegada finalitzat el període d'incubació, es varen rentar dues vegades aquestes cèl·lules en medi DMEM modificat, tal i com s'ha explicat anteriorment, per tal d'eliminar tots els ions metàl·lics que podrien continuar afectant a les cèl·lules sanguínies de la mostra. Finalment, les cèl·lules sanguínies del *pellet* recuperat, es van resuspendre en medi de cultiu nutritiu DMEM i es varen deixar recuperar durant 1.5 h. Finalitzat aquest període, es realitza l'extracció proteica descrita en el següent apartat.

III.B.2.3.6 Extracció proteica

Una vegada acabats els tractaments específics efectuats en cada cas, les cèl·lules sanguínies de les mostres tractades es varen recuperar per centrifugació (10 minuts a 6500 rpm) i es va realitzar una extracció proteica. El procés d'extracció proteica va consistir en la digestió de les cèl·lules sanguínies utilitzant 0.3 ml de solució BUS (descrita a l'Annex 2) i la posterior sonicació de les mostres durant 10 minuts a temperatura ambient. Per acabar, es varen incubar les mostres durant 10 minuts a 95°C. En aquest cas, es va recuperar el sobrenedant obtingut després de la centrifugació de les mostres a 6500 rpm durant 10 minuts, el qual va ser dipositat en nous Eppendorfs i congelat a -20°C. Aquestes mostres varen ser conservades fins el moment de la seva anàlisi a la Universitat de Girona.

III.B.2.4 Avaluació de l'expressió de proteïnes d'estrès i metal·lothioneïnes

Els extractes proteics obtinguts del procés descrit anteriorment varen ser analitzats amb l'objectiu de detectar les diferències existents, en quant a la sobreexpressió de proteïnes d'estrès, entre els diferents tractaments realitzats. Nogensmenys, abans de l'avaluació de les diferències existents entre aquestes mostres, va ser necessària l'optimització del protocol de treball per a la detecció eficient i correcte d'aquestes proteïnes. Això va ser necessari perquè l'anàlisi de la sobreexpressió de les proteïnes d'estrès es va portar a terme a la Universitat de Girona, on per primera vegada es va portar a terme aquest tipus d'anàlisi. Una vegada determinats els paràmetres i la sensibilitat del mètode de treball, les mostres varen ser analitzades.

Així, en aquest apartat, d'una banda, es posen a punt les tècniques utilitzades; l'assaig Bradford (per la quantificació proteica), el mètode electroforètic i de transferència de proteïnes (per l'avaluació de HSP70) i l'assaig Dot blot (per a l'avaluació de MT) per a l'anàlisi de les mostres de sang objecte del nostre estudi. D'altra banda, després d'aquesta optimització, es descriu el protocol final optimitzat que ha estat utilitzat per a l'anàlisi de les mostres d'aquest estudi.

III.B.2.4.1 Optimització del mètode de treball

En aquest apartat es descriuen les variables analitzades, els procediments estudiats i els resultats obtinguts durant l'optimització del protocol de treball utilitzat per a la quantificació total de proteïnes i la detecció de HSPs i MTs en sang de peix. En aquest apartat es defineixen després de diversos experiments les variables que seran utilitzades en els protocols finals descrits anteriorment.

III.B.2.4.1.1 Optimització 1: Mètode Bradford per a la quantificació de proteïnes totals

Abans d'analitzar la concentració de proteïna total de les mostres, va ser necessària la optimització del mètode d'anàlisi, en aquest cas el mètode Bradford (1976). Per començar, es va fer la calibració del mètode utilitzant diferents concentracions de la proteïna estàndard BSA (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.4 mg/mL), a partir de la qual es podran extrapolar les absorbàncies obtingudes de l'anàlisi de les mostres. Atès que per fer això el contingut de proteïna total de la mostra ha d'estar comprès en el rang de concentracions que s'utilitza en la recta patró, va ser necessari diluir les mostres. Les mostres objecte del nostre estudi tenen una gran quantitat de proteïna ja que es tracta de cèl·lules sanguínies que tenen un gran contingut d'hemoglobina. Després de diverses proves, es va decidir diluir les mostres en una proporció 1:10 amb aigua de qualitat Milli-Q.

III.B.2.4.1.2 Optimització 2: Electroforesi-Western blot per a la detecció de HSP70

Abans de començar l'anàlisi de les mostres objecte del nostre estudi, va ser necessària l'avaluació de la sensibilitat del mètode, el possible coeficient de variació existent i l'optimització de l'assaig per l'anàlisi de les nostres mostres objecte del nostre estudi mitjançant la determinació de determinats paràmetres (com per exemple, temps d'incubació, dilució d'anticossos, quantitat de proteïna total a analitzar, tipus de membranes, etc). A continuació, es descriuen cada un dels paràmetres avaluats i els resultats obtinguts.

III.B.2.4.1.2.1 Repetitivitat i sensibilitat del mètode

Després de la realització de diversos assaigs, la repetitivitat del mètode en mostres analitzades dins d'un mateix gel electroforètic va ser satisfactòria en el rang de concentracions entre 5 i 20 µg de proteïna total. En el cas de les mostres analitzades dins un mateix gel electroforètic, s'obtenen errors estàndard del 1.3% 2.7% i 15% per les quantitats de 20, 10 i 5 µg de proteïna total analitzada respectivament.

D'altra banda, la sensibilitat de l'assaig quan s'analitzen diferents quantitats de proteïna i consegüentment, diferents intensitats de banda també va ser analitzada. En el cas de l'anàlisi de bandes molt intenses, essent en aquest experiment les corresponents a 20 µg de proteïna total, cal determinar si es poden detectar correctament les diferències degut a l'excessiva

intensitat de la banda (l'anàlisi densitomètrica serà descrita en apartats posteriors). Així, es va avaluar si les diferències entre les densitats de banda es corresponien amb les diferències de contingut de proteïna. Els resultats indiquen que es detecten correctament les diferències entre les quantitats de proteïnes analitzades (20, 10 i 5 µg de proteïna). La utilització de quantitats de 2.5 µg de proteïna total no és suficient per detectar correctament aquestes proteïnes.

La repetitivitat dels resultats quan s'analitza una mateixa mostra en membranes diferents, també cal que sigui avaluada. Atès que el mètode d'anàlisi utilitzat requereix de la realització d'una llarga sèrie de rentats i exposicions, es poden presentar diferències d'intensitats entre les diferents membranes analitzades. A més a més, cal dir que cada sèrie d'experiments realitzada consta entre 20 i 30 mostres independents i que per tant, aquestes no poden ser analitzades en una sola membrana. A més a més, totes les mostres cal que siguin analitzades per triplicat abans de donar per definitiu el resultat obtingut. Així, és necessària l'avaluació de la repetitivitat de les mostres analitzades en diferents membranes. Les dades varen ser tractades tal i com es descriu a l'apartat III.B.2.4.1.2.3. Després d'aquest tractament, les densitats de banda entre les diferents mostres, entre membranes diferents o dins d'una mateixa membrana, poden comparar-se i donar un resultat final. En general, la variabilitat dels resultats d'una mateixa mostra obtinguts entre diferents membranes sembla ser una mica superior a la detectada entre mostres dins una mateixa membrana (error experimental inferior al 12%). Aquest fet s'atribueix a petites variacions experimentals durant el seguiment del protocol de treball, petites diferències entre temps d'exposició i a altres paràmetres especificats anteriorment. Nogensmenys, les intensitats trobades en cada membrana es relativitzen respecte al blanc, la qual cosa corregeix aquest error.

D'altra banda, per tal de verificar que l'anticòs monoclonal utilitzat només reconeix les HSP70 de les mostres analitzades i que no existeixen interferències amb altres proteïnes, es va fer una avaluació de l'especificitat de l'anticòs i per tant, de l'efectivitat del mètode en qüestió. Així, es varen fer dilucions d'una mostra de proteïna estàndard HSP70 i paral·lelament, es varen fer les mateixes dilucions a partir d'una de les mostres objecte del nostre estudi. L'obtenció de dues línies de regressió paral·leles ens indica que l'especificitat de l'anticòs és correcta.

III.B.2.4.1.2.2 Determinació de la quantitat òptima de proteïna total a analitzar

La determinació de la quantitat òptima de proteïna total a introduir a les butxaques del gel electroforètic també és important. Per tal d'avaluar això, es varen introduir diferents quantitats de proteïna total (2.5, 5.0, 10.0, 20.0 µg) d'una mostra determinada, separant i transferint les proteïnes pels mètodes convencionals SDS-page i Western blot, respectivament (Mini-Protean 3 cell Instruction manual, Bio-Rad, USA; Mini Trans-blot electrophoretic transfer cell Instruction manual, Bio-Rad, USA). La introducció de 2.5 µg de proteïna total no va ser suficient per

detectar correctament les HSP70, ja que utilitzant aquesta quantitat de proteïna no es detecta una banda ben definida provocant així, errors a l'hora de la quantificació de la banda. D'altra banda, contràriament a la quantitat anterior, les bandes que contenen 20 µg de proteïna total són molt intenses. Per tal de confirmar la quantitat òptima de proteïna a utilitzar, les bandes obtingudes han estat analitzades densitomètricament (procés descrit en l'apartat III.B.2.4.1.2.3). Dels resultats obtinguts podem concloure que la millor quantitat de proteïna total a analitzar en mostres que contenen l'extracte proteic de cèl·lules sanguínies és de 10 o 5 µg de proteïna total si volem aconseguir una detecció òptima de HSP70. En aquest estudi, s'ha utilitzat la quantitat de proteïna total de 10 µg.

III.B.2.4.1.2.3 Efecte de l'anàlisi densitomètrica

Abans de començar l'avaluació de les mostres experimentalment, va ser necessari establir el millor procediment per a determinar la densitat de les bandes obtingudes. L'anàlisi densitomètrica va realitzar-se utilitzant el programa Quantity One v. 4.2.2, (Bio-rad, USA) i els factors a tenir en compte a l'hora d'avaluar la densitat de les bandes es descriuen a continuació. Després de moltes anàlisis, els resultats obtinguts indiquen que és molt important la lectura de les bandes i que aquesta pot fer variar considerablement el resultat final. Degut a això, tal i com s'especifica a continuació, es va decidir seguir sempre el mateix criteri a l'hora de definir les bandes de la membrana. D'una banda, cal tenir en compte que (1) els quadres que defineixen la zona de la qual es vol conèixer la intensitat han d'incloure al seu interior tota la banda i el mínim de fons. Així mateix, (2) si les bandes no es troben en una mateixa línia recta, cal donar una rotació al quadre per tal que defineixi bé la banda a analitzar. D'altra banda, (3) cal fer una correcció del soroll de fons de la banda, el qual podria portar a errors experimentals. En el nostre cas, el soroll de fons de les membranes obtingudes ha estat sempre molt homogeni. Atesa aquesta homogeneïtat, la correcció del soroll de fons aplicat a l'anàlisi de les mostres ha estat global i no local per a cada una d'elles. Aquesta correcció s'efectua amb el propi programa densitomètric, el qual dóna l'opció de la correcció de fons (Manual Quantity-one, Bio-Rad, USA).

III.B.2.4.1.2.4 Avaluació dels factors que afecten al revelat

Els factors que afecten al revelat han estat descrits extensament a l'aparat II.4.1.3.5.

III.B.2.4.1.3 Optimització 3: Assaig Dot blot per a la detecció de MTs

Diferents variacions de l'assaig Dot blot havien estat utilitzades en estudis anteriors per a l'estudi de diferents proteïnes, activitats enzimàtiques o la realització de proves analítiques. (Matsuda et al., 2001; Accotto et al., 1998; Heinicke et al., 1992, Jahn et al., 1984, Lewis et al., 1999; www.avidity.com/dotblot.html).

En el nostre estudi s'ha volgut utilitzar el mètode Dot blot per a la detecció de MTs en cèl·lules de sang d'*Sparus sarba*. Així, en aquest apartat es determinen i s'avaluen els paràmetres més importants a tenir en compte durant la realització d'aquest assaig utilitzat per a la detecció de les metal·lotioneïnes de les mostres descrites anteriorment. Amb aquest procés d'optimització, es pretén determinar i fixar els paràmetres crítics, avaluar la sensibilitat del mètode i estudiar l'error estàndard generat en unes determinades condicions d'assaig.

III.B.2.4.1.3.1 Elecció de la membrana

Les característiques òptimes de la membrana utilitzada per a la detecció de MTs ha estat analitzada en aquest estudi. Els experiments presentats en aquest apartat han estat realitzats utilitzant membranes de nitrocel·lulosa. Aquestes membranes, a diferència de les membranes de PVDF, no necessiten una prèvia activació, la qual cosa facilita l'anàlisi ja que aquest es pot realitzar en sec. A més a més, altres autors ja havien utilitzat aquest tipus de membrana en la realització de l'assaig Dot blot (Jahn et al., 1984).

D'altra banda, tot i que la majoria d'autors fan referència al material de la membrana que utilitzen, només en alguns casos es fa referència al diàmetre de porus d'aquesta mateixa. Així, es varen realitzar experiments paral·lels amb membranes amb diàmetre de porus de 0.45 i 0.22 μm . Els resultats obtinguts demostren que, en el cas de les MT, de pes molecular molt inferior a les HSPs (6-7 KDa), és millor utilitzar membranes amb un porus de 0.22 μm de diàmetre, ja que la retenció d'aquestes proteïnes de baix pes molecular és superior en membranes de porus més petit i per tant, amb més superfície (Heinicke et al., 1992).

III.B.2.4.1.3.2 Elecció del fixador

El procés de fixació sembla ser un dels passos claus en el protocol de l'assaig Dot blot per a la detecció de MTs tal d'obtenir resultats homogenis i repetitius. En altres estudis s'ha vist, que la fixació a la membrana de la proteïna analitzada pot realitzar-se utilitzant diferents tipus de fixadors. Degut això, s'ha cregut necessària la realització d'assaigs previs per tal d'escollir el millor fixador pel tipus de mostra que es vol analitzar. Els fixadors utilitzats varen ser: (a) el gluteraldehid/etanolamina (Article 7), (b) el isopropanol/àcid acètic (Jahn et al., 1984) o (c) bé sense fixador. Així, han pogut ésser valuades les diferències d'efectivitat quan s'utilitzen diferents fixadors. Els resultats obtinguts indiquen que la detecció de quantitats petites de MT és més eficaç quan s'utilitza el gluteraldehid/etanolamina com a fixador. Així, podem dir, que la sensibilitat del mètode augmenta utilitzant el fixador esmentat anteriorment. En aquest cas, es detecta una quantitat de MT de 0.01 μg mentre que utilitzant el isopropanol/àcid acètic la quantitat mínima detectable és de 0.1 μg , que és el mateix nivell que es detecta quan no s'utilitza cap mena de fixador.

III.B.2.4.1.3.3 Repetitivitat i sensibilitat del mètode

La intensitat de banda corresponent a una mateixa quantitat de proteïna és molt semblant quan s'analitzen les MT dins una mateixa membrana. Això indicaria que el tractament a tota la membrana ha estat homogeni i que existeix una repetitivitat quan s'analitzen mostres, en aquest cas sobre una mateixa membrana.

S'han analitzat les bandes de cada una d'aquestes membranes mitjançant el programa densitomètric, per tal d'avaluar objectiva i quantitativament les diferències existents entre cada una de les repeticions. Després d'aquestes anàlisis, els errors estàndard de la mitjana són inferiors al 15%. Així mateix, les intensitats de banda d'una mateixa quantitat de proteïna en membranes diferents són semblants. Tot i que les diferents membranes estan subjectes a variacions durant tot procés de detecció (rentats, incubacions, etc), no s'observen variacions importants en els resultats obtinguts.

Per tal de verificar que l'anticòs monoclonal utilitzat reconeix correctament les MT de les mostres analitzades i que no existeixen interferències amb altres proteïnes, es va fer una avaluació de l'especificitat de l'anticòs i per tant, de l'efectivitat del mètode en qüestió. Així, es varen fer dilucions d'una mostra de proteïna estàndard MT i paral·lelament, es varen fer les mateixes dilucions a partir d'una de les mostres objecte del nostre estudi. Es va determinar que l'especificitat de l'anticòs era correcta.

III.B.2.4.1.3.4 Determinació de la quantitat de proteïna total a analitzar

Els resultats obtinguts indiquen que la quantitat de proteïna total a analitzar ha de ser al voltant de 10 µg. Tot i que la repetitivitat de les mostres s'aconsegueix en totes les quantitats de proteïnes analitzades, en la utilització de 5 - 10 µg de proteïna total existeix una quantitat de MT adequada per a la seva detecció. En general, la quantitat de MT continguda en la mostra, es detecta fàcilment però no en excés.

III.B.2.4.1.3.5 Avaluació dels factors que afecten al revelat

El protocol utilitzat pel revelat de les membranes ha estat establert per la casa comercial. Tot i això, s'han realitzat assaigs previs per tal d'optimitzar alguns dels factors segons les característiques de la mostra analitzada.

III.B.2.4.1.3.5.1 Efecte del temps transcorregut des de la reacció de l'enzim peroxidasa de l'anticòs i l'exposició a l'hyperfilm

Cal destacar que és de gran importància el control del temps transcorregut des de la reacció de l'enzim peroxidasa conjugat a l'anticòs primari amb el seu substrat luminol i l'exposició a l'hyperfilm autoradiogràfic. Així, es varen realitzar exposicions de 1 minut de l'hyperfilm autoradiogràfic després de 5, 15 i 30 minuts d'incubació de la membrana amb luminol. Els

resultats obtinguts demostren clarament que l'exposició l'hyperfilm sobre la membrana cal que sigui efectuada després de 5-10 minuts de l'exposició al luminol. Tot i que després de 15 i 30 minuts el senyal es detecta, conservant les seves proporcions d'intensitat, la màxima intensitat es troba després de 5 o 10 minuts. Així doncs, s'estableix en el protocol de treball que la membrana serà exposada després d'aquests temps a partir de la incubació.

III.B.2.4.1.3.5.2 Temps d'exposició de la membrana a l'hyperfilm autoradiogràfic

Un dels factors importants a tenir en compte és el temps d'exposició de la membrana al film autoradiogràfic. A mesura que augmenta l'exposició, les mostres de la membrana analitzada esdevenen més fosques. En les mostres que s'analitzen en aquest estudi, es troba present una gran quantitat de proteïna. Així, no és necessari fer exposicions de llarga durada per tal de detectar-les. Diferents proves preliminars han estat realitzades en aquest sentit (exposicions de 1/2, 1 i 5 minuts), obtenint els millors resultats després de 1 minut d'exposició. Tot i això, cal remarcar que aquests paràmetres s'estableixen en les condicions concretes en que es realitza l'assaig (això serà molt variable depenent la dilució d'anticòs utilitzada, la quantitat de proteïna introduïda, etc).

III.B.2.4.2. Anàlisi de les mostres. Descripció del protocol de treball.

El mètode d'anàlisi que s'utilitza per a l'avaluació de les proteïnes d'estrès ha estat descrit anteriorment de manera general en l'apartat III.1.2 d'aquest capítol. Nogensmenys, a continuació es descriu el protocol de treball seguit específicament per a l'anàlisi de les mostres objecte del nostre estudi després de la seva optimització.

III.B.2.4.2.1 Quantificació de proteïna total pel mètode Bradford

La quantitat de proteïna total de les mostres obtingudes va ser determinada mitjançant el mètode Bradford (Bradford, 1976), el qual ja ha estat descrit de manera general en l'apartat III.1.2.1. Tot i això, a continuació s'especifica el protocol de treball establert per quantificar les mostres analitzades en aquest treball. Les mostres objecte del nostre estudi varen ser digerides utilitzant NaOH 0.1M en una proporció 1:4 durant 3 h a temperatura ambient. Seguidament, una vegada finalitzat aquest tractament i degut a la gran quantitat de proteïna continguda en mostres que contenen cèl·lules sanguínies, va ser necessària la dilució d'aquestes en una proporció 1:10 utilitzant com a diluent l'aigua Milli-Q. Després d'això, es va seguir el protocol estàndard descrit anteriorment.

III.B.2.4.2.2 Avaluació de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès

III.B.2.4.2.2.1 Electroforesi SDS sobre gel de poliacrilamida

El mètode electroforètic que utilitza gels verticals de poliacrilamida amb SDS per a la separació de proteïnes segons el seu pes molecular (Laemmli, 1970) ha estat descrit globalment en l'apartat III.1.2.2 d'aquest mateix capítol.

Per tal d'analitzar les mostres d'aquest estudi, varen ser utilitzades concentracions de poliacrilamida del 4% i del 10% en els gels d'apilonament i de separació respectivament, per a l'òptima separació de les proteïnes analitzades que tenen un pes al voltant de 70 KDa. La composició i preparació dels gels utilitzats en aquest treball s'especifica en l'Annex 2.

Una vegada obtinguts el gels amb les butxaques necessàries (en els nostre cas utilitzant pintes de 15 butxaques), es varen carregar 10 µg de proteïna total de cada una de les mostres a analitzar (tal i com es va establir en la optimització del mètode de treball). Així mateix, es va carregar en cada un dels gels, el marcador de pes molecular d'espectre ampli que conté proteïnes de pes molecular entre 205 i 29 KDa. Cal esmentar que les mostres obtingudes han estat diluïdes en una proporció 1:4 amb el tampó de càrrega, la composició del qual es troba descrita anteriorment a l'annex 3. Seguidament, la migració electroforètica de les proteïnes a l'interior del gel de poliacrilamida es va realitzar durant 120 min a un voltatge constant de 160V, utilitzant el tampó electroforètic descrit anteriorment. Així, una vegada finalitzat aquest procés i abans de la realització del Western blot, es varen equilibrar els gels durant 1 h en el tampó de transferència de proteïnes. De la mateixa manera, la membrana de PVDF activada, el paper de transferència i el material necessari va ser tamponat amb el mateix tampó. L'activació de les membranes de PVDF es va realitzar abans de cada assaig seguint el següent procediment. Aquestes membranes varen ser submergides durant 30 segons en metanol i seguidament 2 min en aigua destil·lada. Una vegada finalitzat aquest procés es varen submergir durant 1 h en el tampó de transferència anteriorment esmentat.

III.B.2.4.2.2.2 Electrotransferència de proteïnes (Western blot)

El procés de transferència de proteïnes del gel electroforètic a la membrana de PVDF de porus 0.45 µm per el posterior l'anàlisi de les HSP70 s'especifica a continuació. Tal i com s'havia descrit anteriorment a l'apartat III.1.2.3, la disposició de les membranes es realitza de manera convencional. Cal especificar però, que en aquest cas, la transferència de proteïnes es realitza durant 2h a un voltatge constant de 130V. Durant el procés de transferència, és de gran importància la homogenització mitjançant agitació del tampó per tal d'obtenir una transferència de proteïnes homogènia en tota la membrana. Així mateix, cal evitar l'augment de temperatura del tampó ja que això podria donar lloc a la pèrdua de proteïnes durant la transferència. Una

vegada finalitzada la transferència de proteïnes a la membrana de PVDF, aquesta serà incubada amb diferents anticossos per tal de detectar específicament les proteïnes estudiades.

III.B.2.4.2.3 Immunodetecció de HSP70

La detecció de HSP70 contingudes en 10 µg de proteïna total es realitza utilitzant anticossos monoclonals específics per aquesta família de proteïnes, especificats a l'apartat de material i mètodes. Abans de fer la incubació amb l'anticossos monoclonals, la membrana és incubada en una solució 3% llet en PBS-T durant tota la nit a 4°C. Seguidament, es fa un rentat durant 30 minuts a agitació constant en solució PBS-T per tal de saturar de proteïna (BSA), tots aquells llocs de la membrana que no estan units a proteïna. Després d'això, la membrana es renta amb PBS-T durant 30 min amb agitació constant i seguidament s'incuba durant 2 h amb l'anticòs primari descrit a la Taula 8 en una proporció 1:10000, el qual reconeix específicament les HSP70 de la membrana en qüestió. Després d'aquesta incubació, es realitzen 3 rentats de 15 minuts en la solució PBS-T i es torna a incubar la mateixa membrana durant 2 h amb l'anticòs secundari descrit a la Taula 8 en una proporció 1:10000. Aquest anticòs reconeix específicament el primer, el qual està unit a la proteïna analitzada.

Una vegada acabat aquest procés, es procedeix al revelat d'aquesta membrana a partir de la detecció de l'anticòs secundari. La membrana s'incuba durant 5 minuts en una solució corresponent al substrat de la peroxidasa, que és l'enzim que porta conjugat l'anticòs secundari. Aquesta solució s'aconsegueix a partir de la barreja de dos productes de revelat (Luminol enhancer solution i Stable peroxide solution) en una proporció 1:1. Finalment, aquesta membrana es posa en contacte amb un film autoradiogràfic, de manera que els fotons impressionin el film sensible a la llum. El temps de contacte del film autoradiogràfic amb la membrana de PVDF és de 1 min (tal i com s'ha descrit en l'apartat de l'optimització). Després de la impressió del film es procedeix al revelat que consisteix en submergir-lo en el revelador convencional Rodinal (Agfa) durant 1 min i seguidament amb la fixació d'aquest utilitzant el fixador convencional Agefix (Agfa). Els temps d'incubació.

III.B.2.4.2.3 Assaig Dot blot per a la detecció directe de MTs

Es dipositen sobre les membrana seques els volums apropiats de cada una de les mostres objecte del nostre estudi per tal d'obtenir una quantitat de proteïna total constant en totes les mostres analitzades, en aquest cas de 5 µg (tal i com es va establir en el procés d'optimització). D'aquesta manera, es pot avaluar la quantitat de MT de cada una de les mostres en una quantitat constant de proteïna. Val a dir, que el fet que en el nostre estudi s'analitzin mostres amb un contingut proteic elevat, es va decidir fer una dilució 1:4 de les mostres utilitzant aigua de qualitat Milli-Q.

Després de deixar assecar les mostres dipositades sobre la membrana durant tota la nit per tal d'aconseguir l'adhesió de les proteïnes sobre la membrana i evitar-ne la pèrdua, es comença el procés de fixació de les proteïnes sobre aquesta membrana. El procés de fixació consisteix en la incubació de les membranes durant 1h amb glutaraldehid 2.5%, en dos rentats de de 5 min amb PBS 0.01M i en l'incubació en PBS-etanolamina 3% durant 10 minuts (descriu com a procés de fixació més apropiat durant l'optimització del mètode). Una vegada fixades les proteïnes, es saturen els llocs específics de la membrana amb la incubació durant 30 min amb PBS-T 3% llet (que conté BSA). Cal remarcar, que en aquest protocol de treball, els rentats i les incubacions de la membrana es redueixen al mínim per tal d'evitar la pèrdua de les MT, que tenen un baix pes molecular i per tant menys capacitat de retenció a la membrana.

Una vegada saturada la membrana, aquesta és incubada durant 1 h amb l'anticòs primari descrit a la Taula 8 en una proporció 1:4000, el qual reconeix específicament les MTs fixades a la membrana en qüestió. Després d'aquesta incubació, es realitzen els rentats de la membrana en la solució PBS-T (5 min x 10 min x 5 min) i es torna a incubar durant 1 h amb l'anticòs secundari descrit a la Taula 8 en una proporció 1:20000, el qual reconeix específicament l'anticòs primari unit a la proteïna objecte del nostre estudi. Una vegada acabat aquest procés, es procedeix al procés de revelat de la membrana descrit a l'apartat III.1.2.5 d'aquest mateix capítol.

III.B.2.4.3 Representació dels resultats i tractament de dades

Els resultats d'expressió de les HSP70s obtinguts per a cada un dels tractaments realitzats utilitzant els protocols de treball descrits anteriorment es presenten en tots els casos en relació al control negatiu. D'aquesta manera, es coneix la sobreexpressió de les proteïnes respecte els nivells basals de l'organisme.

En aquest estudi, les concentracions llindar (C_{LL}) han estat determinades per a cada una de les agressions ambientals assajades. La concentració llindar es defineix com la concentració de substància contaminant o agent químic, la qual indueix la primera variació significativa en els nivells d'expressió de proteïnes d'estrès en comparació amb els controls. Les diferències significatives o no, s'avaluen mitjançant l'anàlisi estadística descrita a l'apartat I.2.7. Així mateix, també es posa de manifest, la concentració que provoca una inducció màxima d'aquestes proteïnes.

III.B.2.4.3.1 Anàlisi de HSP70: distribució de les mostres analitzades i tractament de dades

A l'hora d'avaluar l'expressió de les proteïnes d'estrès de les mostres d'un mateix experiment, va ser necessària la realització de diversos assaigs experimentals degut a la gran quantitat de mostres (en la majoria dels casos 30). Degut això, va ser necessari distribuir aquestes mostres de manera estratègica pel posterior tractament dels resultats. La Taula 11 es presenta un

exemple, corresponent a un dels experiments realitzats, on es poden veure els diferents tractaments aplicats i les mostres analitzades, corresponents cada una d'elles a peixos independents.

Taula 11 Tractaments i mostres representatives de qualsevol dels experiments realitzats.

Tractament aplicat	Nº de mostra (peixos independents)
Sense tractament (ST)	1,2,3,4,5
Tractament 1 (T1)	6,7,8,9,10
Tractament 2 (T2)	11,12,13,14,15
Tractament 3 (T3)	16,17,18,19,20
Tractament 4 (T4)	21,22,23,24,25
Tractament 5 (T5)	26,27,28,29,30

Així, a l'hora d'analitzar aquestes mostres, ha estat necessària una distribució estratègica d'aquestes mostres en les diferents membranes, tal i com es presenta a la Taula 12.

Taula 12 Distribució de totes les mostres d'un experiment en diferents membranes.

	ST	T1	T2	T3	T4	T5
Membrana A:	1-2-3-4-5-	6-6-	11-11-	16-16-	21-21-	26-26
Membrana B:	1-2-3-4-5-	7-7-	12-12-	17-17-	22-22-	27-27
Membrana C:	1-2-3-4-5-	8-8-	13-13-	18-18-	23-23-	28-28
Membrana D:	1-2-3-4-5-	9-9-	14-14-	19-19-	24-24-	29-29
Membrana E:	1-2-3-4-5-	10-10-	15-15-	20-20-	25-25-	30-30

Tal i com es pot veure en aquesta taula, en cada una de les membranes obtingudes després de la realització del procés experimental, hi ha totes les mostres sobre les quals no s'ha aplicat cap tractament (ST) i una mostra de cada un dels tractaments aplicats per duplicat. D'aquesta manera, gràcies a la presència dels mateixos controls negatius en totes les membranes (mostres on no s'ha aplicat cap tractament), les mostres corresponents als diferents tractaments aplicats han pogut ésser comparades.

III.B.2.4.3.2 Anàlisi de MTs: distribució de les mostres analitzades i tractament de dades

L'assaig Dot blot, a diferència del mètode electroforètic, permet l'anàlisi simultània de moltes mostres sobre una mateixa membrana. Així, per tal d'evitar variacions entre membranes, es varen analitzar el màxim de mostres possibles a la mateixa membrana.

La quantificació de l'expressió de MTs en cada una de les mostres va efectuar-se a partir de la lectura de la densitat dels dots, utilitzant un densitòmetre (Quantity One v 2.2.2, Bio-Rad, USA). Així, una vegada obtingudes les densitats del les bandes de les tres membranes analitzades, va ser necessària una correcció d'aquestes dades degut a les variacions existents entre les membranes. Per tal de solucionar aquest problema, igual que amb les HSP70s, es va fer un tractament de les dades i es varen presentar els valors relatius al blanc. Aquest tractament de resultats ja havia estat utilitzat per altres autors (Dietz i Somero, 1992; Currie et al., 1997). Tal i com ja s'ha explicat anteriorment, el tractament de dades consisteix en la relativització de les

densitats d'aquelles bandes comunes de les diferents membranes analitzades, a les densitats d'aquelles bandes comunes d'una d'aquestes membranes. En el nostre cas, les bandes comunes corresponen a aquelles bandes on no s'havia aplicat cap tractament.

III.B.2.5 Anàlisi estadístic dels resultats

Una vegada obtinguts els resultats es varen analitzar estadísticament les diferències existents entre els diferents tractaments, les diferents concentracions analitzades i els diferents temps d'exposició.

III.B.2.5.1 Efecte de la concentració de metall. Test student.

Per tal de determinar si existeixen diferències significatives, en quant a la sobreexpressió de proteïnes d'estrès, entre les diferents concentracions dels metalls estudiades, es varen analitzar estadísticament les dades obtingudes utilitzant el test de *Student*. En aquest cas, aquesta anàlisi s'ha anat realitzant successivament amb cada una de les concentracions analitzades i pels diferents tipus d'agressions per tal de conèixer (1) quina és la concentració lliandar de cada un dels metalls analitzats, (2) si existeixen diferències entre les diferents concentracions de metall analitzades i (3) si existeixen diferències significatives entre metalls. També es va fer per (4) determinar l'efecte dels diferents temps de recuperació analitzats i en els diferents tipus d'agressions.

III.B.2.5.2 Efecte del temps d'exposició. Test Student de dades aparellades.

Per tal de determinar si existeixen diferències significatives en la sobreexpressió de proteïnes d'estrès entre els diferents temps d'exposició realitzats es varen analitzar les dades obtingudes estadísticament utilitzant el test t de dades aparellades. Aquest experiment es caracteritza per utilitzar mostres dels mateixos individus en els dos tractaments efectuats (en aquest cas 1 i 2 hores d'exposició). Gràcies a aquesta característica ha estat possible realitzar un anàlisi molt més sensible que l'anterior. El test t de dades aparellades no es base en l'avaluació de les diferències existents entre les mitjanes de dos tractaments sinó que avalua si la mitjana de les diferències trobades entre cada un dels individus exposats als dos tractaments són aproximadament 0. En aquest cas, quan es comparen els % de sobreexpressió de HSP70 després de 1 i 2 hores d'exposició, es defineixen les hipòtesis de la següent manera:

$$H_0: \mu = 0$$

$$H_a: \mu_1 \neq 0$$

on μ és la mitjana de les diferències entre els dos tractaments realitzats, essent similar a 0 quan no s'observen diferències significatives entre els dos tractaments (H_0) o significativament diferent de 0 quan es tracta de tractaments que provoquen un efecte diferent (H_a).

III.B.3 RESULTATS

A continuació es presenten els resultats obtinguts en aquest estudi en l'article científic inclòs a continuació, el qual està en procés de revisió a la revista *Journal of Fish Biology*.

En aquest article es presenten els resultats de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès en cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba* després de l'exposició d'aquestes a diferents concentracions de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI). Aquests resultats han estat obtinguts mitjançant l'aplicació de les tècniques optimitzades anteriorment.

Article 8. Fulladosa, E., Deane, E, AHY. Ng, Woo NYS and Villaescusa, I. "Stress proteins expression in *Sparus sarba L.* blood cells after exposure to cadmium, lead and chromium. *Journal of fish biology* (enviat per publicació)

Abstract .- Blood cells freshly collected from silver sea bream were exposed in vitro to different concentrations of cadmium, lead or chromium(VI). HSP70 stress protein was significantly overexpressed after exposure to metal concentration as low as 0.1 μ M. Under our experimental conditions no overexpression of metallothioneins was evidenced. Nevertheless, fish blood cells appear as an interesting biological model for experimental toxicology.

Keywords.- fish blood cells, stress proteins, heavy metals

III.B.4 DISCUSSIÓ

La recerca de nous models biològics, cada vegada més sensibles, ens ha portat a la utilització de cultius primaris de cèl·lules sanguínies de peix, concretament d'*Sparus sarba* (cèl·lules primàries amb les característiques metabòliques no alterades i que són obtingudes sense necessitat de la mort de l'animal).

Aquests cultius han demostrat ser un bon model biològic per a l'estudi de les agressions per metalls pesants mitjançant l'anàlisi de la sobreexpressió de proteïnes d'estrès (HSP70). Aquest model biològic és molt sensible per a la detecció de concentracions molt petites de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI) ja que la primera resposta a nivell molecular d'aquestes cèl·lules davant d'aquest agressor es troba a concentracions de 0.1 μ M. En aquests estudi, ha quedat demostrat que aquest tipus cel·lular és capaç de sobreexpressar les HSP70 davant l'agressió de metalls pesants. Així mateix, també podem afirmar que les cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba* són capaces de sintetitzar les proteïnes HSP70 constitutivament en condicions normals. En el cas de les Metal·lotioneïnes, a diferència de les HSP70, no s'ha observat un augment de la seva sobreexpressió en cap dels tractaments realitzats.

Cal destacar que un inconvenient important d'aquest assaig és la variabilitat de les dades obtingudes degut a factors intrínsecs dels organismes utilitzats.

DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS

DISCUSSIÓ GENERAL

En global, els resultats obtinguts en aquest estudi sobre la toxicitat de metalls pesants i arsènic en diferents models biològics (el bacteri *Vibrio fischeri*, cultius de la línia cel·lular establerta HT29 i cultius primaris de cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba*) posa de manifest una gran variació de la sensibilitat d'aquests organismes davant els diferents agents agressors analitzats.

Els diferents assaigs de toxicitat, cada un dels quals utilitzen diferents models biològics i l'anàlisi de diferents paràmetres, donen un tipus d'informació diferent, de més o menys significància ecològica, amb els seus avantatges i inconvenients, i una sensibilitat molt variable.

Aquestes variacions en la sensibilitat entre els diferents bioassaigs són en part degudes a les diferents condicions en què es realitza l'assaig. Factors com el pH, la composició del medi d'assaig, el temps d'exposició i les interaccions que poden produir-se entre diferents ions metàl·lics presents en el medi poden modificar substancialment la toxicitat de les solucions estudiades. El gran efecte del pH queda demostrat en les grans variacions de toxicitat observades quan s'analitzen solucions de cromat, arsenat i arsenit ajustades a diferents pHs utilitzant l'assaig Microtox (Article 1, Article 3, Capítol de llibre 1). Les variacions de toxicitat degudes a la composició del medi d'assaig també queden reflectides en els Capítol de llibre 1 i 3 (presentats a l'Annex 3). Tant la composició del medi de cultiu com el pH, poden modificar la proporció de les diferents espècies químiques en solució i com a conseqüència provocar canvis importants en la toxicitat que produeix l'agent agressor. La presència o no de molècules orgàniques en el medi de cultiu també és important ja que l'adsorció dels ions metàl·lics per part d'aquestes molècules, la formació de complexos orgànics o la presència de diferents espècies químiques pot influir considerablement en la disponibilitat del metall, facilitant o dificultant la seva entrada a l'interior de l'organisme en qüestió (Article 4). Les interaccions sinèrgiques i antagonístiques que es produeixen entre metalls (Article 2), entre diferents espècies d'un mateix element (Article 3) i entre metalls i extractes solubles de fang (Article 7) tornen a posar de manifest la importància de la composició i la presència d'altres ions metàl·lics o molècules orgàniques en el medi de cultiu. Amb aquests estudis es posa de manifest la importància d'utilització de bioassaigs de toxicitat a més de l'anàlisi química de les mostres. D'altra banda, la temperatura pot augmentar o disminuir l'activitat metabòlica de l'organisme, augmentant o disminuint la resposta a l'agent agressor (p.e. 20°C pel bacteri *Vibrio fischeri* o *Sparus sarba*; 37°C pels cultius establerts de cèl·lules humanes). El temps d'exposició també és de gran importància ja que el temps necessari per induir una resposta als diferents paràmetres estudiats és molt variable (p.e. minuts per a la inhibició de l'emissió lumínica o sobreexpressió de HSP o dies per a la inhibició del creixement o la sobreexpressió de les MT).

Nogensmenys, el que més determinarà la sensibilitat d'un bioassaig és el model biològic que aquest utilitza com a organisme prova. Si comparem la sensibilitat dels diferents assaigs de toxicitat utilitzats en aquest treball per avaluar la toxicitat del cadmi, crom hexavalent i arsenat, es pot veure que existeixen grans diferències de sensibilitat depenent de l'agent agressor analitzat (Article 4).

Taula 13. Comparació de les EC20 (μM) obtingudes utilitzant diferents bioassaigs.

Metalls		Cd(II)	Cr(VI)	As(V)
Microtox (15 min) pH 6.0		34.6	973	24.8
Assaig d'inhibició del creixement (24 h)		>2000	500	>2000
Assaig d'inhibició de la viabilitat (24 h)		192	315	>2000
HT29	Assaig d'inhibició del creixement (6h)	50 ¹	-	133 ¹
	HSP72i (6 h)	10 ¹	10 ¹	133 ¹
Cèl·lules sanguínies - HSP70 (1 h)		0.1	0.1	-

¹Resultat obtinguts per Delmas et al 1996, 1998. – no determinat.

En el cas del Cd(II), la detecció més sensible s'observa en cultius primaris de cèl·lules sanguínies (0.1 μM) (Article 8) i en cultius cel·lulars establerts de la línia cel·lular HT29 (10 μM) analitzant la sobreexpressió de proteïnes d'estrès. Aquesta alta sensibilitat, podria ser en part deguda al tipus d'assaig que s'utilitza ja que la manca de protecció de les cèl·lules en cultius *in vitro* podria facilitar l'entrada de la substància tòxica a l'interior de la cèl·lula. Per aquest metall, l'anàlisi de la inhibició de l'emissió lumínica utilitzant l'assaig Microtox també és força sensible (34.6 μM). Pel contrari, els assaigs realitzats a nivell cel·lular utilitzant els assaigs d'inhibició de la viabilitat i del creixement necessiten de concentracions molt més elevades per produir una inhibició del 20% del paràmetre analitzat (192 i >2000 μM , respectivament).

Cal destacar que, en general, són els paràmetres a nivell molecular com la inhibició de l'emissió lumínica i la sobreexpressió de proteïnes d'estrès els que donen una resposta més ràpida a concentracions més febles (Capítol de llibre 2). És per això, que en estudis posteriors a aquesta Tesi s'avaluarà la sobreexpressió de proteïnes d'estrès en *Vibrio fischeri* per tal de determinar i desenvolupar un nou assaig utilitzant el bacteri de l'assaig Microtox però analitzant un paràmetre a nivell molecular diferent al de l'assaig Microtox. Aquests, són normalment els paràmetres més útils per a detectar els primers efectes de les substàncies contaminants al medi ambient (detecció precoç de la contaminació ambiental).

En el cas de l'As(V), la màxima eficiència de detecció si comparem els EC20 es troba utilitzant l'assaig Microtox (inhibició de la inhibició lumínica). Tal i com es pot veure a la Taula 13, els altres assaigs de toxicitat necessiten concentracions molt més elevades d'aquest metal·loide per produir el mateix efecte. Nogensmenys, tot i que utilitzant l'assaig Microtox, l'arsenat produeix

un primer efecte (20% d'inhibició lumínica) a una concentració de 24.8 μM , un augment de la concentració (fins a 2000 μM) no arriba a produir un 50% d'inhibició lumínica quan les solucions estan ajustades a pH 6.0. Així doncs, tenint en compte aquest fet i els resultats dels assaigs d'inhibició de la viabilitat i del creixement presentats en la Taula 13, queda demostrat que el bacteri *Vibrio fischeri* té una gran tolerància als ions arsenat. El mecanisme de resistència pel qual aquest bacteri és tant tolerant, s'investigarà properament en el nostre laboratori.

En el cas del Cr(VI), s'observa altra vegada una gran sensibilitat per part dels cultius cel·lulars *in vitro* en contrast amb la baixa toxicitat trobada utilitzant els assaigs bacterians. Aquesta tolerància al Cr(VI) podria ser deguda a la demostrada capacitat del bacteri *Vibrio fischeri* per reduir el Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III) (Article 5).

Ateses les diferències de sensibilitat entre organismes i les variacions de toxicitat que provoquen els factors esmentats anteriorment, serà necessari utilitzar sempre una bateria d'assaigs que utilitzi diferents models biològics representatius d'un ampli rang d'organismes de l'ecosistema. Aquesta dificultat de comparació i la necessitat d'una bateria d'assaigs ja es va posar de manifest en el Capítol de llibre 3 presentat a l'Annex 3 d'aquesta memòria. En aquest article s'acaba conclouent, igual que en aquest estudi, que una bateria d'assaigs és sempre necessària per avaluar acuradament la toxicitat d'una mostra ambiental o un determinat agent agressor. Aquesta bateria d'assaig ha d'estar composta d'organismes de diferents nivells tròfics i utilitzar diferents tipus de paràmetres indicadors d'agressions tant a nivell cel·lular com molecular. A més a més, els bioassaigs escollits han de ser fàcils de portar a terme, ràpids i amb un cost no excessiu.

CONCLUSIONS

En general, dels estudis realitzats en aquesta Tesi podem concloure que:

- L'assaig Microtox, en general, és eficient per avaluar la toxicitat de metalls i metal·loides tot i la manca de sensibilitat d'aquest bioassaig davant algun d'aquests elements en determinades condicions de treball.
- Les corbes dosi-resposta dels metalls estudiats han estat determinades utilitzant l'assaig Microtox. La majoria dels metalls presenten una corba exponencial negativa amb un pendent més o menys pronunciat. En el cas del mercuri i l'argent, apareix una inhibició de la llum molt important en un rang de concentracions molt petit. Nogensmenys, en el cas de l'As(V) a pH 6.0, no s'aconsegueix una inhibició de l'emissió lumínica completa.
- Concretament, quan s'utilitza l'assaig Microtox, els valors d'EC20 després de 15 min d'exposició, tenint en compte el pH del medi (pH 6.0) i utilitzant el medi 0.34M NaCl, augmenten de menor a major amb el següent ordre: Pb(II) < Hg(II) = Cu(II) < Zn(II) < As(V) < Cd(II) < Co(II) < As(III) < Cr(VI). En general, variacions d'una unitat de pH (pH 6.0 - 7.0) no provoquen variacions importants de la toxicitat de les dissolucions metàl·liques analitzades excepte en el cas del Cr(VI) i As(V).
- En quant als límits oficials d'abocament màxim de metalls en aigües industrials podem afirmar que l'assaig Microtox és adequat per detectar les concentracions de Zn(II), Pb(II), Cu(II) però no és prou sensible per detectar les concentracions de Hg(II), Cd(II), Cr(VI), As(V) i As(III).
- La toxicitat de mostres que contenen metalls pesants o metal·loides pot estar influenciada pel pH i la composició del medi on es troben ja que l'especiació química d'aquests pot variar en funció d'aquests paràmetres. En el cas del crom hexavalent, la toxicitat del Cr(VI) augmenta amb la disminució del pH, essent l'espècie HCrO_4^- (predominant a pHs àcids) la més tòxica. Pel contrari, en el cas del As(V) i As(III), la toxicitat és bàsicament deguda a HAsO_4^{2-} i HAsO_3 , respectivament (predominants a pHs bàsics). En el cas del Cd(II), la toxicitat varia molt en funció de la concentració i tipus d'ió del medi de cultiu (clorurs, nitrats, etc.).
- Les interaccions entre diferents metalls en mescles binàries equitòxiques, ajustades a pH 6.0 i en 0.34M NaCl han estat avaluades. En mescles binàries de Co-Cd, Cd-Zn, Cd-Pb i Cu-Pb es produeixen interaccions antagonístiques entre els metalls de la mescla mentre que en les mescles binàries de Co-Cu i Zn-Pb es produeixen interaccions sinèrgiques. En mescles binàries de Co-Pb, Cu-Cd, Cu-Zn i Co-Zn existeix un efecte additiu. També es produeix un

antagonisme entre les dues espècies d'arsenat, H_2AsO_4^- i HAsO_4^{2-} , presents en diferents proporcions en solucions ajustades a pH 6.0 i 7.0.

- La baixa toxicitat trobada per alguns metalls utilitzant l'assaig Microtox no és deguda a temps d'exposició curts ja que en assaigs de toxicitat crònica (assaig d'inhibició de la viabilitat i assaig d'inhibició del creixement), la toxicitat també és baixa. Només en el cas del Cr(VI), i concretament utilitzant l'assaig d'inhibició de la viabilitat, s'obtenen valors EC50 inferiors als trobats amb l'assaig Microtox (més sensibilitat). Les alteracions morfològiques produïdes pels diferents metalls també són diferents depenent del metall que s'analitzi. També cal destacar que, en el cas del cadmi, es detecta un efecte d'hormesis a concentracions febles de metall en els assaigs bacterians de toxicitat crònica utilitzats.
- En el cas de l'As(V), cap dels bioassaigs utilitzats és prou sensible, essent impossible determinar els valors EC50 degut a la manca de toxicitat. En aquest cas, les anàlisis morfològiques indiquen que hi ha una recuperació del bacteri després de 6 hores d'exposició a l'arsenat, la qual cosa corrobora la manca de toxicitat trobada en els anteriors bioassaigs.
- La baixa toxicitat que provoca el crom hexavalent sobre *Vibrio fischeri* s'atribueix a la capacitat d'aquest bacteri per reduir les espècies més tòxiques de Cr(VI) a formes menys tòxiques de Cr(III). La capacitat reductora del bacteri depèn de la composició del medi de cultiu, de la concentració inicial de Cr(VI), del temps d'incubació i de la font de carboni. A més, depenent de la font de carboni present en el medi de cultiu s'observen dos tipus de reducció; una reducció lligada a les cèl·lules (en el cas dels medis de cultiu suplementats amb glicerol) i una reducció extracel·lular no enzimàtica (en el cas dels medis de cultiu suplementats amb glucosa).
- Els cultius establerts de cèl·lules humanes, concretament la línia cel·lular HT29, són un model biològic sensible i adient per a ser utilitzat en estudis de toxicologia ambiental ja que responen ràpidament a les agressions produïdes per metalls pesants, extractes solubles de fangs conjunta i separadament amb metalls pesants i altres substàncies contaminants.
- La resposta de la línia cel·lular HT29, a nivell cel·lular i molecular, és satisfactòria davant dels fangs analitzats. A nivell cel·lular, s'observa un efecte bifàsic: una estimulació a concentracions petites d'extractes de fangs i una inhibició a concentracions més elevades. En les mostres que contenen metalls pesants i l'extracte soluble dels fangs apareix, en alguns casos, un sinergisme entre els dos components de la mostra produint una toxicitat més elevada que si s'analitzessin separadament. A nivell molecular, també s'observa aquest sinergisme ja que es detecta una sobreexpressió dels biomarcadors moleculars analitzats, les HSP70 i les metal·lotioneïnes. Ateses les possibles interaccions que es produeixen entre aquests metalls i els extractes solubles de fang, es pot afirmar que l'anàlisi química de la

composició dels fangs no és suficient per avaluar la toxicitat potencial d'aquests i posa de manifest la necessitat de treballar amb bioassaigs de toxicitat.

- Els cultius primaris de cèl·lules sanguínies d'*Sparus sarba* són un model biològic sensible i eficient per detectar les agressions produïdes per metalls. Es detecta una sobreexpressió de HSP70 en cèl·lules exposades a concentracions de Cd(II), Pb(II) i Cr(VI) tan baixes com 0.1 μ M. No s'ha detectat una sobreexpressió significativa de metal·lotioneïnes probablement degut al curt temps d'exposició.

En general, dels resultats obtinguts es desprèn que els assaigs de toxicitat que mesuren paràmetres a nivell molecular són més sensibles que els que analitzen paràmetres a nivell cel·lular o d'organisme.

Finalment, podem concloure que una bateria de bioassaigs és necessària per a l'avaluació acurada de la toxicitat d'una determinada mostra ja que existeixen variacions importants en funció del model biològic utilitzat i molts factors ambientals poden modificar la toxicitat de la mostra.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

A

Abukhalaf, I., Covington, S., Zimmerman, E., Dickson, K., Masaracchia, R., Donahue, J. 1994. Purification of the 70-kDa heat shock protein from catfish liver: immunological comparison of the protein in different fish species and its potential use as a stress indicator. *Environmental toxicology and chemistry* 13 (8):1251-1257.

Accoto, GP., Vaira, AM., Noris, E., Vecchiati, M. 1998. Using non-radioactive probe on plants: a few examples. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 13:295-301.

Ackerman, PA., Forsyth, RB., Mazur, CF., Iwama, GK. 2000. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. *Fish physiology and biochemistry* 23:327-336.

Akahori, A., Gabryelak, T., Józwiak, Z., Gondko, R. 1999. Zinc-induced damage to carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocytes in vitro. *Biochemistry and molecular biology international* 47 (1) 89-98.

Alvarez, AH., Moreno-Sanchez, R., Cervantes, C. 1999. Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 181 (23) 7398-7400.

Anadu, DI., Chapman, GA., Curtis, LR., Tubb, RA. 1989. Effect of zinc exposure on subsequent acute tolerance to heavy metals in Rainbow trout. *Bulletin of Environmental contamination and toxicology* 43:329-336.

Aspholm, OO., Hylland, K. 1998. Metallothionein in green sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) as a biomarker for metal exposure. *Marine Environmental Research* 46:537-540.

B

Babia, T., Denis-Pouxviel, C., Murat, JC., Gomez-Foix, AM., Trocheris, V., Guinovart, JJ., Bosch, F. 1989. Insulin controls key steps of carbohydrate metabolism in cultured HT29 colon cancer cells. *Biochemical Journal* 261:175-179.

Backhaus, T., Froehner, K., Altenburger, R., Grimme, LH. 1997. Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24h) and the short term (30 min) bioassay. *Chemosphere* 35 (12) 2925-2938.

Baird, DJ., Barber, I., Bradley, M., Calow, P., Soares, A. 1989. The *Daphnia* bioassay: a critique. *Hydrobiologia* 188/189:403-406.

Barnett, T., Altschuler, M., McDaniel, CN., Mascarenhas, JP. 1980. Heat shock induced proteins in plant cells. *Developmental Genetics* 1, 331-340.

Bauda, P., Block, JC. 1990. Role of envelopes of Gram-negative bacteria in cadmium binding and toxicity. *Toxicity assessment: an international journal* 5:47-60.

Bauman, JW., Liu, J., Klaassen, CD. 1993. Production of metallothionein and heat shock proteins in response to metals. *Fundamental and applied toxicology* 21, 15-22.

Berglund, R., Dave, G. 1984. Acute toxicity of chromate, DDT, PCP, TPBS and zinc to *Daphnia magna* cultured in hard and soft water. *Bull environ contam toxicol* 33:63-68.

Beveridge, TJ., Murray, RGE. 1976. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 127 (3):1502-1518.

Bitton, G., Freihofer, V., 1978. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microbial ecology* 4:119-125.

- Boleas, S., Carbonell, G., Fernández, C., Carballo, M., Ortiz, JA., Tarazona, JV. 1998. Comparison between stress response and toxicant exposure biomarkers in gilthead sea bream, *Sparus aurata* exposed to cadmium, malathion and/or orochlor. *Marine Environmental Research* 46:122-123.
- Bopp LH, Erhlich HL. 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Archives of microbiology* 150:426-431.
- Bourgois, JJ., Sluse, FE., Baguet, F., Mallefet, J. 2001. Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 33 (4):33-363.
- Bournias-Vardiabasis, N., Buzin, C., Flores, J. 1990. Differential expression of heat shock proteins in *Drosophila* embryonic cells following metal ion exposure. *Experimental cell research* 189:177-182.
- Boutillier, RG., Ferguson, RA. 1989. Nucleated red cell function: metabolism and cell regulation. *Canadian Journal of zoology* 67:2986-2993.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical biochemistry* 72:255-260
- Brito-Ingles, A., Ferri, S. 1982. Cadmium induced intercellular junction modifications in hepatocytes of freshwater teleost. *Zoologischer Anzeiger* 208: 3/4, 269-275.
- Brown, TJ., Jardine, J., Isan, CA. 1992. Antibodies against *Haemophilus ducreyi* heat shock proteins. *Microbial pathology* 15, 131-139.
- Buchet, J., Hoet, P., Haufroid, V., Lison, D. 1999. Consistency of biomarkers of exposure to inorganic arsenic: Review of recent data. In: Chappell, CO Abernathy and RL Calderon (editors). Arsenic exposure and health effects, Elsevier science.
- Bulich, A. 1986. Toxicity testing using microorganisms. Florida, CRC Press, Inc.
- Bulich, A. 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In: Aquatic toxicology ASTM 667, L.L. Markings y R.A Junerke eds. *American Society for testing and materials* 98-106.
- Burgess, D., Frerichs, N., George, S. 1993. Control of metallothionein expression by hormones and stressors in cultured fish cell lines. *Marine environmental research* 35: 25-28.
- Burkhardt-Holm, P., Schmindt, H., Meier, W. 1997. Heat shock protein (hsp70) in brown trout epidermis after sudden temperature rise. *Comparative biochemistry and physiology Part A* 120:35-4.
- C**
- Cai, J., Dubow, MS. 1997. Use of luminescent bacterial biosensor for biomonitoring and characterisation of arsenic toxicity of chromated copper arsenate. *Biodegradation* 8:105-111.
- Campbell, CD., Warren, A., Cameron, CL., Hope, S. 1997. Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan *Colpoda steinii* bioassay. *Chemosphere* 34, 3, 501-514.
- Campos, J., Martinez-Pacheco, M., Cervantes, C. 1995. Hexavalent chromium reduction by a chromate resistant *Bacillus* sp strain. *Antonie Van Leeuwenhoek* 6 (3):203-208.
- Carbell-Barrachina, A., Burló, F., Valerao, D., Lopez, E., Martínez Romero, D., Martínez-Sánchez, E. 1999. Arsenic toxicity and accumulation in Turnip as affected by arsenic chemical speciation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47 (6):228-2294.

- Carlson-Ekval, A., Morrison, G. 1995. Contact toxicity of metals in sewage sludge: Evaluation of alternatives to sodium chloride in de Microtox assay. *Environmental toxicology and Chemistry* 14:17-22.
- Carpéné, C., Paris, H., Cortinovic, C., Viillard, V., Murat, JC. 1983. Characterisation of α -adrenergic receptors in the human colon adenocarcinoma cell line HT29 in culture by ^3H -yohimbine binding. *General. Pharmacology* 14:701-703.
- Carvalho, C., Sobreiro Selistre, H., Narciso Fernandez, M. 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137:225-234.
- Castillo, G., Vila, I., Neild, E. 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology* 15:370-375.
- Cervantes, C. 1991. Bacterial interactions with chromate. *Antonie van Leeuwenhoek* 59, 229-233.
- Cervantes, C., Silver, S. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27, 65-71.
- Cézar, JP., Forgue-laffitte, ME., Chamblier, MC., Rosselin, G.E. 1981. Growth promoting effect, biological activity and binding of insulin in human intestinal cancer cells in culture. *Cancer Research* 41:1148-1153.
- Chen, BY., Liu, HL., Chen, YW., Cheng, YC. 2004. Dose-response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1. *Process biochemistry* 39:735-745.
- Cherian, MG., Howell, SB., Imura, N., Klaassen, CD., Koropatnick, J., Lazo, JS., Waalkes, M.P. 1994. Contemporary issues in Toxicology. Role of Metallothionein in carcinogenesis. *Toxicology and applied pharmacology* 126:1-5.
- Choi, K., Meier, PG. 2001. Toxicity evaluation of metal plating wastewater employing the Microtox assay: A comparison with cladocerans and fish. *Environmental Toxicology* 16:136-141.
- Chubatsu, L.S., Meneghini, R. 1993. Metallothioneins protects DNA from oxidative damage. *Biochemistry Journal* 291:193-198.
- Cole, LJ., McCracken, DI., Foster, GN., Aitken, MN. 2001. Using Collembola to assess the risks of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land in western scotland. *Agriculture, ecosystems and environment* 83, 177-189.
- Corpe, WA. 1975. Metal-binding properties of surface materials from marine bacteria. In: *Development in Industrial microbiology* 16(24):249-255.
- Couvineau, A., Rousset, M., Laburthe, M. 1985. Molecular identification and structural requirement of vasoactive intestinal peptid (VIP) receptors in the human colon adenocarcinoma cell line, HT29. *Biochemical Journal* 231:139-143.
- Cox RD. 1997. Applied statistics: principles and examples. Chapman and Hall, London, UK.
- Crouau, Y., Gisclard, C., Perotti, P. 2002. The use of *Folsomia candida* (*Collembola, Isotomidae*) in bioassays of waste. *Applied Soil ecology* 19, 65-70.
- Croute, F., Beau, B., Arrabit, C., Gaubin, Y., Delmas, f., Murat, JC., Soleilhavoup, JP., 2000. Patterns of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short or long-term exposure to cadmium. *Environmental health perspectives* 108 (1):55-60.
- Cullen, WR., Reimer, KJ. 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev* 89:713-764.
- Currie, S., Moyes, CD., Tufts, BL. 2000. The effects of heat shock and acclimatation temperature on Hsp70 and Hsp30 mRNA expression in rainbow trout: *in vivo* and *in vitro* comparasions. *Journal of fish biology* 56:398-408.

Currie, S., Tufts, B. 1997. Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*onchorhynchus mykiss*) red blood cells. *Journal of experimental biology* 200:607-614.

Currie, S., Tufts, BL., Moyes, CD. 1999. Influence of bioenergetic stress on heat shock protein gene expression in nucleated red blood cells of fish. *American of physiology, regulatory, integrative and comparative physiology* 276:R990-996.

D

Davis, PE. 1985. The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. III. Metabolism enzymatics and detoxification in *Salmo* spp. and *Galaxias* spp. *Aquatic Toxicology* 7:277-300.

Deagen, JT., Oh, SH., Whanger, D. 1980. Biological function of metallothionein. Metabolic interaction of cadmium and zinc in rats. *Biological trace element research* 2:65-80.

Deane, EE., Kelly, SP., Lo, CKM., Woo, NYS. 1999. Effets of GH, prolactin and cortisol on hepatic heat shock protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. *Journal of endocrinology* 161:413-421.

Delmas, F., Trocheris, V. and Murat, J.C. 1995. Expression of stress proteins in cultured HT29 human cell-line ; a model for studying environmental aggression. *Internation journal of biochemistry*. 27:385-391.

Delmas, F., Trocheris, V., Miro, C., Villaescusa, I and Murat, J.C. 1996. Expression of stress proteins in cultured human cells as a sensitive indicator of metal toxicity *Frenesius Journal of Chemistry* 354:615-619.

Delmas, F., Schaak, S., Gaubin, Y., Croute, F., Arrabit, C., and Murat, J.C. 1998. Hsp72mRNA production in cultured human cells submitted to nonlethal aggression by heat, ethanol, or propanol. Application to the detection of low concentrations of chromium(VI) (potassium dichromate). *Cell Biology and Toxicology* 14:39-46.

Delmas, F., Maisonnave, V., Fulladosa, E., Villaescusa, I., Soleilhavoup, JP., Murat, JC. 2000. Comparative evaluation of the potential noxiousness in domestic sludge used in agriculture and in commercial fertilizers. *Ecotoxicology and environmental Safety* 47:292-297.

Delvalls, TA., Blasco, J. Sarasquete, MC., Forja, JM., Gomez-Parra, A. 1998. Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish *Sparus aurata* *Ecotoxicology and Environmental safety* 41:157-167

DelValls, TA., Blasco, J., Sarasquete, MC., Forja, JM., Gomez-Parra, A. 1998. Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental safety* 41:157-167.

Denis, C., Cortinovic, C., Terrain, B., Viillard, V., Paris, H., Murat, JC. 1984. Activity of enzymes related to carbohydrate metabolism in the HT29 colon adenocarcinoma cell line and tumor. *International Journal of biochemistry* 16:87-91

Denis-Pouxviel, C., Reisinger, I., Bühler, C., Brdiczka, D., Murat, JC. 1987. Regulation of mitochondrial hexokinase in cultured HT29 human cancer cells. An ultrastructural and biochemical study. *Biochimica and biophysica acta* 902:335-348.

Desjardin V, Bayard R, Lejeune P, Gourdon R. 2003. Utilisation of supernatants of pure cultures of *Streptomyces thermocarboxydus* to reduce chromium toxicity and mobility in contaminated soils. *Water, air and soil pollution* 3:153-160.

Desjardin, V. 2002. Réduction du chrome(VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Laboratoire d'Analyse Environmental des Procédés et des Systèmes Industriels. Intitut National des sciences appliquees de Lyon (INSA). Tesis doctoral.

Dethloff, GM., Schlenk, D., Hamm, JT and Bailey, H. 1999. Alterations in physiological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicology and Environmental safety* 42:253-264.

Di Pietro A., Scoglio, ME., Anzalone C., Calimeri, S., Lo Giudice, D., Marino, A. 2000. Effect of metal mixtures on *Salmonella enteritidis* viability in synthetic sewage. *Annali d'Igiene* 12 (6):469-478.

E

El-Alawi, YS., McConkey, J., Dixon, DG., Greenberg, BM. 2002. Measurement of short- and long term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental safety* 51:12-21.

Esteban, MA., Muñoz, J., Merseguer, J. 2000. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax L*) Flow cytometric and microscopic studies. *The anatomical record* 258:80-89.

F

Feder, ME., Hofmann, GE. 1999. Heat shock proteins, molecular chaperones and stress response. *Annual Review of Physiology* 61:243-282

Feige, U., Morimoto, RI., Yahara, I., Polla. 1996. Stress-inducible cellular Response. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.

Feng, Q., Boone, AN., Vijayan, MM. 2003. Copper impact on heat shock protein 70 expression and apoptosis in rainbow trout hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135:345-355.

Fernandez-Alba, A. R., Hernando-Guil, L., Diaz-Lopez, G., Chisti Y. 2001. Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Analytical Chemica Acta* 426:289-301.

Florence, TM. 1982. The speciation of trace elements in waters. *Talanta* 29, 345-364.

Fochtman, P., Raszka, A., Nierzedzka, E. 2000. The use of conventional bioassays, microbiotests, and some rapid methods in the selection of an optimal test battery for the assessment of pesticides toxicity. *Environmental Toxicology* 15:376-384.

Fogh, J., Fogh, JM., Orfeo, T. 1977. 127 cultured human tumor cell-lines producing tumors in nude mice. *Journal of National Cancer Institut* 59:221-226.

Francklin, CC., Chin, PC., Turner JT., Kim, HD. 1988. Insulin regulation of glucose metabolism in HT29 colonic adenocarcinoma cells: activation of glycolysis without augmentation of glucose transport. *Biochimica and biophysica acta* 972:60-68.

Frost, FJ., Chwirka, J., Craun, GF., Thompson, B., Stomps, J. 2002. Physical injury risks associated with drinking water arsenic treatment. *Risk analysis* 22:235-243.

Fude, L., Harris, B., Urrutia, MM., Beveridge, TJ. 1994. Reduction of Cr(VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRBIII). *Applied Environmental Microbiology* 60:1525-1531.

G

Garbisu, C., Alkorta, I., Llama, MJ., Serra, JL. 1998. Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation* 9:133-141.

Gaubin, Y., Vaissade, F., Croute, F., Beau, B., Soleilhavoup, JP., Murat, JC. 2000. Implication of free radicals and glutathione in the mechanism of cadmium-induced expression of stress proteins in the A549 cell-line. *Biochim Biophys Acta* 1495:4-13.

Gebel, TW. 2001. Genotoxicity of arsenical compounds. *International Journal of Hygiene and Environ Health* 203: 249-262.

Gellert, G. 2000. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and luminescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45:87-91.

Gellert, G., Stommel, A., Trujillano. 1999. Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 39 (3):467-476.

Gibbs, RJ., Angelidis, M. 1988. Metal chemistry differences between digested and undigested sludges. *Journal of the water pollution control federation* 60:113-118.

Goldstone, ME., Kirk, PWW., Lester, JN. 1990. The behavior of heavy metals during waste water treatment. I. Cadmium, chromium and copper. *Science of total Environment* 95:233-252.

H

Heikkila, J., Schultz, G., Iatrou, K., Gedamu, L. 1982. Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure. *Journal of biological chemistry* 257:12000-12005.

Heinicke, E., Kumar, U., Munoz, DG. 1992. Quantitative Dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence. *Journal of immunological methods* 152:227-236.

Herkovits, J., Perez-Coll, C., Herkovits, F. 2000. Evaluation of nickel-zinc interactions by means of bioassays with amphibian embryos. *Ecotoxicology and environmental safety* 45:266-273.

Hetrick, FM., Knittel, MD., Fryer, JL. 1979. Increased susceptibility of Rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis after exposure to copper. *Applied Environmental Microbiology* 37:198-201.

Hindwood, AL., McCornick, MJ. 1987. The effect of ionic solutes on EC50 values measured using the Microtox test. *Toxicity assessment: An international quarterly* 2:449-461.

Hoffman, DJ., Rattner, BA., Burton, G., Cairns, J. 1995. Handbook of Ecotoxicology. Ed. Lewis, Boca Raton.

Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, CM. 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 4 (4):468-474.

Horitsu H, Futo S, Miyazawa Y, Ogai S, Kawai K. 1987. Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agricultural Biology and Chemistry* 51 (9):2417-2420.

Hsieh, CY., Tsai, MH., Ryan, DK., Pancorbo, OC. 2004. Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment* 320:37-50.

Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen PG., Sandvick, M. 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and Citochrom P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Marine Environmental Research* 46:51-55.

I

Ince, N., Dirilgen, N., Apikyan, I., Tezcanli, G., Ustun, B. 1999. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36:365-372.

Ishibashi, Y., Cervantes, C., Silver, S. 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied Environmental Microbiology* 56 (7):2268-2270.

Iwama, GK., Thomas, PT., Forsyth, RB., Vijayan, MM. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in fish biology and fisheries* 8:35-56.

Iwana, GK., Vijayan, M., Forsyth, R., Ackerman, P. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoology* 39:901-909.

J

Jahn, R., Schiebler, W., Greengard, P. 1984. A quantitative dot-immunoblotting assay for proteins using nitrocellulose membrane filters. *Proceedings National Academic Science* 81:1684-1687.

Jain, CK., Ali I. 2000. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research* 34 (17): 4304-4312.

Jan, G., Leverrier, P., Pichereau, V., Boyaval, P. 2001. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *propionibacterium freudenreichii*. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5):2029-2036.

Jimenez, BD., Stegeman, JJ. 1990. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress in fish. *American Fisheries Society Symposium* 8:145-166.

Jonas, RB., Gilmour CC., Stoner, DL., Weir, MM., Tuttle, JH. 1984. Comparison of methods to measure acute metal and organometal toxicity to natural aquatic microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 47 (5):1005-1011.

Jop, K.M., Rodgers, J., Price, E., Dickson, K. 1986. Renewal devide for test solutions in *Daphnia* toxicity tests. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 36:95-100.

Jorgensen, EH., Bye, J., Joblin, M. 1999. Influence of nutritional status on biomarker exposure to PCB in the Artic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology* 44:233-244.

K

Kägi, JHR., Schäffer, A. 1988. Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry* 27 (23):8509-8515.

Karagas, MR., Le, CX., Morris, S., Blum, J., Lu, X., Spate, V., Carey, M., Stannard, V., Klaue, B., Tosteson, TD. 2001. Markers of low level arsenic exposure for evaluating human cancer risks in the US population. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 14: 171-175.

Kemper, ES., Hanson, FE. 1968. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *Journal of bacteriology* 95 (3):975-979.

Khangarot, BS., Ray, PK. 1987. Correlation between heavy metal acute toxicity valus in *Daphnia magna* and fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 38:722-726.

King Ming Chan. 1995. Metallothionein; Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Honk kong. *Marine pollution bulletin* 31:411-415.

Klaassen, C., Liu, J., Choudhuri, A. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against Cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39:267-94.

Knittel, MD. 1981. Susceptibility of steel head trout *Smo gairdneri* Richardson to redmouth infection *Yersinia ruckeri* following exposure to cooper. *Journal of Fish Disease* 4:33-40.

Koban, M., Yup, AA., Agellon, LB., Powers, DA. 1991. Molecular adaptation to environmental temperature: Heat shock response of the eurythermal teleost *Fundulus heteroclitus*. *Marine Biology and Biotechnology* 1:1-17.

Koga,, t., katagiri, T.,Hori, H., Takumi, K. 2002. Alkaline adaptation induces cross-protection agains some environmental stresses and morphological change in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial research* 157:249-255.

Kothery, RK., Candido, EPM. 1981. Induction of a novel set of polypeptides by heat shock or sodium arsenite in cultured cells of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Canadian Journal of Biochemistry* 60:347-355.

Kowk Lim Lam, Po Wai Ko, Judy Ka-Yee Wong., King Ming Chan. 1998. Metal Toxicity and Metallothionein Gene Expression studies in Common Carp and Tilapia. *Marine Environmental Research* 46:563-566.

Kress, N., Herut, B., Galil, BS. 2004. Sewage sludge impact on sediment quality and benthic assemblages off the Mediterranean coast of Israel-a long-term study. *Marine environmental research* 57:213-233.

Kumar Sani, R., Geesey, G., Peyton, BM. 2001. Assessment of lead toxicity to *Desulfovibrio desulfuricans* G20: influence of components of lactate C medium. *Advances in Environmental research* 5:269-276.

L

Laburthe, M., Rousset, M., Chevalier, G., Boissard, C., Dupont, C., Zweibaum, A., Rosselin, G. 1980. Vasoactive intestinal peptide control of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in seven human colorectal adenocarcinoma cell-lines in culture. *Cancer Research* 40:2529-2533.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Landis, WG., Yu, MH. 1999. Introduction to Environmental Toxicology. Impact of chemicals upon Ecological systems. Lewis publishers, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.

Lange, J., Thomulka, K. 1997. Use of the *Vibrio harveyi* toxicity test for evaluating mixture interactions of nitrobenzene and dinitrobenzene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38:2-12.

Laxman, RS., More, S. 2002. Reduction of hexavalent chromium by *Streptomyces griseus*. *Minerals Engineering* 15:831-837.

Lecoer, S., Videmann, B., Berny, Ph. 2004. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha*. *Environmental Research* 94:184-191.

Lemeux, PG., Herendeen, SL., Bloch, PL., Neidhardt, FC. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following exposure shifts. *Cell* 13:427-434.

Leónard, A. 1991. Arsenic. In: Ernest Merian. Metals and their compounds in the environment. Occurrence, Analysis, and biological relevance. VCH.

Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billingham, Z., Depledge, M.H. 1999. Stress proteins (HSP's) : Methods of detection and their environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8:351-368.

Lionetto, MG., Giordano, ME., Caricato, R., Pascariello, MF., Marinosci, L., Schettino, T., 2001. Biomonitoring of heavy metals contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. *Aquatic conservation: marine and freshwater ecosystems*, 11:305-310

Lock, K., Janssen, C., De Coen, W. 2000. Multivariate tests designs to assess the influence of zinc and cadmium bioavailability in soils on the toxicity to *Enchytraeus albidus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (11): 2226-2671.

Lopez-Ruiz, A., Esteban, MA., Meseguer, J. 1992. Blood cells of the Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. *The anatomical record* 234:161-171.

Losi, ME., Amrhein, C., Frankenberger, WT. 1994. Factors affecting chemical and biological reduction of hexavalent chromium in soil. *Environmental toxicology and Chemistry* 13 (11):1727-1735.

Lukkari, T., Taavitsainen, M., Soimasuo, M., Oikari, A., Haimi, J. 2004. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure. *Environmental Pollution* 129:377-386.

Luxon, PL., Hodson, PV., Borgmann, U. 1987. Hepatic aryl hidrocarbon hydroxylase activity of lake trout (*Salvelinus namaycush*) as indicator of organic pollution. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6:649-657.

M

Machullat, J. 2000. Arsenic in the geosphere-a review. *The Science of the Total Environment* 249:297-312.

Maier, RM., Pepper, IL., Gerba, CP. 2000. Environmental Microbiology. Academic Press, London, UK.

Margoshes, M., Vallee, BL. 1957. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *Chemistry society* 79:4813-4814.

Marzluf, GA. 1970. Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport- negative mutants. *Journal of bacteriology* 102 (3):716-721.

Matsuda, K., Hiratsuka, N., Kurihara, Y., Shiba, K. 2001. Semiquantitative analysis of urinary low proteins levels using Silver dot blot assay. *Journal of clinical laboratory analysis* 15:171-174.

McAlister, L., Finkelstein, DB. 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochemical and Biophysical Research communication* 93:819-824.

McCloskey, JT., Newman, M., Clark, SB. 1996. Predicting the relative toxicity of metal ions using ion characteristics: Microtox[®] Bioluminescence assay. *Environmental Toxicology and chemistry* 15(10):1730-1737

Merian, E. 1991. Metals and their compounds in the environment. Federal Republic of Germany, VCH publishers.

Metzler, DE. 2001. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Harcourt/Academic Press, Burlington, Massachusetts.

Microbics Corporation 1992. Microtox[®] manual. Part 55H550-2, Carlsbad, CA, USA.

Misra, S., Zafarullah, M., Price-Houghey, J., Gedamu, L. 1989. Analysis of stress induced gene expression in fish cell lines exposed to heavy metals and heat shock. *Biochimica and Biophysica Acta* 1007:325-333.

Mitchell, HK., Peterson, NS. 1982. Developmental abnormalities in *Drosophila* induced by heat shock. *Developmental genetics* 3:91-102

Monod, GA., Devaux, A., Riviere, JL. 1988. Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhone France. *Science of Total Environment* 73:189-202.

Morozzi G, Cenci G, Scardazza F, Pitzurra M. 1986. Cadmium uptake by growing cells of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Microbios* 48:27-35.

Morris, C.A., Nicolaus, B., Sampson, V., Harwoos JL., Kille. P. 1999. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochemical Journal* 338:553-560.

Mosser, DD., Heikkiula, JJ., Bols, NC., 1986. Temperature ranges over which rainbow trout fibroblasts survive and synthesize heat shock proteins. *Journal of cellular physiology* 128:432-440.

Mowat, FS., Bundy, KJ. 2002. Experimental and mathematical/computational assessment of the acute toxicity of chemical mixtures from the Microtox[®] assay. *Advances in Environmental Research* 6:547-558.

Munawar, M., Hänninen, O., Roy, S., Munawar, N., Kärenlampi, L., Brown, D. 1995. Bioindicators of environmental health. SPB Academic Publishing, Amsterdam, The Netherlands.

Myers, CR., Carstens, BP., Antholine, WE., Myers, JM., 2000. Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of applied microbiology* 88:98-106.

N

Nadeau, D., Corneau, S., Plante, I. 2001. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell stress and chaperones*, 6(2):153-163.

Neff, JM. 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(5): 917-927.

Nepple, BB., Flynn, I., Bachofen, R., 1999. Morphological changes in phototrophic bacteria induced by metalloids oxyanions. *Microbiological research* 154:191-198.

Nies, DH. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokariotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27:313-339.

Nikunen, E., Miettinen, V. 1995. *Daphnia magna* as a indicator of the acute toxicity of waste waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35:368-374.

Norey, CG., Lees, WE., Darke, BM., Stark, JM., Baker, TS., Cryer, A., Kay, J. 1990. Immunologicval distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comparative biochemistry and Physiology* 95B(3):597-601.

O

Ota, N., Galsworthy, PR., Pardee, AB. 1971. Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* 105(3):1053-1062.

P

Paris, H., Bouscarel, B., Cortinovic, C., Murat, JC. 1985. Growth related variation of α -adrenergic receptivity in the HT29 adenocarcinoma cell-line from human colon. *FEBS Letter* 184:82-86.

Park, SH., Oh, KH., Kim, CK. 2001. Adaptive and cross-protective responses of *Pseudomonas* sp. DJ-12 to several aromatics and other stress shocks. *Current Microbiology* 43:176-181.

Parsell, DA and Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* 27:437-496.

Payne, JF., Fancey LL., Rahimtula AD and Porter EL. 1987. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology* 86C (2): 233-245.

Pedersen, K.L., Pedersen, S.N., Hojrup, P., Knudsen, J., Depledge's, M.H. 1994. Purification and chyaracterization of a cadmium-induced metallothionein from the Shoce crab *Carcinus maenas*. *Biochemistry Journal* 297:609-614.

Peitzsch, N., Eberz, G., Nies, SH. 1998. *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Applied Environmental microbiology* 64(2):453-458.

Perez, E., Blasco, J., Solé, M. 2004. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Marine Environmental Research* 58:275-279.

Pinto, M., Appay, MD., Simon-Assmann, P., Chevalier, G., Dracopoli, N., Fogh, J., Zweibaum, A. 1991. Enterocytic differentiation of cultured human colon cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biology of the Cell* 42:3-20.

Pomerai. 1996. Heat shock proteins as biomarkers of pollution. *Human and Experimental Toxicology* 15:279-285.

Puigdomènech, I. 2004. Chemical species software (MEDUSA and HYDRA). TITRA-00k-3010. Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden.

Q

Qureshi, A., Flood, KW., Thompson, SR., Janshurst, CS., Inmiss, CS., Rokosh, DA. 1982. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioluminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. In: Pearson, JC, Foster, RB., Bishop, WE. P 179-185.

R

Reynolds, KL., Neher, DA. 1997. Statistical comparison of epidemics. pp 34-37. In: Francl LJ, Neher DA (eds). Exercises in plant disease epidemiology. APS Press. Minnesota. USA.

Ribó, JM., Kaiser, KL. 1983. *Photobacterium phosphoreum* toxicity bioassay. Test procedures and applications. *Toxicity assessment: An International Quarterly* 2:305-323.

Ribó, JM., Rogers, F. 1990. Toxicity of mixtures of aquatic contaminants using the luminescent bacteria bioassay. *Toxicity assessment: an international journal* 5:135-152.

Ribó, JM., Kaiser, KL. 1993. Effects of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlations with acute and sublethal effects on other organisms. *Chemosphere* 12 (11-12): 1421:1442.

Ribó, JM., Diez, M. 1994. Ejercicio de comparación interlaboratorio del ensayo de toxicidad de bacterias luminiscentes. Artículos tècnics. *Tecnología del agua* 124:49-57.

Riley, MR., Boesewetter, DE., Kim AM., Sirvent, FP. 2003. Effects of metals Cu, Fe, Ni, V and Zn on rat lung epithelial cells. *Toxicology* 190:171184.

Ritossa F. 1962. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.

Robards, K., Worsfold, P. 1991. Cadmium: Toxicology and analysis. *Analyst* 116:549-568.

Robinson, N.G., Tommey, A.M, Kuske, C., Jackson, PJ. 1993. Review article. Plant metallothioneins. *Biochemistry Journal* 295:1-10.

Rodilla, V., Miles, A., Jenner, W., Hawksworth, M. 1998. Exposure of cultured human proximal tubular cells to cadmium, mercury, zinc and bismuth: toxicity and metallothionein induction. *Chemico-biological interactions* 115:71-83.

Rousset, M., Dussaulx, E., Chevalier, G., Zweibaum, A. 1980. Growth related glycogen levels of human intestine carcinoma cell lines *in vitro*. *Journal of National Cancer Institute* 65:885-889.

Ruiz, M.J, Lopez-Jaramillo, L., Redondo, M.J and Font, G. 1997. Toxicity assessment of pesticides using the Microtox test: application to environmental samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59:619-625.

Ryan, JA., Hightower, LE. 1994. Stress proteins as molecular biomarkers for environmental toxicology. In : Stress inductible cellular responses. Edited by Feige, R.I. Morimoto, I. Yahara and B. Polla. Birhauser Verlag.

S

Sanders, BM. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical reviews in Toxicology* 23(1):49-75.

Sanders, BM., Martin, LS. 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environmental samples. *The science of the total environment* 139/140:459-470.

- Saranko CJ. 1998. The toxicity of arsenite and arsenate. Fact sheet. Division of waste management, Florida, USA.
- Schlenk, D., Rice, CD. 1998. Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* 43:121-129.
- Schlenk, D., Wolford, M., Chelius, M., Steevens, J., Chan, KM. 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Biochemical Physiology* 188:177-183.
- Schmitz, R., Eisenträger, A., Dott, W. 1998. Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison). *Journal of Microbiological Methods* 31:159-166.
- Schmitz, RPH., Eisenträger, A., Dott, W. 1999. Agonistic and antagonistic toxic effects observed with miniaturized growth and luminescence inhibition assays. *Chemosphere* 38(1):79-95.
- Schyroder, H.C., Batel, R., Hassanein, H.M.A., Lauenroth, S., Jenke, H., Simat, T., Steinhart, H and Muller, W.E.G. 2000. Correlation between the level of the potential biomarker, heat shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab, *Limanda limanda*: a field study in the north sea and the English channel. *Marine environmental research* 49:201-215.
- Segner, H. 1998. Fish cell lines as a tool of aquatic toxicology. In: Fish ecotoxicology. Edited by Braunbeck, T., Hinton, D and Streit, B. Basel, Birkhauser Verlag, Switzerland.
- Serat, W., Budinger, F.E., Mueller, PK. 1965. Evaluation of biological effects of air pollutants by the use of luminiscent bacteria. *Journal of Bacteriology* 90:832-833.
- Silver S, Ji G. 1994. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental Health perspectives* 102 (3):107-113.
- Silver S, Phung LT. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews of Microbiology* 50:753-789.
- Silver, S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions- a review. *Gene* 179:9-19.
- Singh, KP., Mohan, D., Sinha, S., Dalwain, R. 2003. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere* (in press).
- Sisti, F., Allegretti, P., Donati, E. 1996. Reduction of dichromate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology Letters* 18:1477-1480.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch H., Kenney, S., Boyd, MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer drug screening. *Journal of National Cancer Institut* 82:1107-1112.
- Slabbert JL. 1986. Improved bacterial growth test for rapid water toxicity screening. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 37:565-569.
- Smith, FW., Hawkesford, MJ., Prosser, IM., Clarkson, DT. 1995. Isolation of cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Molecular and General Genetics*. 247(6):709-715.
- Smith, WA., Apel, WA., Petersen, JN., Peyton, B., 2002. Effect of carbon and energy source on bacterial chromate reduction. *Bioremediation journal* 6 (3):205-215.
- Somasundaram, L, Coats, JR., Racke, KD. et Stahr, HM. 1990. Application of Microtox system to assess the toxicity of pesticides and their hydrolysis metabolites. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 44:254-259.

Somji, S., Sens, MA., Garrett, SH., Gurel, V., Todd, JH., Sens, DA. 2002. Expression of hsp90 in the human kidney and in proximal tubule cells exposed to heat, sodium arsenite and cadmium chloride. *Toxicology letters* 133:241-254.

Sorvari, J., Sillanpää, A. 1996. Influence of metal complex formation on heavy metal and free EDTA and DTPA acute toxicity determined by *Daphnia magna*. *Chemosphere* 33 (6):1119-1127.

Speckner, W., Schindler JF and Albers C. 1989. Age-dependent changes in volume and haemoglobin content of erythrocytes in carp (*Ciprinus carpio*). *Journal of experimental biology* 141:133-149.

Strachan, G., Preston, S., Maciel, H., Porter, AJR., Paton, GI. 2001. Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater. *Water research* 35, 14, 3490-3495.

T

Thomas, P., Bally, M., Neff, JM. 1982. Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* exposed to cadmium. *Journal of Fish biology* 20:183-196.

Thomulka, K., Lange, J. 1996. A mixture toxicity study employing combinations of tributyltin chloride, dibutyltin dichloride, and tin chloride using the marine bacterium *Vibrio harveyi* as the test organism. *Ecotoxicology and environmental safety* 34:76-84.

Thomulka, K., Lange, J. 1997. Mixture toxicity of nitrobenzene and trinitrobenzene using the marine bacterium *Vibrio harveyi* as the test organism. *Ecotoxicology and environmental safety* 36:189-195.

Tonner-Navarro LE. 1998. Risk assessment of organic versus inorganic arsenic. CEHT/TR-98-01. Technical report. Division of Waste Management, Florida, USA.

Trevors, JT., Mayfield, CI., Inniss, WE. 1981. A rapid toxicity test using *Pseudomonas fluorescens*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 27:433-437.

Turpeinen, R., Pantsar-Kallio, M., Häggblom, M., Kairesalo, T. 1999. Influence of microbes on the mobilisation, toxicity and biomethylation of arsenic in soil. *The Science of the Total Environment* 236:173-180.

U

Ueng, YF., Liu, CF., Lai, CF., Meng, LM., Hung, YY., Ueng, TH. 1996. Effects of cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P450 in Tilapia. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology* 57:125-131.

V

Van Leeuwen, CJ., Hermens, JLM. 1996. Risk assessment of chemicals: an introduction. Kluwer academic publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Vijayan., Pereira, C., Kruzynski., Iwana, G. 1998. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquatic Toxicology* 40:101-108.

Villaescusa I, Martinez M, Pilar M, Murat, JC., Hosta C. 1996. Toxicity of cadmium species on luminescent bacteria. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 354:566-570.

Villaescusa I, Marti S, Matas C, Martinez M, Ribó JM. 1997. Chromium toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:(5) 871-874.

Villaescusa I, Matas C, Hosta C, Martinez M., Murat JC. 1998. Evaluations of lead(II) and nickel (II) toxicity in NaCl and NaClO₄ solutions by using Microtox bioassay. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 361:355-358.

Villaescusa, I., Casas, I., Martínez, M., Murat, J.C. 2000. Effect of zinc chloro complexes to photoluminescent bacteria. Dependence of toxicity on metal speciation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64:729-734.

W

Waalkes, M. P. Quantification of Metallothionein. 1999. In: Thomas, J. A., Methods in toxicology – Endocrinolog Schmidt, C and Beyersmann, D. Transient peaks in Zn and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 364:91-98.

Wang, Y.T., Xiao C. 1995. Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria. *Water research* 29 (11):2467-2474.

Welch, J.W. 1993. How cells respond to stress. *Scientific American* May, pp. 34-41.

Welch, W.J., Kang, H.S., Beckmann, R.P., Mizzen, L.A. 1991. Response of mammalian cells to metabolic stress ; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Current topics in Microbiology and Immunology* 167:31-49.

Wice, B.M., Trugnan, G., Pinto, M., Rousset, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Lacroix, B., Zweibaum, A. 1985. The intracellular acumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *Journal of Biology and Chemistry* 260:139-146.

Woo, N.Y.S., Chiu, S.F. 1995. Effect of nitrite exposure on hematological parameters and blood respiratory properties in the sea bass *Lates Calcarifer*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 10:259-266.

Wu, S.M., Weng, C.F., Yu, M.J., Lin, C.C., Chen, S.T., Hwang, J.C. 1999. Cadmium-inducible metallothionein in *Tilapia (Oreochromis mossambicus)*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62:678-768.

X

Y

Yves, P., Lopez-Gastey, J., Choucri, A., Sunahara, G. 1998. Procedure to screen illicit discharge of toxic substances in septic sludge received al a wastewarther treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39:31-40 .

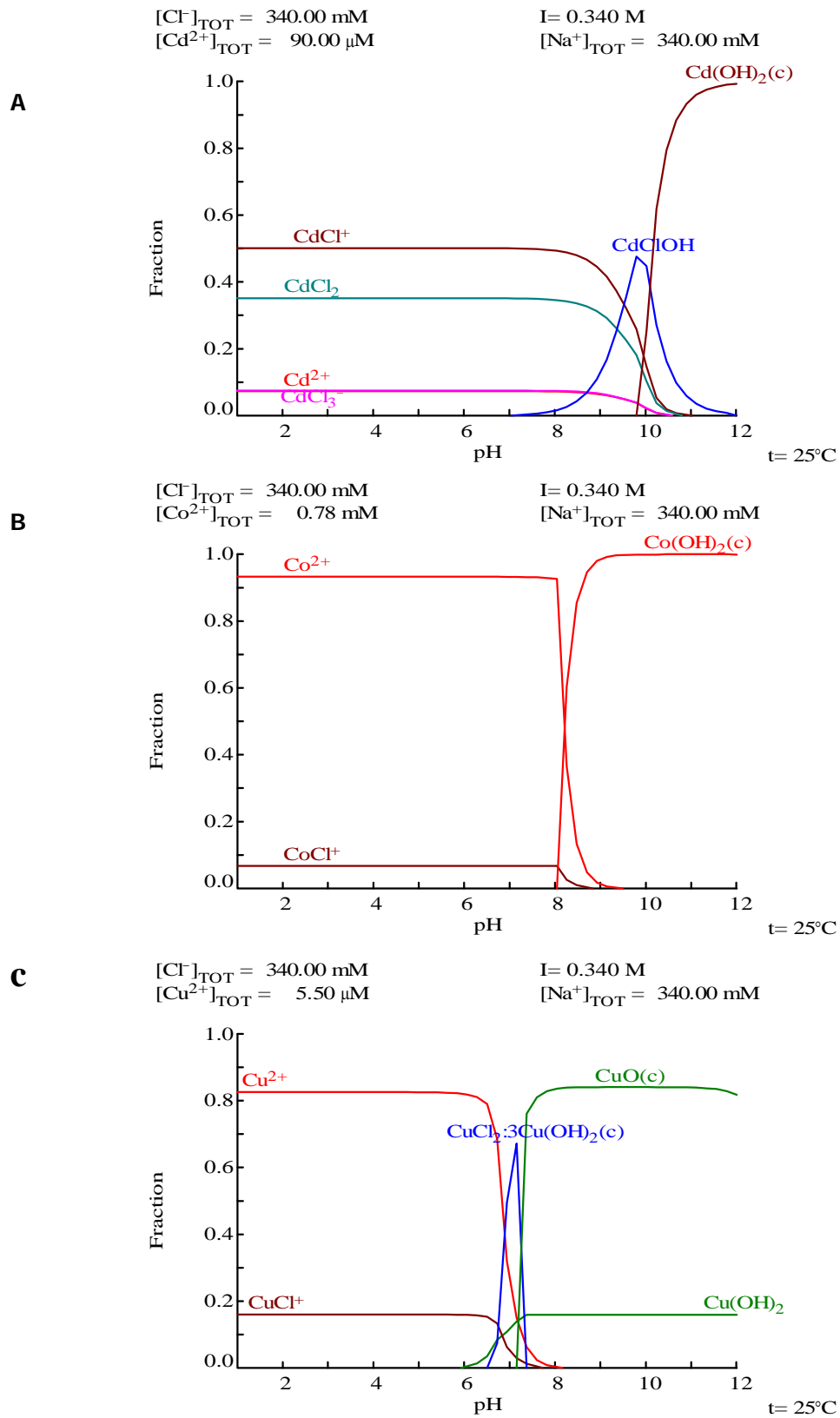
Z

Zufiaurre, R., Olivar, A., Chamorro, P., Nerin, C and Callizo, A. 1998. Speciation of metals in sewage sluge for agricultural uses. *The Analyst* 123:255-259.

Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J and Rousset, M. 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of Cell Physiology* 122:21-29.

ANNEXES

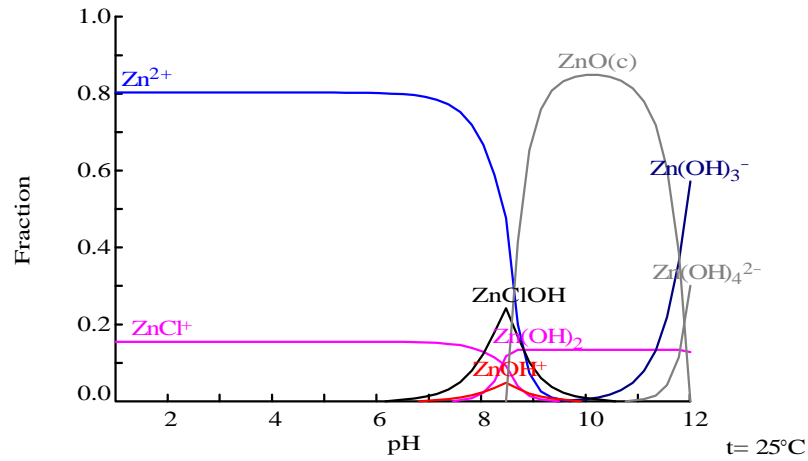
ANNEX 1. Diagrames d'especiació química



D

$[\text{Na}^+]_{\text{TOT}} = 340.00 \text{ mM}$
 $[\text{Cl}^-]_{\text{TOT}} = 340.00 \text{ mM}$

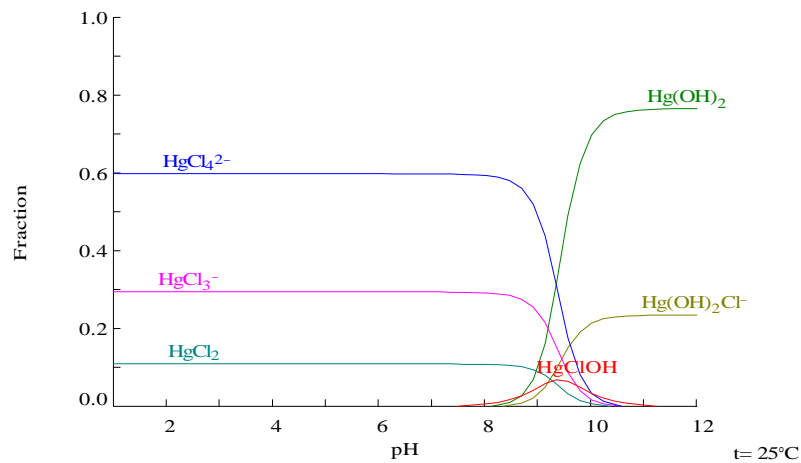
$I = 0.340 \text{ M}$
 $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{TOT}} = 13.00 \text{ }\mu\text{M}$



E

$[\text{Cl}^-]_{\text{TOT}} = 340.00 \text{ mM}$
 $[\text{Hg}^{2+}]_{\text{TOT}} = 10.00 \text{ }\mu\text{M}$

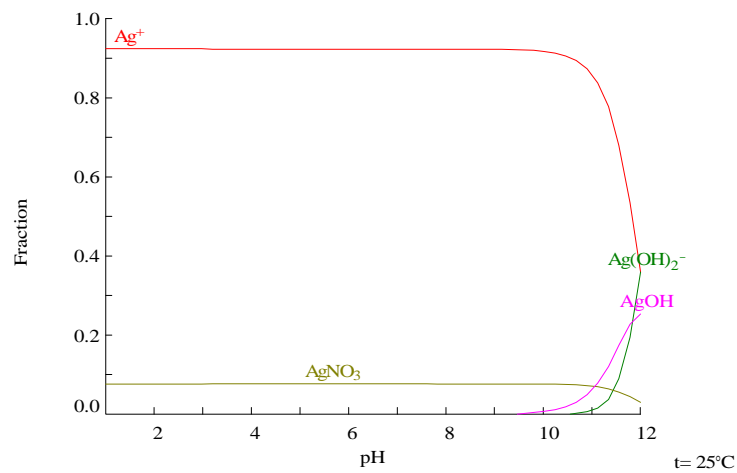
$I = 0.340 \text{ M}$
 $[\text{Na}^+]_{\text{TOT}} = 340.00 \text{ mM}$



F

$[\text{NO}_3^-]_{\text{TOT}} = 340.00 \text{ mM}$
 $[\text{Ag}^+]_{\text{TOT}} = 1.80 \text{ }\mu\text{M}$

$I = 0.340 \text{ M}$
 $[\text{Na}^+]_{\text{TOT}} = 340.00 \text{ mM}$



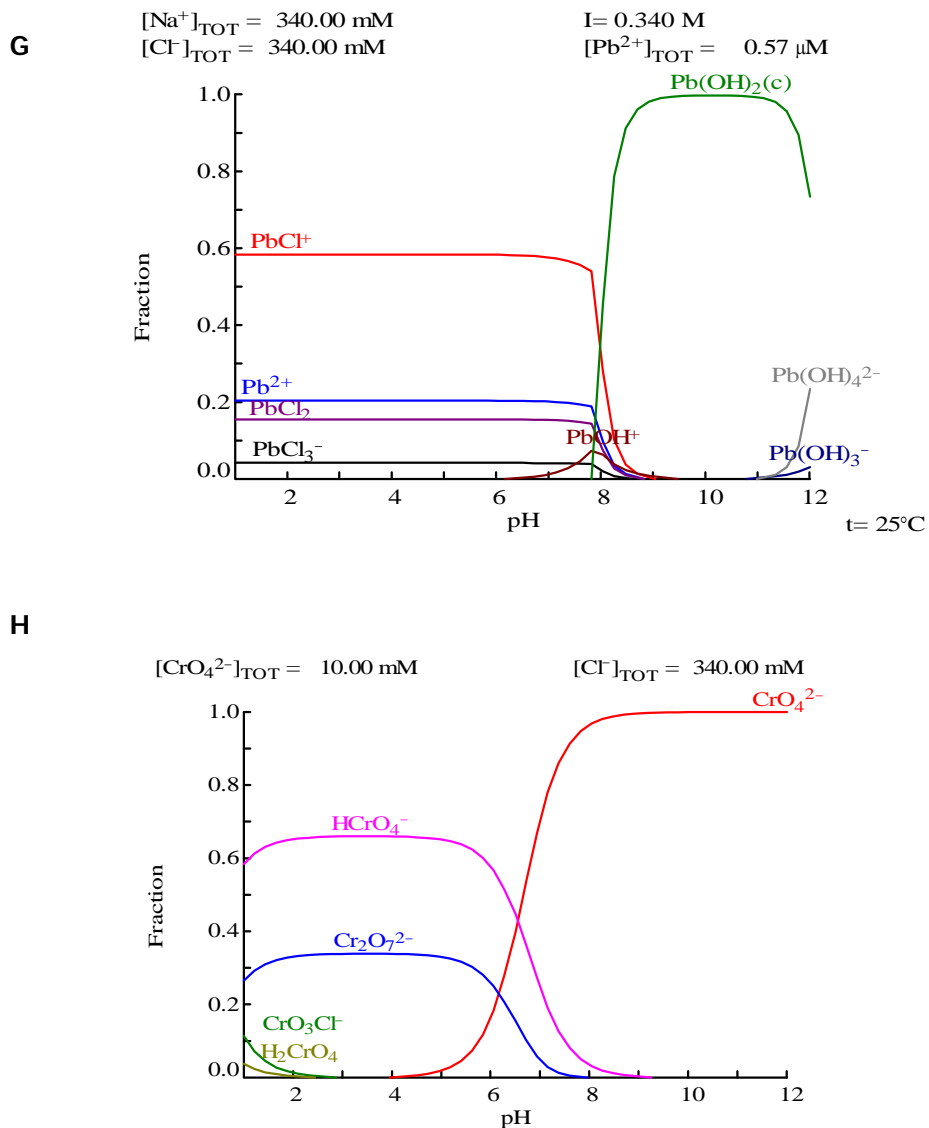


Figura 1. Diagrama de distribuci3 d'esp3cies qu3miques de diferents metalls (A) Cd(II), (B) Co(II), (C) Cu(II), (D) Zn(II), (E) Hg(II), (F) Ag(I), (G) Pb(II), (H) Cr(VI) en funci3 del pH de la soluci3. $[\text{NaCl}] = 0.34 \text{ M}$.

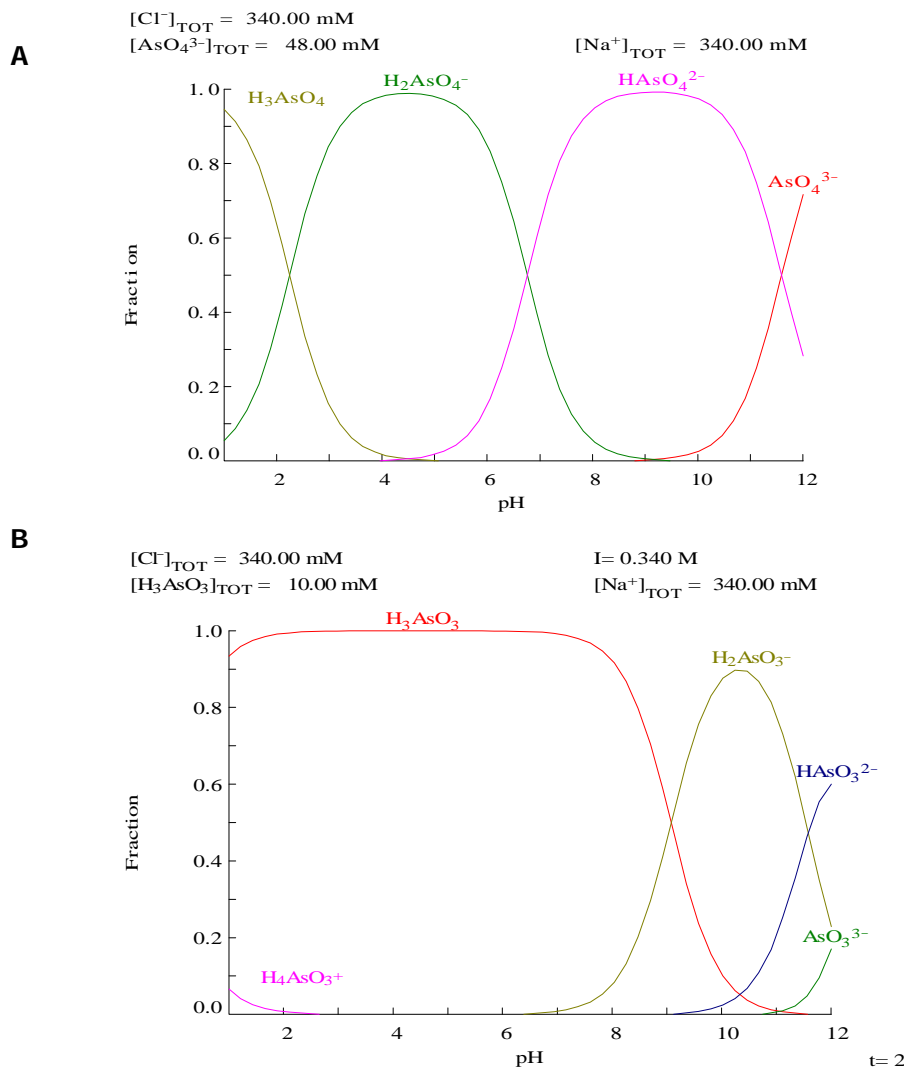


Figura 2 Diagrama de distribució d'espècies d'arsenat (A) i d'arsenit (B) en funció del pH de la solució $[\text{NaCl}] = 0.34 \text{ M}$.

ANNEX 2 Medis, tampons i solucions

Medis de cultiu

Composició del medi de cultiu Dubbecco's modified Eagle Medium (DMEM) , Gibco

Composició	mg/L
Sals inorgàniques	
CaCl ₂ .2H ₂ O	264.0
Fe(NO ₃).9H ₂ O	0.10
KCl	400.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	200.0
NaCl	6400.0
NaHCO ₃	3700.0
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	141.0
Altres compostos	
D-Glucosa	4500.0
Vermell de fenol	15.0
Aminoacids essencials	
L-Arginina.HCl	84.0
L-Cistina	48.0
L-Glutamina	580.0
Glicina	30.0
L-Histamina	42.0
L-Isoleucina	105.0
L-Leucina	105.0
L-Lisina.HCl	146.0
L-Metionina	30.0
L-fenilalanina	66.0
L-Serina	42.0
L-Treonina	95.0
L-Tritophana	16.0
L-Tirosina	72.0
L-Valina	94.0
Aminoacids no essencials	
L-Alanina HCl	890.0
L-Asparagina.H ₂ O	1500.0
Acide L-Aspàrtic	1330.0
Acid L-Glutàmic	1470.0
Glicina	750.0
L-Prolina	1150.0
L-Serina	1050.0
Vitamines	
D-Ca pantotenat	4.0
Clorur colina	4.0
Acid Fòlic	4.0
i-Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal HCl	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina HCl	4.0

Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM)**Composició :**

2 flascons Medi en pols Gibco BRL, Ref. 074-02100N (composició anterior)	9.99 g
Bicarbonat de sodi NaHCO ₃ Prolabo	3.7 g
Glucosa, Prolabo.	3.5 g
Gentamisina, Sigma	1ml
Aigua Milli Q	1 l

Preparació : Barrejar tots els productes amb aigua destil·lada durant 2 h a temperatura ambient. Suplementar amb l'antibiòtic i neutralitzar (pH 7) amb NaOH o HCl 36N. Esterilitzar per filtració Millipore (filtre MILLIPACK 20, Ref. MPGL 02S H2). Conservar a 4°C com a màxim durant 1 mes.

Composició del Tampó Hank's Balanced Salts Solution (HBSS), Gibco.

Composició:	mg/l
Sals inorgàniques	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	185
MgSO ₄ (anhidre)	97.67
KCl	400
KHPO ₄ (anhidre)	60
NaHCO ₃	350
NaCl	8000
NaH ₂ PO ₄	47.88
Altres	
D-Glucosa	1000
Vermell de fenol	11

Solucions i tampons**Tripsina****Composició :**

NaCl	16 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	5.8 g
KH ₂ PO ₄	0.4 g
Tripsina, Gibco	500 mg
Aigua Milli Q	2 l

Preparació : Barrejar tots els productes, agitar durant 2 h i esterilitzar per filtració Millipore. Conservar a temperatura ambient.

Tripsina-EDTA. Preparació : Afegir a 2 l de la dissolució Tripsina 0.4 g de àcid etilendiamino tetracètic (EDTA).

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Composició :

NaCl	40 g
KCl	1 g
PO ₄ HNa ₂ ·12H ₂ O	14.5 g
KPO ₄ H ₂	1 g
Aigua Milli Q	5 l

Preparació : Dissoldre sota agitació magnètica. Verificar el pH i ajustar si és necessari a pH 7.45. Esterilitzar per filtració Millipore.

Àcid Tricloroacètic 50 % (TCA)

Composició :

Àcid Tricloroacètic 100 % , SIGMA	500 g
Aigua Milli Q	1000 ml

Preparació : Fer dissoldre l'àcid en l'aigua destil·lada i enrasar fins a un litre.

Solució SRB (Sulforodamina B) 0.4 %

Composició :

Sulforhodamina B, SIGMA	4 g
Acid acètic 0.1 %, Prolabo	1000 ml

Preparació : Barrejar els dos productes fins a la total dissolució.

Trizma Base 10 mM

Composició:

Trizma ^R Base, SIGMA	1.2 g
Aigua Milli Q	1 l

Preparació : Enrasar fins a 1 l i posar en agitació fins a la total dissolució.

Solució Bradford

Composició :

Brillant blue G250, SERVA	266.7 mg
Etanol 100 %	33.3 ml
Àcid ortofosfòric, 85 %	666.7 ml
Aigua Milli Q	1 l

Preparació :

Solució mare : Deixar dissoldre el Brilliant blue al menys 1 h amb l'etanol, afegir l'àcid ortofosfòric al 85 % i enrasar amb aigua Milli Q.

Solució de treball : Agafar 150 ml de la solució mare i barrejar amb 850 ml d'aigua Milli Q.

PBS-BSA 0.5 %

Composició :

PBS	100 ml
BSA (Sigma)	0.5 ml

Preparació : Dissoldre fins a la total homogeneïtzació.

PBS-Triton 0.25 %

Composició :

PBS	200 ml
Triton x100 (Sigma)	0.5 ml

Preparació : Dissoldre fins a la total homogeneïtzació.

Electroforesi SDS-page i Western blot**Persulfat Amònic 10 % (APS)**

Afegir a 1 g de Persulfat Amònic SIGMA 10 ml d'aigua destil·lada i barrejar fins a la total dissolució.

4 x Lower Gel Buffer

Composició :

Trizma base	181.6 g
Sodium dodecilsulfat (SDS)	4 g
Aigua Milli Q	1l

Preparació : Dissoldre els 2 productes en 1 l d'aigua i ajustar el pH a 8.8 amb HCl. Filtració amb paper Whatman.

4 x Upper Gel Buffer

Composició :

Trizma base	60.6 g
Sodium dodecilsulfat (SDS)	4 g
Aigua Milli Q	1l

Preparació : Dissoldre els dos productes en 1 l d'aigua i ajustar el pH a 6.8 amb HCl. Filtració amb paper Whatman.

Acrilamida, 30% acrilamida/Bis. Solució, 29:1 (3.3% C)**Temed, Sigma.****Composició dels gels electroforètics**

	Gel de resolució (10%)		Gel de concentració
	HSP	MTs	
	10 % acrilamida	16 % acrilamida	4 % acrilamida
4x Lower gel buffer (ml)	10	10	-----
4x Upper gel buffer (ml)	-----	-----	2.5
Aigua destil·lada (ml)	19.8	13.8	6
Bis acrilamida 40 % (ml)	10	16	1
Temed (µl)	40	40	13
APS 10 % (µl)	200	200	75
	Vt = 40 ml	Vt = 40 ml	Vt = 10 ml

Preparació del gel de separació: Barrejar els volums indicats dels productes de la taula amb un agitador i introduir la solució entre els dos vidres del sistema Bioblock Scientific. Deixar polimeritzar tota la nit dintre la nevera amb una mica d'aigua a la part superior per evitar l'assecatament del gel.

Preparació del gel de concentració: Buidar l'aigua i assecat al màxim. Barrejar els volums indicats dels productes de la taula amb un agitador i introduir la solució a sobre del gel de separació. Col·locar la pinta entre els dos vidres evitant de fer bombolles d'aire i deixar polimeritzar durant 30 min.

Tampó de Càrrega x2**Composició :**

Trizma base	100 ml 1M pH 6.8
Sodium dodecilsulfat (SDS)	5 g
β -mercapto etanol	10 g
Glicerol	20 g
Blue de bromofenol	0.001 g

Preparació : Preparació de 100 ml de Trizma base 1 M i dissolució dels altres productes.

Tampó de Migració x 10**Composició :**

Trizma base	30.3 g
Glicina	144.2 g
Sodium dodecilsulfat (SDS)	10 g
Aigua Milli Q	1 l

Preparació :

Solució mare: Dissoldre tots els productes sense ajustar el pH inicial de preparació.

Solució de treball: Barrejar 100 ml de la solució mare amb 900 ml d'aigua destil·lada.

Tampó de Transferència x 10**Composició :**

Trizma base	30.3 g
Glicina	144.2 g
Aigua Milli Q	1 l

Preparació :

Solució mare: Dissoldre tots els productes. Mantenir el pH inicial de preparació al voltant de 9.5.

Solució de treball: Dilució de l'anterior en una proporció 1/10

Tampó W x 10**Composició :**

Trizma base	12.11 g
NaCl	84 g
Aigua Milli Q	1 l

Preparació :

Solució mare: Dissoldre els productes i ajustar el pH a 7.4.

Solució de treball: Barrejar 100 ml de la solució mare amb 900 ml d'aigua destil·lada.

Tampó de Saturació**Composició :**

Tampon W 1 X	100 ml
Llet desnatada Regilait	3 g

Preparació : Homogeneïtzar la pols de llet desnatada en 100 ml de Tampò W

Tampó W + Tween 20 0.3%

Composició :

Tampon W X10	100 ml
Aigua Milli Q	900 ml
Tween 20	3 ml

Preparació : Homogeneïtzar tots els productes.**Tampó de Rentat 2**

Composició :

Trisma base	1.2 g
NaCl	8.2 g
Nomidet 40	1000 ml

Preparació : Barrejar tots els productes i ajustar el pH a 7.5.**Tampó PBS-Etanolamina 50 mM**

Composició :

PBS	1l
Etanolamina	3 ml

Preparació : Barrejar tots els productes fins a la total homogeneïtzació.**3 % Heparina en 0.85 % NaCl solution**

Heparine-sodium salt from piscine intestinal mucosa (3g en 100 ml)

0,85% NaCl: 0,85 g NaCl (Panreac) en 100 ml d'aigua Milli-Q.

Preparació: Aquesta solució va ser preparada de nou abans de l'extracció de la sang.**Buffer Urea Solution (BUS)**

2% mercaptoetanol

10 M Urea

1% Sodium dodecyl sulfat (SDS)

Preparació: Aquesta solució va ser preparada i emmagatzemada a temperatura ambient fins a la seva utilització.**Electroforesi, Western blot i detecció amb anticossos**

Les solucions utilitzades per l'anàlisi de les mostres de cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba* són les mateixes que les descrites anteriorment. Nogensmenys, a diferència de l'anterior, el percentatge d'acrilamida del gel de resolució és del 10%.

DMEM i HBSS modificat

Els medis de cultiu DMEM i HBSS utilitzats en els protocols d'exposició de les cèl·lules sanguínies de *Sparus sarba* varen ser suplementats amb 28 g/L de NaCl.

ANNEX 3. Altres documents publicats

A continuació, es presenten 3 capítols de llibre publicats.

Capítol de llibre 1.- Fulladosa E., Villaescusa I. "Study of Cr(VI) and Cd(II) ions toxicity using the Microtox bacterial assay" In: *Environmental Chemistry*. Springer book, 2004
(acceptat i en procés de publicació)

Abstract – The Microtox[®] bioassay, based upon the fading of light emitted by the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* when exposed to noxious substances, was used for studying the changes in speciation and the related changes in toxicity of two metals known as environmental pollutants. It was verified that modifications of pH and of ionic composition of the incubation medium did not affect the standard toxicity of phenol. By contrast, Cr(VI) toxicity was found to decrease as pH increased, underscoring that hydrogenochromate anion, the dominant species at low pH, is the most harmful. Cr(VI) toxicity was not modified when changing the medium composition, as this metal does not form chloro-complexes in the presence of sodium chloride. Conversely, Cd(II) toxicity was almost unaffected by pH within the 5.0-7.0 range. Replacing sodium chloride either by sodium nitrate or by sodium perchlorate resulted in changes of the measured cadmium toxicity, due to changes in speciation. Free Cd²⁺ ion was found to be the most harmful toward the *Vibrio fischeri* bacteria. In conclusion, both pH and ionic composition are factors that strongly influence the measured toxicity of environmental samples containing hexavalent chromium and/or cadmium when using the Microtox[®] bioassay.

Keywords – Microtox[®]; metal speciation; water pollution; pH effect, ionic strength effect; toxicity

Capítol de llibre 2.- Fulladosa E., Gaubin Y., Skandrani D., Villaescusa I., Murat J.C. "Cultured human cells as biological detectors for assessing environmental toxicity" In: *Environmental Chemistry*. Springer book, 2004 (acceptat i en procés de publicació)

Abstract – The presented investigations were carried out in order to detect environmental pollutants using the HT29, HepG2 and A549 cultured human cells as biological sensors of toxicity. We measured the growth rate inhibition and the expression level of stress proteins after exposure to cadmium, nickel, chromium, ethanol, 1-propanol, benzene, toluene, xylene, dichlorobenzene and trichlorobenzenes. Threshold concentrations were determined for selected pollutants and significance as well as reliability of the results were discussed. New perspectives for developing improved biodefectors are reported.

Keywords – Environmental toxicity; biodefectors; cultured cells; stress proteins; heavy metals, organic pollutants.

Capítol de llibre 3.- Fulladosa, E., Murat, J.C., Martínez M., Villaescusa, I. "Biological indicators for assessing metal toxicity" In: *Chemical Industry and Environment* . Edited by Macías-Machin and Umbría, 2003. Pp. 359-367.

Abstract.- In the recent years, it has been seen an increase of the need of toxicity assays for providing information concerning potential impact of pollutants and heavy metals on environment. Several bioassays have been developed for that purpose. The provided results cannot be easily compared with respect to sensitivity and specificity. Therefore, using cadmium and chromium as experimental pollutants, a new approach was started by investigating, on three different biological models, the changes in sensitivity due to pollutant-related, organism-related and protocol-related effects. Importance of pH and medium composition when analyzing pollutant samples with bioassays are underscored. It also appears that the sensitivity and the reliability of bioassays depend on the triple interaction between 1) the chemical nature of the pollutant, 2) the medium composition and 3) the intrinsic nature of the test-organism.