



Desenvolupament i Aplicació de Bioassaigs per a la Monitorització Ambiental de Lligands del Receptor d'hidrocarburs d'Aril (AhR, Compostos Tipus Dioxina)

Alba Olivares Polo

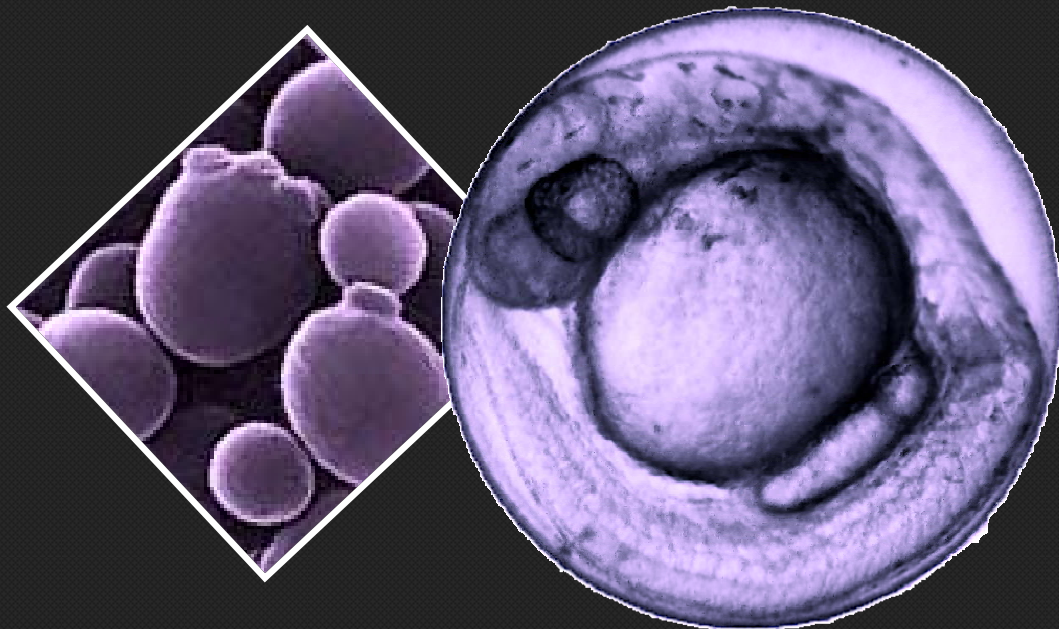
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis doctoral

**Desenvolupament i Aplicació de
Bioassaigs per a la Monitorització
Ambiental de Lligands del Receptor
d'hidrocarburs d'Aril
(AhR, Compostos Tipus Dioxina)**



**Alba Olivares Polo
2011**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular

Institut de Diagnòstic Ambiental
i estudis de l'aigua

Departament de Química Ambiental

**DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE BIOASSAIGS PER A
LA MONITORITZACIÓ AMBIENTAL DE LLIGANDS
DEL RECEPTOR D'HIDROCARBURS D'ARIL
(AhR, COMPOSTOS TIPUS DIOXINA)**

Tesis doctoral
Alba Olivares Polo

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
Programa de Doctorat en Biotecnologia
Bienni 2009-2011

**DESENVOLUPAMENT I APLICACIÓ DE BIOASSAIGS PER A
LA MONITORITZACIÓ AMBIENTAL DE LLIGANDS
DEL RECEPTOR D'HIDROCARBURS D'ARIL
(AhR, COMPOSTOS TIPUS DIOXINA)**

Memòria presentada per

Alba Olivares Polo

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Tutora:

Director:

Dra. Laura Baldomà Llavínés

Dr. Benjamí Piña Capó

Professora Titular
Departament de Bioquímica

Investigador Científic
Departament de Química
Ambiental

*A mis padres,
mi familia y
amigos*



A Albert y Clara

AGRAÏMENTS / AGRADECIMIENTOS / AKNOWLEDGEMENTS

Después de repasar la tesis varias veces sin nada que añadir, mirar figuras por enésima vez y hacer un repaso a internet, supongo que ha llegado el momento de empezar a escribir los agradecimientos. Dicen que es la parte más difícil de escribir y, sinceramente espero que no, aunque hay tanta gente a quién agradecer, tantas risas y cafés que recordar que no creo que pueda expresarlas todas sin escribir un segundo tomo.

Primero de todo, quiero agradecer al Dr. Benjamí Piña, director de la tesis, la oportunidad de realizar un proyecto que combina dos de mis temas preferidos: la biología molecular y el medio ambiente, de colaborar con diferentes grupos de investigación tanto nacionales como internacionales, por orientarme y conseguir que entienda unos mínimos de bioestadística (algo rozando lo imposible). También quiero aprovechar para agradecer a la Dra. Laura Baldomà por ejercer de tutora de esta tesis.

A la Dra. Susana Boronat (Sue), por acogerme en el laboratorio (ya como estudiante en prácticas durante la carrera) y enseñarme como desenvolverme en él, así como por todos los conocimientos relacionados con *S. cerevisiae*, desde su manipulación a su psicología.

A la Dra. Tania Noguerol, mi antecesora y de quién me siento muy orgullosa de poder llamar Doctora, por haberme enseñado todas la triquiñuelas del RYA y haberme legado los ensayos con los que he realizado buena parte de la tesis. Pero, sobretodo, por las risas, libros, series y películas que han llenado tantas horas de incubación.

A Marta Casado, por todas las sugerencias y ayudas varias tanto de laboratorio como de la vida - que han sido unas cuantas - así como por las correcciones de los trabajos escritos (incluida la tesis) y presentaciones orales, de las que creo que se ha hartado. Suerte con las levaduras... jejeje ;P

A todos los compañeros del lab 512, Laia Quirós, Marta Rojas, David Carro y como no, a Rosa que siempre estaba pendiente para ajustar, arreglar y hacer funcionar aparatos varios y, entre ellos, el viejo Victor3 que tanto estrés nos ha hecho pasar.

A "Nana" (Anna Navarro) y el "Senyuret Sergi" (Sergi Pelayo), por la cantidad de risas, conversaciones incoherentes, discusiones inútiles, viajes, helados (G... Canello), cenas, comidas, cafés y muuuchos etcéteras que han hecho la tesis algo divertido, no demasiado estresante y que volvería a repetir con los ojos cerrados. Os echaré muuucho de menos!!!!

A nuestra nueva compi del lab 502 (y primera invasora portuguesa ;P), la Señorita Eva Oliveira, por su paciencia con mi "habilidad" de expansión con el ordenador, la poyata, estiramientos varios, etc. Mucha suerte con la Tesis! ;D

A Josep Maria Ripol y Eva Prats, los dos miembros más fieles del coffee-club, por todas las charlas durante los cafés de la mañana y de la tarde que ayudan a empezar y mantener el día con una sonrisa. Y, como no, por esos panes de Ripol con los que ya no sabemos vivir sin ellos...

A todos los buenos vecinos de los laboratorios colindantes: Maria, Marlen, Mariette, Melissa, Joana, Bruno, Bene, Vicky, Denise, Sabine, Giorgio, Barbara, Silvia ... y otros que han ido pasando, por los buenos ratos y las risas en los cafés, comidas, cenas, etc. así como por las ayudas varias con aparatos, material, consejos, etc.

A todos los que han pasado por este laboratorio para compartir proyectos y horas de incubación de RYA, Eunate, José Antonio, Marin, Eli y, muy en especial a Solecita, por aportar aire nuevo al laboratorio así como compartir un pedacito de su vida, comida y cultura y por hacer de esta tesis un conjunto de estudios muy enriquecedores. Y, a otros visitantes, como Mari Carmen, que han llenado el laboratorio de risas y buenos momentos...

A Barend, per fer-me partícep d'un projecte tan interessant com la contaminació atmosfèrica així com pel seu temps i la seva paciència amb els coneixements bàsics de la química analítica.

To all the colleagues and friends in the RVIM, Dr. Leo van der Ven, Sanne, Esther, Eburne, Evert-Jan, Erik, Marja, etc. for hosting and helping me in my little adventure of a winter in De Nederlands. Dank u wel!

A Mari y Alba, por todo el soporte (y por soportarme...) durante los años de carrera y compartir el estrés de los exámenes, las penas de los doctorandos y continuar al pie del cañón como buenas amigas. Y, a Nessi (Vanesa), por convertirse en otra más, aguantando todas las discusiones sobre nuestros problemas en el lab... jejeje Para cuando otro viaje???? ;D

A Albert i Marc, per aquest any ple de bon rotllo, suport i treball en equip que, tot i les hores de feina, han permés realitzar projectes de qualitat, amb molt bons resultats i aprendre més enllà del que aporta una tesis. Això quedarà per sempre!

A mi padre, mi madre y a toda mi familia (titos, titas y primos, incluyendo mis tías adoptivas – Isa y Ángela) por ayudarme a ser quien soy, empujarme a seguir con mi “vocación” y, sobretodo, por estar siempre ahí. Sin vosotros no habría sido capaz de llegar tan lejos. ;D

Seguro que me he dejado por nombrar a alguien (lo siento pero, con o sin tesis, sigo siendo igual de despistada...) y hay muchas más cosas que me gustaría decir pero me faltan palabras (y espacio). Así que, muchas gracias a todos por acompañarme en esta etapa que ha sido muy enriquecedora, en la que he aprendido mucho (y no sólo científicamente hablando), no me ha faltado nada de diversión y siempre recordaré con mucho cariño. Gracias!

ÍNDEX

ÍNDIX

ABREVIATURES	a
I. INTRODUCCIÓ GENERAL	3
I.1. CONTAMINACIÓ i TOXICOLOGIA AMBIENTAL	3
I.2. XENOBIÒTICS	4
I.2.1. Metabolisme dels Xenobiòtics: biotransformació i eliminació.....	4
I.2.2. Mecanismes d'acció dels xenobiòtics	6
I.2.2.1. Receptor d'hidrocarburs d'Aril.....	7
I.2.3. Contaminants Químics Orgànics	10
I.2.3.1. Hidrocarburs Aromàtics Policíclics	10
I.2.3.2. Hidrocarburs Aromàtics Halogenats: compostos organoclorats.....	12
I.2.3.2.1. Policlorobifenils (PCBs).....	12
I.2.3.2.2. Dioxines i furans.....	14
I.2.3.2.3. Benzens Policlorats	15
I.2.3.2.4. Hexaclorociclohexans.....	16
I.2.3.2.5. DDT	17
I.2.4. Compartimentació dels xenobiòtics	19
I.2.4.1. Contaminació Atmosfèrica	20
I.2.4.2. Contaminació Hídrica	21
I.2.4.3. Contaminació del Sòl	23
I.3. BIOASSAIGS PER A LA DETECCIÓ DE XENOBIÒTICS	24
I.3.1. Criteris de valoració, mètodes de càlcul i models matemàtics per a l'anàlisi de l'activitat biològica	25
I.3.2. Bioassaig basat en llevat.....	28
I.3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a model	29
I.3.2.2. Bioassaig basat en llevat per a la detecció de compostos tipus dioxina	30
I.3.2.3. Sistema de detecció i quantificació.....	31
I.3.3. Bioassaig basat en embrions de <i>Danio rerio</i>	32
I.3.3.1. Embions <i>Danio rerio</i> com a model.....	33
I.3.3.2. Adaptació del bioassaig en Embrions de <i>Danio rerio</i> per a la detecció d'activitat associada a dioxines	35

I.3.3.3. Sistema de detecció i quantificació.....	36
I.3.4. Bioassaig basat en cèl·lules de vertebrat	39
II. OBJECTIUS	43
III.FACTOR d'IMPACTE.....	47
IV. RESULTATS.....	51
IV.1 CAPÍTOL 1: Aplicació dels Assaigs basats en llevats recombinants per a la determinació de la contaminació ambiental presents en sediments.....	55
IV.2 CAPÍTOL 2: Aplicació de l'Assaig de llevats recombinant per a la determinació de contaminació amb activitat tipus dioxina associada al particulat de l'aire.	127
IV.3 CAPÍTOL 3: Disseny, validació i aplicació del bioassaig en embrions de Peix zebra	141
IV.3.1 Disseny del bioassaig basat en embrions de Peix zebra.....	141
IV.3.2 Validació del bioassaig basat en embrions de Peix zebra (MolDarT-Short).....	147
IV.3.3 Comparació i Aplicació del bioassaig en peix zebra en mostres de contaminació atmosfèrica	153
V. Discussió	175
V.1. Estandardització, validació i aplicació dels bioassaigs basats en llevat i embrions de peix Zebra per a la monitorització de l'impacte ambiental per activitat tipus dioxina.	175
VI.1.1 Estudi de l'Impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'embassament de Flix i la part baixa del riu Ebre.	176
IV.1.2 Estudi de l'Impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'Estuari d'Urdaibai (País Basc).....	178
VI.1.3 Estudi de l'Impacte ambiental per activitat tipus dioxina en mostres atmosfèriques i la seva comparació amb residus miners dipositats al sòl	181
VI.1.4 Estandardització de l'assaig basat en llevat per activitat tipus dioxina.	184
IV.1.5 Disseny, validació i aplicació del bioassaig en embrions de peix zebra (MolDarT-Short (<i>cyp1a</i>)).....	185
VI. Conclusions	189
VII. Bibliografia.....	193

ABREVIATURES

ABREVIATURES

4-MU: 4-metil umbeliferona

AHR: Receptor d'hidrocarburs d'Aril (*Aryl hydrocarbon Receptor*)

AHRR: Repressor del Receptor d'hidrocarburs d'Aril (*Aryl Hydrocarbon Receptor Represor*)

B[a]Ant: Benzo-a-Antracè

B[a]Pyr: Benzo-a-Pirè

B[b]Flu: Benzo-b-fluorantè

B[g,h,i]Per: Benzo-g,h,i-Perilè

B[k]Flu: Benzo-k-fluorantè

β -NF: β -Naftoflavona

CFC: Clorofluorocarbonats

COV: Compostos Orgànics Volàtils

Crys: Crisè

CSHPF: Consell Superior de Salut Pública a França

Ct: Cicle llindar (*Cycle threshold*)

Cq: Cicle de quantificació

CYP: citocrom P450

D[a,h]Ant: Dibenz[a,h]Antracè

DDD: 1,1-dicloro-2,2-bis-(clorofenil)età

DDE: 1,1-diclor-2,2-bis(clorofenil)etilè

DDT: 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(clorofenil)età

E₂: 17 β -Estradiol

EC₁₀: Concentració Efectiva al 10% (*Effective Concentration at 10%*)

EC₅₀: Concentració Efectiva al 50% (*Effective Concentration at 50%*)

ECHA: Agència Europea de Productes Químics (*European Chemicals Agency*)

EEA: Agència Europea de Medi Ambient (*European Environmental Agency*)

ELL: Extracció Líquid-Líquid

EPA: Agència de Protecció mediambiental (*Environmental Protection Agency*)

EROD: etoxiresurfin-O-desetilasa

Flu: Fluorantè

GCeMS: Cromatografia de Gassos/Espectrometria de Masses amb ionització per impacte d'electrons (Gas Chromatography/mass spectrometry with electron impact ionization).

GFP: Proteïna Verda Fluorescent (*Green Fluorescent Protein*)

Gg: Gigagram

HAH: Hidrocarburs Aromàtics Halogenats

HCB: hexaclorobenzè

HCH: Hexaciclohexà

hpf: hores post fertilització

LBD: Domini d'Unió al Lligand (*Ligand Binding Domain*)

LC₅₀: Concentració Letal al 50% (*Lethal Concentration at 50%*)

LOEC: Concentració Mínima d'Efectes Observats (*Low Observed Effects Concentration*)

LOD: Límit de Detecció Observable (*Limit Observable of Detection*)

MUGal: 4-Metilumbeliferil-galactopiranosid

N₂ LIQ.: Nitrogen líquid

NES: Seqüència d'Exportació Nuclear (*Nuclear Exportation Sequence*)

NLS: Seqüència de Localització Nuclear (*Nuclear Location Sequence*)

NOEC: Concentració on No s'Observen Efectes (*No Observed Effect Concentration*)

OC: Compostos Organoclorats

OECD: Organització per la Cooperació Econòmica i el Desenvolupament (*Organization for Economic Co-operation and Development*)

OMS: Organització Mundial de la Salut

PAH: Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

PCB: Policlorobifenil

PCDD: Dibenzo-p-dioxina

PCDF: Dibenzo-p-furà

PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PeCB: PentaClorobenzè

Phe: Fenantrè

PM: Matèria Particulada (*Particulate Matter*)

POP: Contaminants Orgànics Persistents (*Persistent Organic Pollutants*)

Pyr: Pirè

qPCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa quantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

REACH: Registre, Avaluació, Autorització i Restricció de productes químics (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*).

REF: Referència

REP: Potència Relativa (*Relative Potency*)

RLU: Unitats de Llum Relativa (*Relative Light Units*)

RYA: Assaig basat en Llevat Recombinant (*Recombinant Yeast Assay*)

SPE: Extracció en Fase Sòlida (*Solid Phase Extraction*)

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

Test DarT: Test Teratogènic en *Danio rerio* (*Danio rerio Teratogenic Test*)

TEQ: Equivalents Tòxics (*Toxic Equivalents*)

UNEP: Programa de Mediambient de les Nacions Unides (*United Nations Environmental Programme*)

XRE: Element de Resposta a Xenobiòtics (*Xenobiotic Response Element*)

zFET: Test en Embrions de Peix zebra (*Zebrafish Embryo Test*)

I. INTRODUCCIÓ GENERAL

I. INTRODUCCIÓ GENERAL

I.1. CONTAMINACIÓ I TOXICOLOGIA AMBIENTAL

Es pot definir contaminació ambiental com qualsevol agent físic, químic, biològic o una combinació dels anteriors que pel lloc on es troba o per la seva forma i/o concentració, resulta nociu per la salut, la seguretat o el benestar dels éssers vius o dels ecosistemes.

La contaminació ambiental es pot classificar tenint en compte bé els agents que la causen (contaminació biològica, química, radioactiva, tèrmica, acústica o lumínica) o bé la matriu on es troben els contaminants (contaminació hídrica, atmosfèrica o del sòl).

En les últimes dècades, la contaminació ambiental ha esdevingut una prioritat a nivell mundial pel seu impacte en la salut i altres problemes derivats, el que ha donat lloc a la creació d'organismes oficials que s'encarreguen de valorar els riscos així com de legislar i controlar els nivells de contaminants al medi ambient. A la Comunitat Europea trobem l'EEA (*European Environmental Agency*, 1993) i l'ECHA (*European Chemicals Agency*), que es va fundar recentment a partir del reglament REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) al 2007. A nivell mundial tenim l'OMS (Organització Mundial de la Salut) i l'UNEP (*United Nations Environment Programme*) i, com a organisme de referència, podem trobar l'EPA (*Environmental Protection Agency*, 1970) als Estats Units.

En aquest mateix sentit, s'han realitzat diverses conferències amb l'ànim d'establir acords a nivell mundial per reduir les emissions de contaminants com per exemple, la Convenció d'Estocolm sobre els Contaminants Orgànics Persistents (POP, *Persistent Organic Pollutants*) al 2001 que va reunir 128 països i que al 2011 compta amb el recolzament de 173 (<http://chm.pops.int>).

La Toxicologia ambiental és la ciència que estudia els efectes adversos que causen els contaminants a tots els nivells: cel·lular, tissular, orgànic, individual, d'espècie, comunitat i ecosistema, així com els mecanismes d'acció i de transport, el seu metabolisme i els mecanismes de detoxificació dels xenobiòtics sobre el medi biòtic. Així doncs, no només es valora les repercussions dels contaminants sobre els organismes sinó també el seu impacte a l'ecosistema de manera que permet una avaluació integrada i, per tant, una millor gestió dels seus riscos (Peña et al., 2001).

I.2. XENOBIÒTICS

Els xenobiòtics són compostos que es troben als éssers vius, tot i no formar part de la seva bioquímica normal, i que tenen la capacitat de produir alteracions en les vies metabòliques ja sigui de manera immediata, a mig o a llarg termini. També es consideren xenobiòtics compostos naturals quan la seva concentració supera en molt la considerada fisiològica. Es poden trobar tan a l'aire, l'aigua o el sòl així com retinguts a l'interior dels éssers vius quan aquests no són fàcils d'eliminar, donant lloc al fenomen de bioacumulació. L'entrada a l'organisme pot ser per diferents vies: oral, respiratòria, cutània, etc. i, en el cas dels xenobiòtics bioacumulats als organismes, mitjançant l'alimentació. D'aquesta manera, l'augment de contaminants per la xarxa tròfica és molt més elevada a l'obtinguda per cap altre via, donant lloc al procés conegut com a biomagnificació. Els xenobiòtics són, per tant, compostos d'interès per a ser estudiats, detectats i controlats.

Els xenobiòtics es poden classificar segons el seu origen, les seves característiques fisicoquímiques o els seus efectes. Part dels contaminants es caracteritzen per tenir una estructura química poc freqüent o inexistent a la natura degut a què són compostos sintetitzats de forma artificial. La major part d'aquests compostos han aparegut en els últims cent anys, com ara els compostos organoclorats. D'altres, tot i formar-se per processos naturals, com poden ser els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), s'ha vist augmentada la seva producció per la utilització de productes fòssils com a principal font d'energia.

Els organismes, per la seva banda, han desenvolupat sistemes de detoxificació davant d'aquest tipus de compostos, el que s'anomena Metabolisme de Xenobiòtics. Aquest sistema inclou varies vies metabòliques que s'encarreguen de transformar els contaminants de manera que siguin més fàcils d'eliminar de l'organisme.

I.2.1. Metabolisme de Xenobiòtics: biotransformació i eliminació

Els compostos xenobiòtics tenen estructures molt variables de manera que el sistema de detoxificació cel·lular ha de ser poc específic però, a la vegada, ha d'afectar el mínim possible a les molècules pròpies de l'organisme. Dintre dels diferents tipus de xenobiòtics, els més perillosos són els compostos liposolubles per la seva capacitat de difondre per les membranes cel·lulars sense necessitat de transportadors específics. A més, un cop dins de la cèl·lula, com a conseqüència de la seva escassa solubilitat en l'aigua, aquests compostos són molt difícils d'eliminar. Per aquests motius, el metabolisme de xenobiòtics s'ha centrat en la transformació de xenobiòtics lipofílics per tal de facilitar la seva excreció pel transport actiu de membrana i, a la vegada, impedir que tornin a entrar a la cèl·lula mitjançant la difusió simple.

En aquest procés de detoxificació intervenen un conjunt d'enzims poc específics que permeten reconèixer un ampli ventall de compostos i, que segons les seves funcions, es poden dividir en tres fases o etapes: modificació, conjugació i eliminació.

A la fase I o fase de modificació, actuen enzims encarregats d'introduir grups funcionals de caràcter reactiu (hidroxils, amino o carboxils) als xenobiòtics mitjançant reaccions d'oxidació, reducció o hidròlisi. La superfamília d'enzims citocrom P-450, amb més de 2000 isoformes diferents, és la més destacada dintre d'aquesta fase així com la més estudiada. Una de les principals característiques d'aquests enzims és la gran varietat de processos que poden catalitzar així com la quantitat de substrats diferents que poden metabolitzar. Utilitzen oxigen molecular i NADPH per oxidar els substrats de manera que, al final del procés, es converteixen en molècules més polars, normalment per al incorporació d'un grup hidroxil, i preparada per a que actuïn els enzims de la Fase II (Peña et al., 2001 i Donato, 2002).

La fase II, o fase de conjugació, consisteix en una sèrie de reaccions de conjugació on actuen enzims amb diferents activitats transferasa. Aquests enzims s'encarreguen d'unir grups polars relativament grans, com el glutatió o el sulfat, als productes de la Fase I o a xenobiòtics que ja presenten grups reactius. D'aquesta manera, es converteixen en compostos estables, molt poc reactius i amb una elevada solubilitat en l'aigua. Finalment, una vegada els xenobiòtics són hidrosolubles, es poden eliminar mitjançant proteïnes de la fase III. Aquestes consisteixen en transportadors de membrana actius que bombegen els contaminants biotransformats a l'exterior.

Tot i que el sistema de detoxificació de xenobiòtics és força eficaç, cal tenir en compte que segons el tipus de compost o la barreja d'aquests pot tenir lloc el fenomen conegut com a bioactivació. Aquest procés consisteix en la producció de metabòlits amb més toxicitat que el compost parental degut, principalment, a l'activitat dels enzims de la Fase I tot i que també pot tenir lloc a la Fase II

Una de les principals causes de la bioactivació és la producció de compostos amb grups de caràcter electrofílic molt reactius amb molta afinitat per molècules amb grups nucleofílics com el DNA, les proteïnes o els lípids. Aquest seria el cas del Benzo[a]pirè (B[a]Pyr), un compost amb activitat carcinogènica degut a què, una vegada metabolitzat, s'obté un epoxidiol que forma adductes amb el DNA (Peña et al., 2001 i Dipple et al., 1995).

Un altre conseqüència negativa del sistema de detoxificació es el fenomen de desacoplament del cicle catalític del citocrom. En aquest cas, es consumeixen els electrons del cofactor NADPH sense produir metabòlits oxidats de manera que es produeix l'alliberament de radicals de

superòxid (O_2^-), un grup molt reactiu també capaç de produir lesions al DNA, proteïnes i lípids (Meunier, et al., 2004 i Peña et al., 2001).

Aquests efectes es poden veure agreujats quan els xenobiòtics presents són molt estables, de manera que no s'excreten fàcilment i el seu temps de residència al organisme és força elevat, com és el cas dels compostos organoclorats (dioxines, furans, PCBs, etc.). Per altra banda, hi ha xenobiòtics que al induir els enzims del seu metabolisme produeixen la bioactivació d'altres compostos que per si mateixos no eren tan tòxics. O, a l'inversa, compostos que inhibeixen el metabolisme dels xenobiòtics de manera que no es poden biotransformar i eliminar, augmentant així els seus efectes nocius a l'organisme. Finalment, la biotransformació d'alguns compostos els fa més biodisponibles o afavoreix el seu desplaçament per l'organisme de manera que poden afectar a més òrgans.

I.2.2. Mecanismes d'acció dels xenobiòtics

Els mecanismes mitjançant els quals els xenobiòtics causen danys al organismes són múltiples i es solen combinar entre si. Aquests varien segons les propietats fisicoquímiques dels contaminants i de la seva via d'entrada que determinen amb quines molècules pròpies de l'organisme poden interaccionar.

Alguns contaminants químics orgànics que contenen anells aromàtics i alcans ciclats poden mimetitzar substàncies endògenes com hormones i compostos del tipus esteroidal. Aquest tipus d'estructura els permet actuar com a lligands dels receptors que regulen el sistema hormonal i desencadenar respostes cel·lulars no requerides. La disrupció del sistema endocrí afecta als processos relacionats amb la reproducció (Receptor d'estrògens, andrògens, progesterona i testosterona) i d'altres també regulats per receptors nuclears (sistemes tiroideu i retinoic, per exemple), que influeixen en el metabolisme general, sistema cardíac, resposta immune, desenvolupament, etc.

Per altra banda, alguns d'aquests compostos són reconeguts pel sistema de detoxificació de xenobiòtics mitjançant el Receptor d'hidrocarburs d'Aril (AhR). L'activació de l'AhR sol afavorir l'eliminació d'aquests compostos mitjançant la inducció dels gens implicats en el seu metabolisme però en alguns casos dona lloc a la bioactivació dels contaminants o a la producció de grups reactius, convertint-los en substàncies més tòxiques que els compostos parentals. Així mateix, quan la inducció és dona de forma reiterada s'han observat problemes associats a les altres vies on també participa aquest receptor.

Finalment, alguns d'aquests xenobiòtics s'han vist implicats en fenòmens de genotoxicitat mitjançant la interacció directa amb els àcids nucleics formant adductes entre el DNA i el compost o un dels seus metabòlits.

I.2.2.1. Receptor d'hidrocarburs d'Aril

El Receptor d'hidrocarburs d'Aril (AhR, *Aryl hydrocarbon Receptor*) és un factor de transcripció activat per lligand, també conegut com a Receptor de Dioxines per la seva mediació en els efectes nocius d'aquestes. L'AhR pertany a la família de reguladors transcripcionals bàsic Hèlix-Loop-Hèlix/Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) que controlen diversos processos fisiològics i de desenvolupament com la neurogènesis, el ritme circadià o la resposta a hipòxia.

L'estructura de l'AhR es divideix en diferents dominis funcionals (Figura I.1). A l'extrem N-terminal, es troba el motiu de bHLH que permet la unió del receptor a les seqüències específiques de DNA així com les Senyals de Localització Nuclear (NLS, *Nuclear Location Sequence*) i d'Exportació Nuclear (NES, *Nuclear Export Sequence*) que permeten l'entrada i la sortida del AhR del nucli (Ikuta et al., 1998). A continuació, es troben 2 dominis PAS que, juntament amb el motiu bHLH, permeten l'heterodimertització amb l'ARNT (Translocador Nuclear de l'AhR) o amb la HSP90 (*Heat Shock Protein90*) en la forma inactiva del receptor. El domini d'unió a lligand (LBD, *Ligand Binding Domain*) està format majoritàriament pel domini PAS-B que conté diversos residus d'aminoàcids molt conservats degut a que són crítics per al reconeixement del lligand. Finalment, a l'extrem C-terminal, es troba el domini encarregat de l'activació de la transcripció que es caracteritza per una zona molt rica en glutamina.

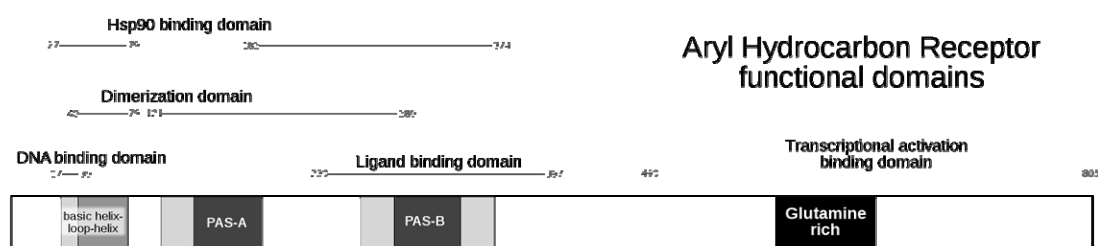


Figura I.1. Estructura del Receptor d'hidrocarburs d'Aril (AhR)

L'AhR es sol trobar en la seva forma inactiva al citoplasma, unit a un complex de multiproteïnes on majoritàriament es troba la xaperona HSP90 assistida de les co-xaperones XAP2 i p23. Aquest complex ajuda l'AhR a mantenir el plegament adequat per a la seva unió al lligand i impedeixen la seva unió al ARNT, així com la seva degradació de forma prematura. A més, bloquegen el senyal de transferència al nucli (Mimura et al., 2003).

La unió del lligand a l'AhR provoca un canvi conformacional en la seva estructura que fa que s'alliberin el complex de xaperones que el mantenia inactiu. D'aquesta manera, s'activa el senyal de transport nuclear i s'allibera el lloc d'unió al ARNt, que permet la seva entrada al nucli i la seva dimerització amb el seu translocador. El complex AhR-ligand-ARNt s'uneix als llocs específics que es troben als promotors dels gens diana anomenats Elements de Resposta a Xenobiòtics (XRE, *Xenobiotic Response Element*) i que es caracteritzen per tenir la seqüència conservada *TNGGTG*. Finalment, s'activa l'expressió dels gens regulats per l'AhR en col·laboració amb altres cofactors com CBP, P300 i RIP140.

L'AhR regula, principalment, l'expressió dels gens de la Fase I del metabolisme de xenobiòtics (Família CYP1A) i de la Fase II (NADP(H):oxidoreductasa, GST-Ya i UDP-glucuronosiltransferase), així com el NRF2, un factor de transcripció que s'encarrega d'activar una bateria de gens relacionats amb la defensa d'antioxidants. No obstant, també regula gens relacionats amb la proliferació cel·lular (TGF- β i IL-1 β), la regulació del cicle cel·lular (p21, p27, jun-B i jun-D) o l'apoptosis (Bax). En quant a la regulació pròpia del AhR, el receptor indueix la transcripció del seu propi repressor (AHRR) que competeix de forma directa per formar l'heterodímer amb ARNt. El complex ARNt-AHRR bloqueja els llocs d'unió XRE, implicant la transcripció dels gens diana (Mimura et al., 2003 i Bock et al., 2006).

La família de monooxigenases citocrom P450 1 (CYP1) és una de les més importants en la primera fase del metabolisme de xenobiòtics, drogues i substàncies esteroïdees. Està formada per 2 subfamílies (CYP1A i CYP1B) que a mamífers consten de 3 gens: CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1. El gen CYP1A1 és un gen que sol presentar una expressió basal molt baixa en la major part de teixits però que s'activa fortament per la presència de lligands de l'AhR. Aquest gen codifica per l'enzim Aryl Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) i té un paper molt important en l'activació de compostos pre-carcinògens com els PAHs (Lucia et al., 2009). El gen CYP1A2 s'expressa només al fetge i també participa en l'activació de pre-carcinògens com les amines aromàtiques o l'aflatoxina B1 així com participa al metabolisme dels fàrmacs. El gen CYP1B1 s'expressa de forma constitutiva a diversos òrgans, però no al fetge i està més relacionat amb el metabolisme de molècules endògenes i processos com el de creixement i diferenciació cel·lular (Donato, 2002). Les diferències genètiques així com fenotípiques (dieta, fàrmacs, etc.) que varien l'expressió i/o activitat d'aquests gens, s'ha vist com una de les principals fonts de variabilitat en els efectes causats pels xenobiòtics.

Els lligands clàssics del AHR es caracteritzen per contenir anells aromàtics amb una estructura planar i unes dimensions màximes de 14 x 12 x 5 Å que els permet unir-se al LBD del receptor i desencadenar la via de senyalització del AhR. El seu grau d'afinitat ve marcat, principalment, per les seves propietats termodinàmiques i electroquímiques, que són fonamentals per garantir

una unió eficaç (Waller and Mckinney, 1995). Tot i així, s'ha vist que molècules que no s'ajusten del tot a l'estructura clàssica poden induir la transcripció dels gens diana amb l'ajut de l'ARNT que permet reclutar els cofactors necessaris per activar la transcriptasa (Boronat et al., 2007).

Les dioxines i, en part, els PCBs coplanars són els lligands amb més afinitat per l'AhR amb constants de dissociació en un rang de pM a nM. Aquests compostos són d'origen sintètic i, degut als substituents halogenats, tenen una major estabilitat al medi ambient. Els Hidrocarburs Aromàtics Policíclics, tot i que presenten força afinitat, aquesta és menor (nM a μ M) i la seva degradació és molt més efectiva (Denison and Nagy, 2003).

Els lligands produïts pels propis organismes són un grup molt ampli de famílies de compostos que es caracteritzen per contenir al menys un anell aromàtic i poder activar l'AhR. En general, es poden diferenciar segons si els adquirim a través de la dieta (isoflavones o carotinoids) o si són endògens dels organismes (derivats del triptòfan) (Denison and Nagy, 2003). Aquests lligands solen ser dèbils (afinitat a concentracions majors de μ M), fàcilment degradables i molt d'ells es considera que tenen activitat antioxidant. Aquesta activitat pot ser deguda per la seva capacitat d'activar de forma lleu l'AhR, sense crear productes reactius que permeten activar la via d'antioxidació a través del NRF2. Per altra banda, es coneix que alguns dels lligands endògens s'uneixen a grups reactius de forma directa i impedeixen la seva interacció amb els àcids nucleics (Middleton et al., 2000).

La funció més coneguda del l'AhR, almenys fins al moment, és activar la resposta adaptativa dels organismes per combatre la presència de contaminants químics orgànics, facilitant la seva biotransformació i excreció. No obstant, en els últims anys, s'han realitzat diversos estudis que mostren la implicació del AhR en processos de desenvolupament ajudant a la diferenciació de cèl·lules T, neurones i hepatòcits (Quintana et al., 2008; Akahoshi et al., 2006; Walisser et al., 2005). Aquestes altres funcions expliquen la gran varietat d'efectes en la salut derivats de la sobreactivació d'aquest receptor.

La major part dels problemes relacionats amb l'AhR és solen associar amb els efectes de la dioxina (TCDD, veure apartat I.2.3.2.2) que es caracteritzen per produir toxicitat a la pell (cloracné i altres cicatrius), immunodepressió (disminució del tim), problemes cognitius i d'aprenentatge, hepatotoxicitat i l'augment d'incidència de càncer, sobretot al fetge (Bock et al. 2006). Per altra banda, també s'ha observat que en el cas dels PAHs, augmenten la incidència del càncer de pulmó (Amstrong, et al., 2004) i és possible que també afectin al sistema cardiovascular (EPA, 2010). Diversos estudis realitzats amb ratolins *knockdown* per l'AhR (-/-) i ratolins quimeres (AhR +/-) mostren que l'absència de l'AhR redueix en gran mesura, si no totalment, els efectes derivats del TCDD, situant a l'AhR com a desencadenant dels seus efectes

tòxics mitjançant la seva bioactivació (Thurmond et al., 1999; Middleton et al., 2000; Miller et al., 1978). En canvi, estudis d'exposició de ratolins *knockdown* per l'AhR a B[a]Pyr (de la família dels PAHs) han demostrat que, encara que siguin en general menys sensibles que els ratolins normals, a altes dosis de B[a]Pyr presenten més adductes de Benzo-a-piré/DNA que els ratolins *wildtype*, de manera que es pot concloure que l'activació del AhR facilita l'excreció del compost i que això pot tenir una funció protectora (Sagredo et al., 2009).

I.2.3. Contaminants Químics Orgànics

Els contaminants químics orgànics són substàncies formades per enllaços covalents carboni-carboni i carboni-hidrogen que poden contenir anells aromàtics així com diferent tipus de substituents (halògens, alcohols, amines, etc.) que els hi confereixen una estructura tridimensional complexa. Solen ser molècules apolars amb la capacitat d'activar el metabolisme de xenobiòtics i, en el cas dels compostos halogenats, solen bioacumular-se degut a la seva difícil degradació.

Tot i que alguns contaminants orgànics no són una novetat a la natura (els PAHs es produeixen en qualsevol procés de combustió incompleta), en bona part s'han introduït en els últims anys donat el desenvolupament de productes amb propietats específiques per determinades aplicacions (retardants de flama, pesticides, protectors solars, etc.) o com a subproductes dels processos industrials.

I.2.3.1. Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs)

Els PAHs són substàncies compostes únicament per carboni i hidrogen que contenen 2 o més anells aromàtics fusionats entre si, sense cap tipus d'heteroàtoms o substituents. El nombre d'anells i la seva disposició fan variar les seves propietats fisicoquímiques però, en general, es caracteritzen per ser sòlids a temperatura ambient, tenir punts de fusió i ebullició molt elevats i molt poca solubilitat en aigua. A causa d'aquestes propietats, els PAHs es solen trobar dipositats al sòl i sediments o al partículat de l'aire i l'aigua.

Aquest grup de contaminants està format per més de 100 congèneres diferents que s'alliberen durant els processos de combustió incomplets o a altes pressions i solen produir-se com una barreja complexa dels compostos individuals que varia de composició segons la font i el procés de producció.

Els PAHs es poden originar per processos naturals com l'activitat volcànica, els incendis forestals o la síntesis microbiana tot i que, actualment, la major part de la producció és d'origen

antropogènic. Les principals fonts de contaminació provenen del processament i la combustió de productes fòssils (carbó i derivats del petroli) així com alguns processos industrials, la crema de fusta o el fum del tabac que també té un paper rellevant.

La importància del seu estudi ve relacionada amb la identificació d'alguns d'aquests compostos com carcinògens, mutàgens o teratògens i es caracteritzen, principalment, per la seva capacitat d'unir-se a l'AhR i activar els gens relacionats amb el metabolisme de xenobiòtics. Així mateix, es coneix que alguns dels PAHs o dels seus derivats metabòlics tenen la capacitat de formar adductes amb el DNA que donen lloc a mutacions gèniques i poden derivar en tumors i càncer (Denison et al., 1998 i Dipple, 1995).

Dintre d'aquest grup, s'han identificat 16 congèneres com a contaminants d'elevat interès medi ambiental, 7 dels quals tenen activitat carcinogènica coneguda (destacats en negreta): acenaftè, acenaftilè, Antracè, **Benz[a]antracè (B[a]Ant)**, **Benzo[a]pirè (B[a]Pyr)**, **Benzo[b]fluorantè (B[b]flu)**, Benzo[g,h,i]perilè (B[g,h,i]Per) **Benzo[k]fluorantè (B[k]Flu)**, **Crisè (Crys)**, **Dibenz[a,h]antracè (D[a,h]Ant)**, Fenantrè (Phe), Fluorantè (Flu), Fluorè, **Indeno[1,2,3-cd]pirè**, Naftalè (Nap) i Pirè (Pyr) (Franco et al., 2008; USEPA, 1998 i Timme-laragy et al., 2007).

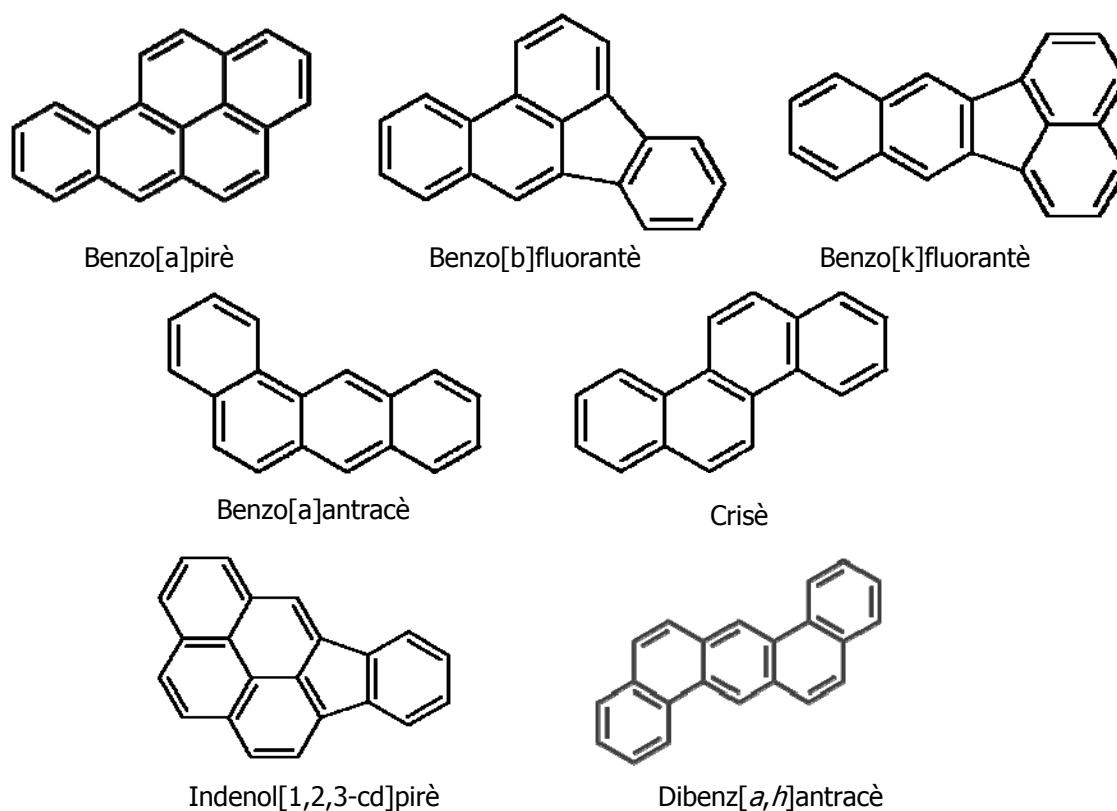


Figura I.2. Hidrocarburs Aromàtics Policíclics amb activitat carcinogènica coneguda.

I.2.3.2. Hidrocarburs Aromàtics Halogenats: Compostos Organoclorats

Els hidrocarburs aromàtics es poden estabilitzar químicament mitjançant l'intercanvi d'àtoms d'hidrogen per substituents halogenats obtenint els Hidrocarburs Aromàtics Halogenats (HAHs). Quan el substituent utilitzat és el clor, s'anomenen Compostos Organoclorats (OCs, *Organochlorine Compounds*). Els OCs són els més utilitzats dintre del HAHs degut a què els àtoms de clor són els que aporten més estabilitat i funcions als nous compostos.

Els compostos organoclorats formen part dels contaminants orgànics persistents que, com els seu nom indica, són compostos orgànics molt difícils de degradar donat la seva gran hidrofobicitat i estabilitat química. Els POPs tendeixen a bioacumular-se als teixits adiposos dels organismes per la seva lipolificitat (bioconcentració) i es biomagnifiquen a través de la xarxa tròfica.

El fet de què s'acumulin de forma indefinida al medi ambient, juntament amb una elevada capacitat de dispersió al ser compostos semivolàtils, els ha destacat com a contaminants ambientals importants. Això ha comportat la realització d'estudis sobre els diferents grups, els seus efectes i les seves propietats.

I.2.3.2.1. Policlorobifenils (PCBs)

Els policlorobifenils o bifenils policlorats són una família de 209 congèneres derivats del bifenil, al qual es substitueixen els àtoms d'hidrogen per àtoms de clor de manera que la seva fórmula general es pot expressar com $C_{12}H_{10-n}Cl_n$. El número total de clors (n) pot variar entre 1 i 10 i la seva distribució es pot combinar en diferents posicions que determinen en gran part la seva toxicitat i el mode d'acció (Crinnion, 2011 i Erikson et al., 2010).

Segons l'estructura dels PCBs, es poden dividir en dos categories: coplanars (no-orto-sustituïts) i no coplanars (orto-sustituïts). Els PCBs que no presenten àtoms de clor a les posicions en orto (2, 2', 6, 6', Figura I.3) poden adoptar una conformació coplanar, de manera que els dos anells es troben al mateix pla com és el cas del PCB126. Aquesta estructura és molt similar a la de les dioxines i furans de manera que els PCBs coplanars poden actuar com a lligands del AhR i causar efectes similar a aquests. Els PCBs que presenten una substitució en posició orto (Mono-orto) i alguns amb dos substitucions (Di-orto) derivats de PCBs coplanar encara poden mantenir una estructura força plana i interaccionar amb l'AhR però amb menor afinitat (PCB118 o PCB180) i, per això, són considerats dintre de la categoria dels PCBs coplanars.

Els PCBs no coplanars, són aquells que contenen com a mínim 2 substitucions de clor, una en cada anell fenil, de manera que l'impediment estèric d'aquests substituents no permet que la

molècula adopti una conformació plana. Aquests PCBs no poden interaccionar amb l'AhR i, per tant, no poden activar els enzims de la família CYP1A.

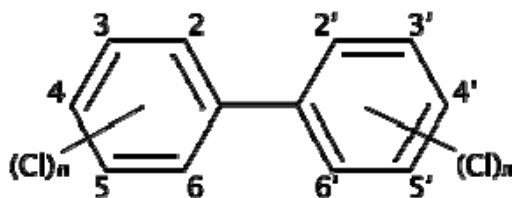


Figura I.3. Fórmula estructural del bifenils policlorats.

El PCBs es caracteritzen per la elevada estabilitat química i tèrmica, són molt poc inflamables i tenen les constants dielèctriques baixes. Aquestes propietats els fan molt útils com a aïllants d'equips elèctrics o com a retardants de flama i, des dels anys 30 que va començar la seva producció industrial, es van utilitzar en pintures, lubricants, olis d'immersió o com a plaguicides.

Aquestes mateixes propietats els converteixen en xenobiòtics molt perillosos pel medi ambient ja que són compostos molt difícils d'eliminar i tenen una gran capacitat per afectar als sers vius. El seu procés de degradació és extremadament complicat i presenta un elevat risc de produir compostos encara més tòxics (dibenzodioxines i dibenzofurans) si el procés d'oxidació no és complet.

Els PCBs presenten una gran varietat d'efectes en la salut que depenen, en part, de les propietats de cada congènere. En exposicions agudes a dosis elevades, s'han observat lesions dèrmiques (cloracné) i oculars així com desordres respiratoris. Com a efectes a llarg termini, s'han descrit hepatotoxicitat, neurotoxicitat, teratogènesis, immunotoxicitat i disrupció endocrina (sistema reproductiu i tiroïdal) (Aoki, 2001 and IARC supplement 7, 1998). Part d'aquest efectes són molt semblants als observats per les dioxines i estan relacionats amb la capacitat d'interaccionar amb l'AhR dels PCBs coplanars. Per l'altre banda, els PCBs no coplanars tenen la capacitat de mimetitzar molècules endògenes dels organismes i unir-se a receptors i transportadors específics causant disrupcions en les vies metabòliques. Aquest és el cas dels PCBs que són capaços de mimetitzar el 17 β -estradiol i activar el receptor d'estrògens de forma ectòpica causant problemes al sistema reproductiu o dels PCBs que alteren el sistema tiroïdal unint-se al transportador de l'hormona tiroïdea T4 (Chauhan et al., 2000). Els problemes de desenvolupament cognitiu en nens exposats a PCBs per la placenta o la llet materna sembla que venen donats per la interferència dels PCBs en les senyals de transducció dependent de calci que causen neurotoxicitat (Simon et al., 2007). Així mateix s'ha vist en estudis d'animals que, tot i que són poc mutagènics (IARC supplement 7, 1998), si que promouen el càncer sobretot, hepàtic (NIHPS, 2006 i IARC supplement 7, 1998).

Tot i que els efectes adversos es coneixien des d'abans de la seva aplicació industrial, no va ser fins a finals dels anys 80 que es va prohibir la seva producció a la major part dels països, arrel de diversos incidents que van fer patents els seus greus efectes no només sobre els animals sinó també sobre l'ésser humà (Yusho 1968 (Japó) i Yu-Cheng 1979 (Taiwan)). No obstant, la utilització dels PCBs va continuar fins al 2004 quan va entrar en vigor la prohibició signada durant la Convenció d'Estocolm sobre Contaminants Orgànics Persistents al 2001.

Actualment encara es poden trobar grans quantitats de PCBs a la major part de la biosfera incloent àrees remotes com els llacs d'alta muntanya (Grimalt et al., 2004; Garcia-Reyero et al., 2005 i Boronat et al., 2009). Aquests es troben principalment acumulats en sediments i sòls pel seu caràcter hidrofòbic però es van alliberant poc a poc a l'aigua i l'atmosfera així com entrant en la xarxa tròfica mitjançant animals aquàtics de manera que els converteix en una font constant de contaminants.

I.2.3.2.2. Dioxines i furans

Les dibenzo-*p*-dioxines policlorades (PCDDs) i els dibenzo-*p*-furans (PCDFs) policlorats són dos grups de compostos diferents als que comunament se'ls coneix com a dioxines. Es caracteritzen per tenir a la seva estructura dos anells benzènics units per un anell central heterocíclic amb un (furans) o dos (dioxines) àtoms d'oxigen i presentant diverses substitucions halogenades (normalment clors) sobre els anells benzènics.

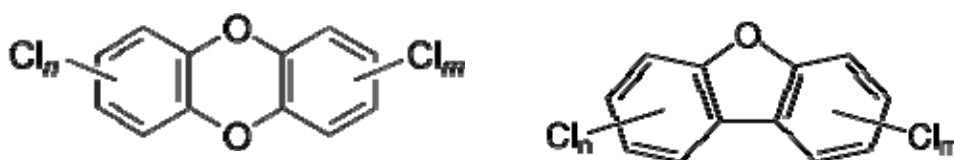


Figura I.4. Fórmula estructural de les dibenzo-*p*-dioxines i dibenzo-*p*-furans policlorats

En ambdós casos, els àtoms de clor es poden unir a les 8 posicions disponibles, donant lloc a 75 congèneres diferents en el cas dels PCDDs i 135 als PCDFs. La toxicitat dels PCDDs depèn del número i les posicions dels substituents de clor. La dioxina més tòxica és la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Aquest és un dels tòxics principals de l'Agent Taronja, l'agent químic utilitzat durant la guerra del Vietnam.

Els PCDDs i PCDFs es produeixen exclusivament com a subproductes durant els processos de combustió o de producció i/o degradació de compostos organoclorats com PCBs, pesticides i herbicides. També s'ha observat la seva producció residual en processos de blanqueig de paper o d'estabilització dels fangs en el tractament d'aigües residuals.

Els efectes en la salut estan, principalment, mediat per la interacció amb l'Ahr i l'activació dels enzims de la família CYP1A. Estudis en rates *Ahr-knock-down* han demostrat que en absència del receptor d'hidrocarburs d'aril, els animals no presenten els símptomes de toxicitat aguda per ingestió de dioxines (Mimura et al., 2003). Per altra banda, els efectes varien no només pels congèneres utilitzats sinó també segons les espècies (diferents afinitats de l'Ahr) i el tipus d'exposicions, agudes o cròniques. Tan les dioxines com els furans són carcinogènics reconeguts. Altres dels efectes descrits són lesions dèrmiques (cloracnè i hiperquetatinització), hepàtiques i a les glàndules endocrines. Així mateix, s'observa una pèrdua progressiva de pes, hemorràgia gastrointestinals, disminució de l'íngest d'aliments i atrofiament del tim. També es sospita que puguin afectar al sistema circulatori així com al sistema tiroïdal i reproductiu (Mandal et al., 2005).

La major part de la incorporació de dioxines en humans es realitza a través dels aliments (llet i derivats làctics, carn i peix). Els límits establerts en aquests productes es mesuren en el greixos dels aliments degut a què és on s'acumulen per la seva lipofilitat. El Consell Superior de Salut Pública de França (CSHPF) va establir al 1998 en 1 pg TEQ/g greixos de la llet com el límit basal (quantitat màxima tolerable). Fins a 3 pg TEQ/g greixos de la llet com a quantitat màxima acceptable i, a partir de 5 pg TEQ/g greixos de la llet, com a aliments no aptes pel consum (TEQ, Toxic Equivalents, veure apartat I.2.3). El llinar d'emissió de dioxines al medi ambient establerts a Espanya (*Real Decreto* 508/2007) són de 0,0001 kg/any tan a l'atmosfera, l'aigua o al sòl. No obstant, aquests valors no són límits legals sinó de referència. La FDA (Administració d'Aliments i Drogues d'Estats Units) recomana no menjar peixos ni marisc amb nivells de TCDD majors a 50 ppt i la EPA ha establert un límit de 0,00003 µg/L de TCDD en l'aigua potable.

I.2.3.2.3. Benzens Policlorats

Els Benzens Policlorats consisteixen en un anell de benzè al qual se li substitueixen els àtoms d'hidrogen per àtoms de clor. Aquests compostos s'utilitzen principalment com a precursors de pesticides i com a solvents orgànics. El clorobenzè també es va utilitzar als seu moment com a precursor per a la producció de fenol i DDT i el para-diclorobenzè (pDCB), un dels isòmers dels diclorobenzens, es molt utilitzat com a desinfectant industrial.

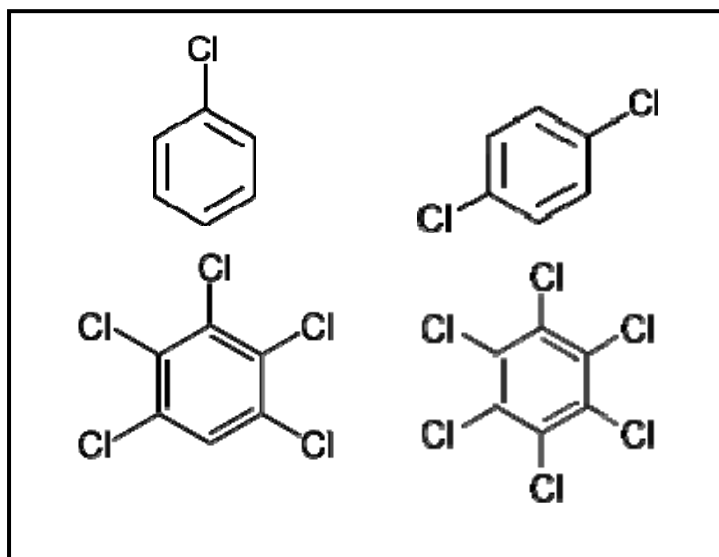


Figura I.5. Formula del clorobenzè, pdiclorobenzè, pentaclorobenzè i hexaclorobenzè d'esquerra a dreta.

Els congèneres amb més número de clors, pentaclorobenzè (PeCB) i hexaclorobenzè (HCB), formen part dels Contaminants Orgànics Persistents (POPs), raó per la qual es va prohibir la seva utilització a Europa a arrel de la convenció a Estocolm al 2001. L'hexaclorobenzè era utilitzat com a fungicida als cereals així com en la producció de focs artificials i de municció. Actualment està classificat com a possible carcinògen en humans. El pentaclorobenzè s'utilitzava com a retardant de flama i de forma conjunta amb els PCBs per tal de reduir la seva viscositat. Ambdós compostos són molt perillosos per als organismes aquàtics i la seva descomposició mitjançant calor els converteix en precursors de dioxines i compostos corrosius com l'àcid clorhídric.

Els efectes en la salut a humans observats per la intoxicació per benzens policlorats són principalment la irritació de la pell i les mucoses de les vies respiratòries. En exposicions cròniques, s'han observat cicatrius a la pell, artrosi sense dolor i engrandiment de la tiroide i el fetge entre altres (Anatòlia, Turquia 1955-1959). En estudis al laboratori, l'hexaclorobenzè augmenta les incidències de càncer al fetge, ronyons i tiroides. El hexaclorobenzè i el para-diclorobenzè apareixen a la "Proposició dels 65" de Califòrnia com a carcinogènics des del 1989. Actualment, la EPA recomana que els nivells de benzens policlorats a llacs i rius es limitin a 0,488 ppm per evitar possibles efectes en la salut com a conseqüència d'ingerir animals contaminats.

I.2.3.2.4. Hexaclorociclohexans

Els hexaclorociclohexans (HCHs) estan formats per un anell d'hexà que té tots els àtoms de carboni units a un àtom de clor. Depenent de si els clors estan en cis o trans i la combinació d'aquests es poden obtenir 8 isòmers, la majoria amb baixa activitat biològica. El gamma-

hexaclorociclohexà (γ -HCH) també conegut com a Lindà és l'únic isòmer amb activitat insecticida que es comercialitza de forma pura (>90%). La resta d'isòmers es comercialitza en una barreja anomenada de Qualitat Tècnica amb un 10-15% de γ -HCH a més de α HCH, β HCH, δ HCH i ϵ HCH que es caracteritza per ser molt més econòmica que el Lindà.

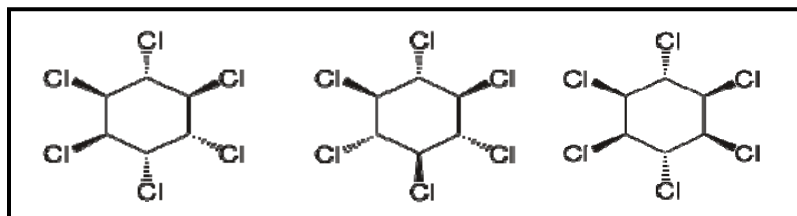


Figura I.6. Formula dels 3 isòmers principals dels hexaclorociclohexans (α HCH, β HCH i γ -HCH)

El lindà s'utilitzava principalment com a plaguicida en cultius de fruites, hortalisses i plantacions forestals així com a fàrmac en locions i xampús per a combatre els polls i la sarna. El lindà afecta principalment al sistema nerviós ja que el seu mode d'acció és actuar com a neurotoxina a través del neurotransmissor GABA. Així mateix s'han observat efectes al fetge i als ronyons. A causa dels seus efectes a la salut i al medi ambient, al 2006 es va prohibir la seva utilització com a plaguicida en 55 països i en 33 es va restringir el seu ús. En quant al tractament de polls i sarna, es recomana utilitzar-ho com a segona opció.

No obstant, els isòmers més tòxic són l' α HCH i el β HCH tot i no tenir activitat insecticida. Al 2004, la Organització Mundial de la Salut va concloure que no era probable que el lindà representés un risc com a carcinògen pels humans i, actualment, només la barreja de qualitat tècnica es considera per la Proposició dels 65 de Califòrnia i la EPA com a possible carcinògen, tot i no tenir el suficient potencial per avaluar-ho en humans.

1.2.3.2.5. DDT

El DDT o diclorodifeniltricloroetà és un compost format per 2 anells de benzè i 5 àtoms de clor en una disposició molt característica (Figura I.7). És un compost molt hidrofòbic que es produeix a partir d'una reacció de l'àcid sulfúric amb clorobenzè o cloral. Els productes comercials inclouen una barreja dels isòmers *p,p'*-DDT (>70%) i *p,o'*-DDT (15%) i dels seus productes de degradació, DDE (Diclorodifenildicloroetilè) i DDD (diclorodifenildicloroetà).

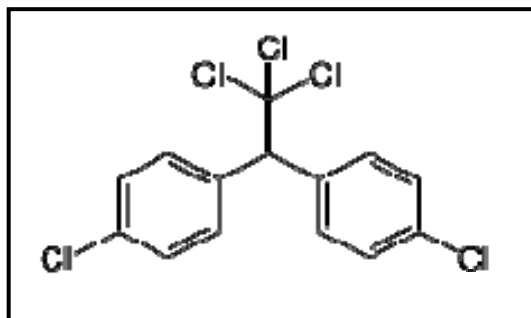


Figura I.7. Formula del p,p'-DDT

El DDT és un compost persistent que, amb el temps, sol metabolitzar-se en compostos encara més estables com el DDE o el DDD. El seu caràcter hidrofòbic fa que s'acumuli al sòl, als sediments, al partículat de l'aire i, sobretot, als teixits adiposos dels organismes vius. En aquest cas, sol bioacumular-se als organismes, transferint-se per la xarxa tròfica i biomagnificant els seus efectes, sobretot, en ocells raptaries que s'alimenten d'altres animals. Aquest compost és especialment letal pels insectes, raó per la qual es va estendre tan el seu ús i per la qual encara s'autoritza la seva utilització. El seu mecanisme d'acció és l'obertura dels canals de sodi de les neurones dels insectes produint la seva destrucció instantània i, finalment, la mort de l'individu. La mutació del gen de canal de sodi crea la resistència dels insectes al DDT així com l'activació dels gens de la família del citocrom P450.

Així mateix, el DDT i els seus derivats són molt tòxics per crustacis i amfibis així com per la reproducció d'algunes espècies d'ocells degut a què disminueixen el gruix de les closques dels ous dificultant la seva supervivència. En el cas dels humans, el DDT es caracteritza pels seus efectes genotòxics i de disrupció endocrina (alteració del sistema hormonal) que deriven en càncers i problemes de desenvolupament i reproducció.

El DDT va ser molt utilitzat des del 1939 quan es va descobrir la seva gran eficàcia per controlar malalties com la malària o el tifus i, poc després, es va ampliar el seu ús a l'agricultura i al control de plagues. Aquesta utilització massiva va produir greus desequilibris als ecosistemes així com problemes de salut a humans i va accelerar l'aparició de soques d'insectes resistents. Al 1972, els Estats Units van ser dels primers països que va prohibir el seu ús en l'agricultura fins que, al 2004, es va prohibir a tot el món sota el Conveni d'Estocolm. Des de llavors, només es continua autoritzant la seva utilització com a control dels vectors de la malària i el tifus.

I.2.4. Compartimentació dels xenobiòtics

Els xenobiòtics es poden trobar en diferents compartiments ambientals: aire, aigua, sòls i biota segons el tipus d'abocament o d'alliberació que s'ha realitzat i de les característiques fisicoquímiques dels contaminants que determinaran la seva dispersió per la biosfera. Per tal d'expressar la quantitat de contaminants presents al medi ambient, s'utilitzen diferents unitats segons la matriu d'on provenen.

Matriu	Unitats
Emissions Atmosfèriques	g/m ³
Medi Hídric	g/L
Sòls i Sediments	g/g de pes sec
Mostres Biològiques	g/kg de pes fresc o g/g greix

Taula I.1. Unitats en les que s'expressen les dades de contaminació segons el tipus de matriu.

Per altra banda, a més de mesurar la quantitat de contaminants també es pot mesurar l'activitat biològica de la mostra. Mitjançant assaigs o indicadors biològics, l'activitat biològica mesura els efectes dels xenobiòtics als organismes i els compara amb una substància tòxica de referència donant lloc als equivalents tòxics (TEQs), expressats en diferents unitats segons la matriu (veure taula I.1). L'Activitat biològica pot tenir en compte diferents paràmetres fisiològics així com diferents organismes model. Actualment, també existeixen diversos programes informàtics per predir l'activitat biològica dels compostos químics a partir de la seva estructura i propietat fisicoquímiques (Q-Sar) (Mantovani et al., 2006).

Matriu	Unitats
Emissions Atmosfèriques	g TEQ/m ³
Medi Hídric	g TEQ/L
Sòls i Sediments	g TEQ/g de pes sec
Mostres Biològiques	g TEQ/kg de pes fresc o g TEQ/g greix

Taula I.2. Unitats en les que s'expressen les dades d'activitat biològica segons el tipus de matriu.

La utilització de l'activitat biològica com a paràmetre per mesurar els nivells de contaminació presenta avantatges com la capacitat de detectar qualsevol compost present a la mostra amb l'activitat que s'està mesurant, ja siguin productes de nova generació que no es coneixen o que no s'han establert metodologies o Standard per analitzar-los químicament. Per altra banda, té desavantatges com la falta de coneixements sobre el tipus de molècules que causen la

contaminació, de manera que no permet establir d'on provenen els contaminants, ni quina seria la millor estratègia per a la protecció del medi ambient i la salut humana. Així mateix, només pot detectar els compostos amb la o les activitat que s'estan estudiant. Per aquesta raó, es recomana la utilització de l'aproximació química i biològica a l'hora de determinar la contaminació ambiental.

I.2.4.1. Contaminació Atmosfèrica

La contaminació atmosfèrica o contaminació de l'aire està formada, principalment, per substàncies gasoses com compostos de sofre (SO_x , SH_2 , mercaptans), nitrogen (NO_x), carboni inorgànic (CO i CO_2) i halogenats (HF , HCl) així com per Compostos Orgànics Volàtils (COVs) on es troba principalment el metà però també el benzè o els clorofluorocarbonats (CFCs).

Per altra banda, a l'aire també es troben partícules sòlides o líquides molt fines en suspensió anomenades matèria particulada (PM). Aquestes provenen de processos naturals com l'activitat volcànica, tempestes de pols, incendis forestals o l'escuma del mar i de processos antropogènics com crema de combustibles fòssils en vehicles i plantes d'energia. Els contaminants associats a la matèria particulada són principalment els PAHs i altres compostos orgànics descrits anteriorment anteriorment en aquest treball per les seves característiques hidrofòbiques i semivolàtils. També es poden trobar metalls com plom, el cadmi o el coure. L'augment de partícules en suspensió s'està vinculant amb el risc de partir malalties del cor, alteracions de la funció pulmonar i el càncer de pulmó (EPA, 2010; Gauderman et al., 2004 i Brook et al., 2010).

Per tal d'analitzar la matèria particulada, es recomana la utilització de filtres de fibra de vidre, de quars o de politetrafluorètilè. Aquestes es poden impregnar d'alguna substància que fixi els compostos específics que es vulgui analitzar i la mida dels filtres determina la mida de les partícules que s'obtidran. Actualment es solen utilitzar filtres de $10\ \mu\text{m}$ per estudiar les partícules toràciques (PM_{10}) i de $2,5\ \mu\text{m}$ per a les partícules respirables o $\text{PM}_{2,5}$, tal i com es recull a la norma UNE 77-213-1997.

Des del 2005, els valors màxims de PM_{10} permesos per la Unió Europea són de $40\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (mitja anual) i $50\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ (mitja diària amb un marge de 35 dies a l'any que pot superar aquest límit). En el cas d'Espanya, on les intrusions de pols africà fan augmentar significativament els valors de partícules a l'aire, es corregeixen els valors de PM_{10} descomptant aquests efectes (article 4 del RD 1073/2002). A l'últim informe sobre la qualitat de l'aire on es recullen dades des del 2006 fins al 2009, es pot observar com cada any van disminuint les zones que superen el límits

establerts de PM_{10} . A la Figura I.8, es pot observar com de les 138 zones estudiades, 11 zones amb límit diari i 2 amb límit anual superen el valor permès al 2009. Mentre que al 2006, van ser 61 i 40, les zones que van superar el límit diari i anual, respectivament, de les 127 estudiades (*Área Calidad Aire, 2009*).

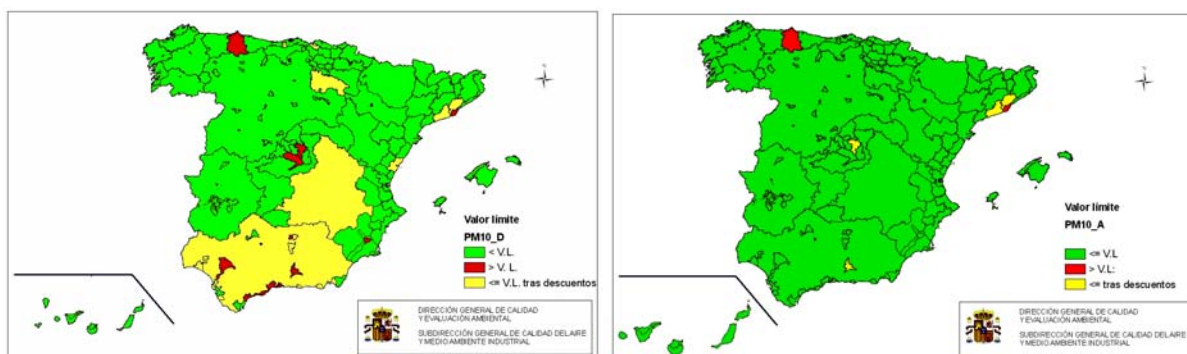


Figura I.8. Avaluació del valor límit diari i anual (esquerra-dreta) de PM_{10} per a la protecció de la salut al 2009 (*Área Calidad Aire, 2009*).

Tot i així, en els últims anys a la Unió Europea s'està donant molta més importància a les partícules respirables ($PM_{2,5}$) de manera que s'ha establert el seu nivell estàndard en $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (mitja anual) però aquesta limitació no entrarà en vigor fins al 2015. En el cas dels PAHs, el valor estàndard està establert en $1 \text{ ng}/\text{m}^3$ (mitja anual expressada en concentració de Benzo[a]pirè).

En quant a l'emissió total de contaminants atmosfèrics, al 2001, el Parlament Europeu va establir uns sostres d'emissió que tot els estats membres havien de complir com a molt tard al 2010 segons la Directiva 2001/81/CE - Annex I. Els límits anuals establerts per a Espanya són 847 Gigagrams de NO_x , 662 Gigagrams de Compostos Orgànics Volàtils, 746 Gigagrams de SO_x i 353 Gigagrams de NH_3 (Gigagram (Gg) equival a 1000 tonelades).

I.2.4.2. Contaminació Hídrica

La contaminació hídrica o contaminació de l'aigua inclou la contaminació de qualsevol formació aquosa (llacs, rius, mars, oceans i del mantell freàtic). La major part ve donada per abocaments directes (controlats o accidentals) de la indústria i de les aigües municipals. Altres vies són la deposició a l'aigua dels contaminants que viatgen per l'atmosfera, sobretot en llacs d'alta

muntaña o en zones amb temperatures ambientals molt baixes, i la filtració de contaminants acumulats als sòls per la pluja (ITES-Paraninfo, 2001).

Els contaminants que es poden trobar a l'aigua són molt diversos, sobretot per la utilització de l'aigua com a via principal per eliminar els residus. Per una part, es troben aquells que alteren els paràmetres fisicoquímics de l'aigua (pH, temperatura, salinitat, etc.). Per l'altre, els nutrients (N i P) i la matèria orgànica que causa eutrofització i hipòxia. També són important considerar la presència d'organismes patògens (*Salmonella*, bacteries coliformes, paràsits, etc.) i d'aquelles substàncies que causen toxicitat com els compostos inorgànics, el metalls i organometalls i els compostos orgànics. Els contaminants orgànics solen precipitar i acumular-se al sediments per les seves característiques hidrofòbiques. L'acumulació d'aquests compostos depèn en gran mesura de la velocitat de l'aigua i de la textura dels sediment (mida i composició). També poden acumular-se a la biota al ser ingerits o respirats, sobretot en animals que busquen aliment entre els sediments (detritívors).

Dintre de tots aquests contaminants, la Comissió Europea a establert una llista de 33 substàncies prioritàries i 8 altres contaminants dintre de la Directiva del Marc de l'aigua (Annex II de la Directiva 2008/105/EC) on es destaquen el productes fitosanitaris, biocides, metalls i PAHs. En el cas de les aigües de consum humà, a la Comunitat Europea s'estableix com a límit de BaP en 0,01 µg/L i de PAHs en 0,1 µg/L. Pel que fa als plaguicides (pesticides, herbicides, etc.) s'estableix en 0,5 µg/L tot i que a nivell individual no poden superar el 0,3 µg/L (Directiva 98/83/CE).

Per tal d'analitzar la presència de contaminants orgànics a l'aigua, es poden realitzar extraccions amb solvents orgànics com l'Extracció Líquid-Líquid (ELL) o l'Extracció en Fase Sòlida (SPE, *Solid Phase Extraction*). En el cas dels sediments, la recollida de la mostra es pot fer de les capes superficials o de testimonis (cilindres de sediment que permeten estratificar la mostra i avaluar segons la profunditat i les característiques del sediment). Pel que fa a l'extracció, també es realitza amb solvents orgànics amb tècniques com el Soxhlet (extracció amb dissolvents a altes temperatures), mitjançant ultrasons (incubació del sediment i el dissolvent en ultrasons) i l'ASE® (Accelerated Solvent Extractor) que combina solvents a altes temperatures amb pressions elevades. La utilització de solvents apolars com el diclorometà o l'hexà permeten l'extracció de compostos orgànics poc iònics com els PAHs, PCBs i insecticides organoclorats. La utilització de solvents polars com el metanol permeten l'extracció de compostos iònics com els herbicides (ITES-Paraninfo, 2001).

1.2.4.3. Contaminació del Sòl

La contaminació del sòl ve donada per abocaments directes o indirectes de residus o productes tòxics que acaben dipositats a una porció de terreny subterrani o de superfície. Les principals fonts d'aquest tipus de contaminació, a més de l'abocament directe, són l'aplicació de plaguicides, l'esquerdament de tancs d'emmagatzematge i la filtració d'aigües contaminades pels estrats del subsòl o per la lixiviació dels residus dels abocadors (ITES-Paraninfo, 2001).

Els contaminants que es troben al sòl varien segons l'ús del terreny i el seu grau d'industrialització però, normalment, són compostos hidrofòbics com els hidrocarburs del petroli, els solvents orgànics o els plaguicides i metalls pesants com el plom. Dintre de les activitats que es consideren potencials de causar contaminació als sòls, es troben la indústria del petroli i derivats, la indústria tèxtil, la indústria química (producció de plaguicides, pintures i solvents) i la indústria del paper així com el transport i emmagatzemament de substàncies perilloses o de tractament de residus (Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental, 2007).

La presència de sòls pol·lucionats pot contaminar aigües subterrànies i superficials així com l'aire per l'aixecament de pols, combustió, etc. o intoxicar humans i animals per contacte directe (ingerir pols) o a través de la cadena alimentària. El procediment per a la recollida de mostres i l'extracció dels contaminants d'interès es realitza amb els mateixos protocols que en el cas dels sediments.

La normativa per determinar la contaminació del sòl estableix diferents límits segons el tipus de sòl (urbà, industrial o altres) i segons si es considera prioritària la protecció humana o de l'ecosistema. La llista dels contaminants considerats per la legislació espanyola es pot trobar a l'Annex V del Real Decret RD 9/2005. En el cas de la protecció humana, es declara que un sòl està contaminat quan la concentració d'un dels compostos llistats supera 100 o més vegades els valors de referència establerts. Per PAHs com el benzo(a)piré, els valors es troben en 0,2 mg/kg pes sec en sòl urbà i 2 mg/kg en sòl industrial. Els HCHs en 0,1 i 1 mg/kg per sòl urbà i industrial respectivament i els PCBs en 0,08 i 0,8 mg/kg de pes sec.

En el cas que es consideri més important la protecció dels ecosistemes, es tenen en compte els valors de la concentració letal al 50% (LC50, *Lethal Concentration*) o concentració efectiva al 50% (EC50, *Effective Concentration*) determinats mitjançant els mètodes establerts per la OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) en organismes terrestres i en organismes aquàtics. Pels mètodes amb organismes terrestres es declara el sòl contaminat quan el valor de LC50 o EC50 és inferior a 10 mg de terra contaminada per gram de terra i, amb organismes aquàtics, quan és inferior a 10 mL de lixiviat per litre d'aigua.

I.3. BIOASSAIGS PER A LA DETECCIÓ DE XENOBIÒTICS

Els bioassaigs són mètodes que ajuden a determinar l'activitat biològica d'un agent (substància o mostra ambiental) mitjançant la comparació dels seus efectes amb els que produeix un element control (solvents i estàndards). D'aquesta manera permeten interpretar els nivells de contaminació ambiental en termes biològics.

Per tal de determinar l'activitat biològica, es poden utilitzar biomarcadors i biosensors. Els biomarcadors són respostes del propi organisme en front dels contaminants que es poden detectar i quantificar per establir una relació de causa i efecte (p. Ex. Canvis activitat proteïna o de l'expressió gènica). Els biosensors són eines que utilitzen elements biològics (proteïnes, enzims, etc.) per a detectar i/o transmetre un senyal quan apareix el contaminant (o substància) que es vol detectar (p. Ex. Test de glucosa o cultius cel·lular que incorporen gens reporter) (Peña et al., 2001).

Per a definir un bioassaig, es necessari establir una sèrie de paràmetres per tal d'obtenir una resposta consistent i reproduïble que depengui dels xenobiòtics que es vulguin estudiar. Per exemple, el temps d'exposició i les concentracions adequades per poder avaluar i quantificar els efectes que es volen observar. Altres paràmetres a considerar són l'espècie utilitzada i, en el cas del biosensor, l'espècie d'on prové l'element sensor (receptor) ja que pot influir en la sensibilitat. Així mateix, cal tenir en compte les necessitats de cultiu i cicles de vida dels organismes utilitzats.

Els bioassaigs poden ser qualitius o quantitius depenent dels mètodes de detecció (valoració o mesura) i de la capacitat per estimar la concentració d'una substància segons la seva resposta biològica. Els bioassaigs quantitius solen analitzar-se per mètodes de biostatística que aporten el valor de significança de l'assaig. El temps d'exposició al contaminant també permet classificar els assaigs en aguts (màxim 24 hores), subcrònics (menor del 10% del període de vida estimat per l'organisme d'estudi) o crònics (més del 10% del període vital). Cada tipus de bioassaig permet observar un model de resposta diferent, des d'una resposta primària i més específica a la via d'acció dels contaminants fins a una resposta d'adaptació a aquests. Així mateix, es poden realitzar bioassaigs de reproducció, que permeten avaluar els efectes produïts a les següents generacions (inclouen com a mínim 3 generacions), i els bioassaigs de recuperació, que permeten estudiar els processos de recobriment dels organismes que passen d'un entorn contaminat a un entorn no pol·luït.

En aquest treball s'han utilitzat i desenvolupat diferent tipus de bioassaigs per tal de detectar la presència de contaminants amb capacitat per activar el Receptor d'hidrocarburs d'Arl: dos biosensors, un basat en un llevat modificat amb el sensor humà (hAhR) i l'altre basat en

cèl·lules d'hepatoma de rata amb el seu propi sensor (rAhR). Per altra banda, un biomarcador en embrions de peix zebra (variació de l'expressió del gen *cyp1a*). La raó per la qual s'utilitzen diferents mètodes recau en els avantatges propis de cada tècnica. El biosensor basat en llevat és molt específic, donat que només detecta aquells compostos que són capaços d'activar el receptor amb l'ajuda de ARNt. En canvi, el biosensor en cèl·lules de vertebrat permet ampliar el rang de compostos detectats degut a què les pròpies cèl·lules aporten cofactors que col·laboren en el sistema de l'AhR. I, finalment, els embrions de peix zebra proporcionen informació sobre la reacció d'un organisme sencer enfront dels contaminants ambientals.

I.3.1. Criteris de valoració, mètodes de càlcul i models matemàtics per a l'anàlisi de l'activitat biològica

Els criteris de valoració s'han establert per poder traduir l'activitat biològica en valors que permetin la comparació entre diferents xenobiòtics, mostres o bioassaigs. Per tal de calcular aquests criteris, es necessari que els efectes observats siguin quantificables, graduals i dependents de la concentració del contaminant. D'aquesta manera, es poden representar els efectes tòxics respecte a la concentració de xenobiòtic donant lloc a una corba dosi-resposta que sol adoptar una forma sigmoïdal, semblant a la corba d'una cinètica enzimàtica (Figura I.9).

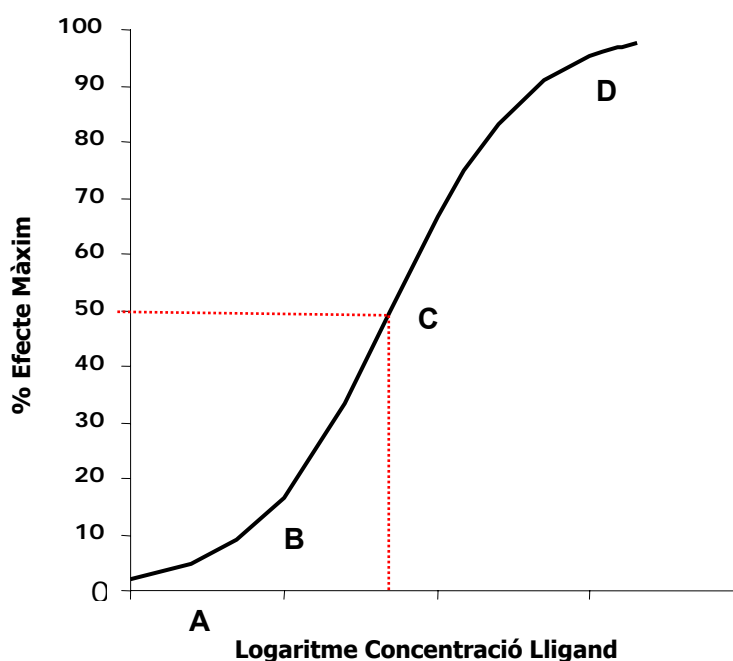


Figura I.9. Corba dosi-resposta típica (% Efecte màxim vs. Logaritme de la concentració de lligand). A correspon al NOEC (concentracions de la corba on no s'observa efecte), B correspon a la zona on trobem el LOEC i EC_{10} (concentració on es comencen a observar efectes tòxics i a la qual s'observa el 10% de l'activitat màxima, respectivament), C correspon a la EC_{50} (concentració on s'observa el 50% d'efecte tòxic) i D correspon a l'efecte màxim observat.

A partir de la corba dosi-resposta es poden establir diferents paràmetres com la potència del xenobiòtic, que fa referència al rang de concentració a la que actúa o la seva eficàcia, que correspon a l'amplitud de l'efecte tòxic entre l'activitat basal (A) i l'efecte màxim (D). També, es poden determinar els criteris de valoració que tenen en compte el límit mínim d'efecte. Aquests es troben a la regió entre l'absència de xenobiòtic, on no hi ha activitat o aquesta és basal (A), i la concentració on l'efecte tòxic és significativament diferent de l'activitat basal (B). Aquests valors són la Concentració d'Efecte No Observat (NOEC, *No Observed Effect Concentration*), la Mínima Concentració d'Observació d'Efecte (LOEC, *Low Observed Effect Concentration*) o la Concentració Efectiva al 10% d'activitat (EC10, *Effective Concentration 10%*).

Per altra banda, es pot calcular el criteri de valoració que es troba en la zona linial de la corba (C), l'EC50. Aquest valor és molt reproducible i correspon a la concentració de xenobiòtic que dóna una resposta igual a la meitat de l'efecte màxim. Als estudis de supervivència, s'utilitza el concepte de Concentració Letal al 50% (LC50) que correspon a la concentració a la que moren la meitat dels individus de l'assaig. En toxicologia ambiental es sol utilitzar el concepte de concentració degut a què fa referència a la quantitat de xenobiòtics trobades al medi. Però en toxicologia animal i humana, es sol utilitzar el concepte de dosis perquè té en compte la quantitat de xenobiòtic per pes de l'organisme així com els processos d'absorció i distribució pels òrgans.

Per a delimitar els valors de NOEC, LOEC i EC10 s'utilitzen mètodes bioestadístics que determinen la probabilitat de què l'activitat obtinguda per l'exposició a una mostra sigui diferent a l'obtinguda pels nivells basals o controls de l'assaig. Per tal d'obtenir uns nivells de confiança adequats, es necessari realitzar un mínim de replicats biològics i tècnics amb la menor variació possible.

Per determinar l'EC50 d'un compost, s'han d'ajustar els valors de la seva corba dosi-resposta al model matemàtic adequat per l'efecte biològic que s'està observant. En el cas dels efectes mediats per la unió del xenobiòtic a un receptor, es pot descriure la seva dosi-resposta amb l'equació d'equilibri entre les molècules de lligand lliure i de lligand unit al receptor presents en la solució (Figura I.10).



Figura I.10. Equació d'equilibri del lligand amb el seu receptor

On (R) representa la concentració de receptor lliure, (L) la concentració de lligand lliure i (LR) la concentració de lligand unit al receptor que mantenen l'equilibri segons la seva constant de

dissociació (K_d). Aquest model representa aquelles situacions on només s'uneix una molècula de lligand per receptor com és el cas de l'AhR.

Si la quantitat de lligand és molt més gran que la de receptor, la fracció de receptor unit al lligand (θ_L) es pot descriure per l'equació de Hill on R_t correspon la quantitat total de receptor. Quan la meitat del receptor total es troba unit al lligand (θ_L igual a 0,5), la K_d és igual a la concentració de lligand present al medi, i que correspon al l' EC_{50} (Figura I.11).

$$\Phi_L = \frac{[LR]}{R_t} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$$

Figura I.11. Equació de Hill

En la major part dels bioassaigs, aquest càlcul correspon a una extrapolació perquè no s'observa de forma directa la unió del lligand a l'hormona sinó la conseqüència d'aquesta. L'extrapolació d'aquests valors assumeix que la unió del lligand amb el receptor és el pas limitant del bioassaig.

Per tal de poder comparar les activitats biològiques de diferents substàncies es sol calcular la Potència Relativa de cada compost (REP, *Relative Potency*) de manera que es refereixen els valors d' EC_{50} a la substància utilitzada com a estàndard (o de referència) que té un REP igual a 1 (Figura I.12).

$$REP = \frac{EC_{50} \text{ (Compost)}}{EC_{50} \text{ (Estàndard)}}$$

Figura I.12. Equació de càlcul del valor de REP per cada compost estàndard respecte el compost de referència

En el cas de les mostres ambientals, on la seva composició sol ser una barreja complexa de compostos, es poden presentar els valors d'activitat referits al compost de referència. D'aquesta manera, l'activitat equivalent d'una mostra correspon a la quantitat de compost estàndard necessari per donar la mateixa resposta biològica que aquesta (TEQs). Els TEQs es calculen tenint en compte l' EC_{50} del compost de referència en unitats de concentració i l' EC_{50} de la mostra en unitats de Factor de Dil·lució (Fd):

$$TEQ = EC_{50} \text{ Estàndard} \times E_{50} \text{ Factor dilució mostra}$$

A partir dels valors de REP també es pot calcular l'activitat teòrica d'una mostra en Equivalents del compost de referència (TEQs teòrics) mitjançant la suma de la concentració de cada compost present a la mostra per el seu REP. Per tal de què el càlcul sigui adient, l'activitat biològica dels diferents compostos ha de ser aditiva (no tenir fenòmens d'inhibició o de sinèrgia) i s'han d'haver detectat la major part de les substàncies amb activitat biològica presents a la mostra.

$$\text{TEQ}_{\text{teòrics}} = \Sigma (\text{REP} \times \text{concentració de compost amb activitat biològica})$$

Per cada tipus d'activitat biològica, s'ha d'establir un compost de referència així com per cada tipus de bioassaig s'han d'establir els valors de TEFs. En el cas dels compostos capaços d'activar l'AhR, també anomenats compostos amb activitat tipus dioxina, com no hi ha un compost propi del receptor es solen utilitzar diferents estàndards. El més utilitzat és el 2,3,7,8-TCDD per la seva gran afinitat per l'AhR però, actualment, també s'utilitzen d'altres com la β -Naftoflavona o el Benzo-a-piré que, tot i tenir força afinitat pel receptor, són compostos menys persistents i per tant, relativament menys perillosos a l'hora de manipular-los i pel medi ambient. Els valors de TEQ per la β -NF s'anomenen NFQs i pels BaP s'anomenen BaPeqs. Els compostos amb activitat estrogènica (capaços d'activar l'ER) utilitzen un dels seus compostos endògens amb més activitat, el 17 β -Estradiol, i els seus valors equivalents s'anomenen EEQs.

I.3.2. Bioassaig basat en llevats recombinants

Els bioassais basats en llevats recombinants, coneguts com RYA (*Recombinant Yeast Assay*), utilitzen la maquinària cel·lular del llevat per reproduir els mecanismes d'activació propis de cèl·lules de vertebrats. Aquests assais es caracteritzen per incorporar, com a mínim, dos elements recombinants: un sistema d'expressió del receptor específic pels contaminants, i un element transductor, format per un gen d'assaig o reporter controlat per un promotor amb els elements de resposta específics per cada receptor. Aquest sistema permet que només s'obtingui expressió del gen reporter quan el receptor s'activa per la unió a un dels seus lligands (Miller3rd et al., 2007 i Piña et al., 2009).

Els gens reporters utilitzats per desenvolupar els assais RYA són variats així com els mètodes per detectar-los. D'origen bacterià, es troben la β -galactosidasa (lacZ) i la β -glucuronidasa (GUS) que es caracteritzen per poder utilitzar substrats tan colorimètrics com fluorimètrics. La Luciferasa (LUC), que prové de les lluernes (*Photinus pyralis*), s'encarrega d'oxidar el seu substrat (luciferina) per donar lloc a bioluminescència. En canvi, la proteïna verda fluorescent (GFP, *Green Fluorescent Protein*), que prové de la medusa *Aequorea victoria*, és una proteïna autofluorescent de manera que emet fluorescència quan s'irradia a la longitud d'ona adequada.

Tot i que aquests gens tenen una sensibilitat similar, el gen reporter més utilitzat és el LacZ per la seva gran varietat tan de substrats com de plàsmids i constructes disponibles (Miller3rd et al., 2007).

La incorporació del material genètic que codifica pels receptors i gens reporter dels bioassaigs es pot realitzar mitjançant la integració del constructe al genoma del llevat per recombinació homòloga, creant un cromosoma artificial o utilitzant el plàsmid 2μ propi dels llevats. Aquest plàsmid d'elevat nombre de còpies assegura la presència de 10 a 20 rèpliques del plàsmid d'interès per cèl·lula, sempre i quan, es mantingui la pressió selectiva mitjançant auxotrofies d'aminàcids o de bases nitrogenades. L'expressió del receptors es pot regular per promotors constitutius o induïbles segons les necessitats de cada bioassaig. Els promotors induïbles més utilitzats a llevat són aquells regulats per galactosa o cobre per la seva gran inducció i la facilitat d'incorporar aquests elements al medi de cultiu (Piña et al., 2009).

Els bioassaigs RYA han esdevingut una eina molt útil per l'estudi dels factors de transcripció activats per lligand i, actualment, s'han descrit varies soques que contenen diferents receptors nuclears així com de la família hèlix-loop-hèlix (AhR) capaços de funcionar de forma depenent de lligand al llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Els usos descrits per aquest bioassaigs no només es centren com a biosensors de xenobiòtics, fàrmacs i suplementes alimentaris, sinó també com a models per identificar els lligands (agonistes i antagonistes) naturals d'aquests receptors així com les seves regions funcionals i els cofactors que intervenen en l'activació i/o inhibició de les vies metabòliques relacionades. Aquests estudis han permès ampliar en gran mesura la informació relacionada amb aquests receptors, les seves vies metabòliques i els efectes de la seva disrupció (Miller 3rd et al. 2007; Garabedian, 1993)

1.3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae* com a model

Saccharomyces cerevisiae és un llevat, organisme eucariota unicel·lular, del grup dels ascomicets que agrupa una gran quantitat d'organismes diferents. Ha sigut molt utilitzat històricament en processos de biotecnologia clàssica (producció de cervesa, vi o pa) però, actualment, també té un paper molt important com a model en la investigació de la biologia cel·lular. Aquest és un dels motius que el va portar a convertir-se en el primer organisme eucariota amb el genoma totalment seqüenciat.

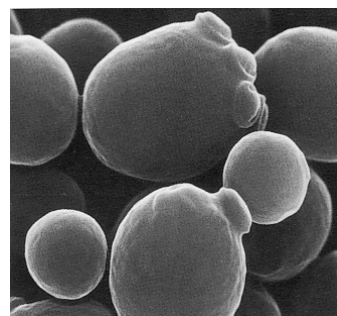


Figura I.13. *S. cerevisiae*

Les propietats que han destacat *S. cerevisiae* com a model dels organismes eucariotes són la seva mida petita (5-10 µmetres de diàmetre), amb un temps de generació molt curt (1'30-2 hores) i unes condicions de cultiu que s'assemblen molt als organismes procariotes. Trets que permeten una producció ràpida i un manteniment de línies múltiples a baix cost. A més, les característiques del seu cicle de vida aporten dos formes estables (haploïde i diploïde) capaces de reproduir-se per gemmació que faciliten la producció de *knockouts* i el manteniment de soques genèticament definides.

Per altra banda, cal tenir en compte que el genoma del *S. cerevisiae* té relativament pocs gens (6.000) comparats amb els sers humans (23.000) però amb una similitud entre els gens del 30%. A més, els sistemes de regulació moleculars com, la transcripció, es troba molt conservat a tots els eucariotes. No obstant, a diferència de les cèl·lules animals o de plantes, la major part del seu genoma està format per seqüències codificants, el que simplifica en gran mesura la dificultat de l'estudi i comprensió del seu funcionament.

Finalment, no s'ha d'oblidar la gran quantitat de tècniques, plàsmids i soques de laboratori amb fons genètics definits que s'han desenvolupat al llarg dels anys i que permeten utilitzar l'*S. cerevisiae* per fer estudis a qualsevol nivell incloent l'expressió de bona part dels Receptors Intracel·lulars que han donat lloc als Bioassaigs de llevat Recombinants (RYA).

I.3.2.2. Bioassaig basat en llevat per a la detecció de compostos tipus dioxina

El bioassaig utilitzat en aquest treball és el biosensor de l'AhR per la seva implicació en el mecanisme de detoxificació de xenobiòtics així com en els seus efectes derivats (bioactivació i generació de espècies oxidants). Aquest bioassaig conté l'AhR d'origen humà i utilitza el LacZ com a gen reporter. A més, aquest sistema també expressa l'ARNT, el que permet unir un rang més ampli de compostos i donar així una resposta més eficient i acurada (soca cedida pel Dr. Charles A. Miller) (Miller3rd et al., 1999 i Boronat et al., 2007). Tan l'AhR com el ARNT es troben integrats al genoma sota el control dels promotors GAL1-10 que s'activen en presència de galactosa. En canvi, el gen reporter sota el control de varies seqüències de l'element de resposta, XRE, es troben clonats en un plàsmid 2µ.

Aquest sistema destaca per ser ràpid, de fàcil manipulació i anàlisi de les dades simple així com molt econòmic i amb una relació de cost-efectivitat molt elevada. Aquests avantatges permeten la seva utilització als screenings inicials amb gran nombre de mostres per acotar els xenobiòtics que es troben presents mitjançant les seves vies d'acció.

Com no es coneix el lligand natural de l'Ahr, les substàncies estàndards utilitzades per aquest assaig són principalment la β -naftoflavona (β -NF) i el Benzo[a]piré. El BaPyr és un dels PAHs més estudiats pels seus efectes carcinogènics demostrats i la β -NF (o 5,6-Benzoflavona) és una substància sintètica de la família dels flavonoïds que s'originen majoritàriament com a metabòlits secundaris de les plantes. Tots dos compostos tenen una elevada afinitat pel receptor AhR tot i que no presenten els nivells de persistència i toxicitat del TCDD. Aquestes característiques faciliten la seva manipulació i eliminació durant els assaigs.

I.3.2.3. Sistema de detecció i quantificació

Els RYAs utilitzats en aquest treball fan servir un sistema de detecció fluorímetric mitjançant el gen reporter LacZ. Aquest gen prové de l'*Escherichia coli* i codifica per l'enzim β -galactosidasa que es caracteritza per ser capaç d'hidrolitzar diferents substrats. En aquest cas, s'utilitza el MUGal (4-metilumbeliferil-galactopiranosid ; Figura I.14) que una vegada ha sigut metabolitzat per la β -galactosidasa dóna el producte fluorescent 4-MU (4-metilumbeliferona) amb una longitud d'ona excitació de 355 nm i d'emissió de 460 nm.

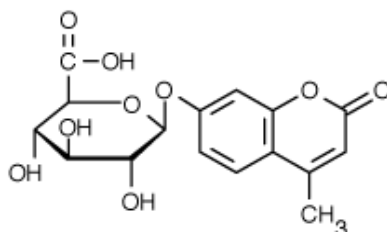


Figura I.14. Estructura química del MUGal

La quantitat de producte fluorescent generat respecte del temps s'ajusta a una correlació lineal, a concentracions saturants de MUGal. El pendent d'aquesta recta correspon al valor d'activitat enzimàtica de la β -galactosidasa que, a la seva vegada, es proporcional a la quantitat d'enzim produït al llarg de l'exposició del biosensor amb el xenobiòtic. Com que els nivells d'expressió de la proteïna estan relacionats amb el grau d'activació del receptor i aquest amb la concentració de xenobiotic al medi, es pot representar l'activitat enzimàtica observada a diferents concentració del xenobiotic, obtenint una corba dosi-resposta tipus sigmoïdal (Figura I.15). A partir d'aquesta corba s'estableixen els valors d' EC_{50} així com els límits de detecció (EC_{10} i LOEC) (apartat 1.3.1.).

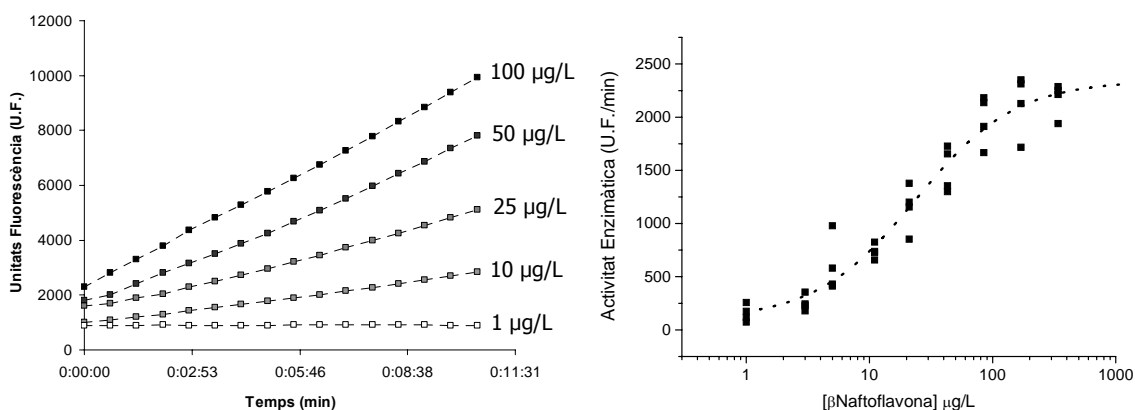


Figura I.15. Esquerra: representació de l'augment de la fluorescència (Unitats de fluorescència) respecte el temps de reacció (minuts) per cada concentració de lligand. Dreta: Representació del pendent calculat a partir de la gràfica anterior respecte la concentració de lligand (en logaritme). D'aquesta manera s'obté una corba resposta típica que permet calcular els diferents paràmetres de EC_{10} i EC_{50} .

En el cas de les mostres ambientals on es troba una barreja de compostos, per tal de poder calcular els valors de REP, les corbes dosi-resposta es representen respecte el factor de dil·lució (F_d) de la mostra. D'aquesta manera permet calcular el valor d' EC_{50} en factor de dilució i establir la seva activitat en equivalents del compost estàndard segons l'apartat 1.3.1 d'aquest treball.

I.3.3. Bioassaig basat en embrions de *Danio rerio*

La utilització d'embrions de peix zebra com a model per a estudis de toxicitat s'està desenvolupant molt ràpidament i, cada cop més, substitueixen els assaigs en individus adults. Per tal d'avaluar la toxicitat, existeixen diferents assaigs segons els mètodes d'avaluació dels danys causats i els criteris de punt final. El període d'incubació de l'assaig varia entre el moment de la fecundació (zero hores post fecundació, 0 hpf) i el moment que l'embrió esdevé una larva capaç d'alimentar-se de forma exògena (sobre les 120 hpf).

Els efectes causats es poden detectar a diferents nivells (molecular, teixit, etc.) però un dels mètodes més utilitzats fins al moment és la avaluació morfològica del desenvolupament dels embrions. Els criteris per fer l'avaluació poden estar enfocats a determinar toxicitat aguda, on només es tenen en compte els efectes letals com a criteris de punt final (ISO, 2007) o poden tenir en compte un rang més ampli d'efectes subletals i de malformacions, com el Test DarT ((*Zebrafish Danio rerio Teratogenic Assay*) o ZFET (*Zebrafish Embryo Test*). Ambdós assaigs, proposen una sèrie de criteris de punt final semblants per a la avaluació de la toxicitat i teratogènesis dels embrions on es tenen en compte la formació dels ulls, la cua, les aletes dorsals i la pigmentació (Lammer et al., 2009; Brannen et al., 2010 i Hamersen et al., 2011). Altres tècniques que milloren l'avaluació dels efectes morfològics són les tincions amb *alcian blue* (tinció de les cèl·lules calciformes) o les tècniques d'immunofluorescència i d'hibridació (*in-*

situ) que utilitzen anticossos específics per determinades proteïnes o sondes d'oligonucleòtids per RNAs. D'aquesta manera, permeten una observació més acurada dels efectes així com de la seva localització específica a l'embrió.

Per altra banda, s'han aplicat tècniques de biologia molecular com els microarrays o la PCR quantitativa al peix zebra amb l'objectiu d'observar canvis en l'expressió gènica (Handley, 2003 i Liedtke et al., 2007). També s'han adaptat mètodes com l'EROD, per tal d'observar l'activitat proteica dels enzims de detoxificació de la família dels Citocrom P450. I, finalment, mitjançant l'ús de tècniques per generar peixos zebra transgènics, s'han desenvolupat línies capaces d'expressar gens reporter com la GFP sota el control de promotors induïbles per estrès oxidatiu (kusik et al., 2008) així com per l'Ahr (Mattingly et al., 2001).

1.3.3.1. Embions de *Danio rerio* com a model

El peix zebra, o *Danio rerio*, és un peix petit, d'aigua dolça que pertany a la família dels *ciprínids* (*Cyprinidae*) i prové dels sud-est asiàtic. Té una forma allargada i fusiforme, amb una sola aleta dorsal. El seu color de fons és gris platejat i es caracteritza per les 5-9 línies de color blau fosc, des de l'opercle fins al final de la cua, que li donen l'aspecte zebra. La part ventral és d'un tó blanc rosat i les aletes poden acabar en un tó groguenc, sobretot en els mascles.



Figura I.16. Dos exemplars de *Danio rerio* adults, una femella (a dalt) i un mascle (a baix).

Des de principis del segle XX, el peix zebra s'ha utilitzat com a model aquàtic de vertebrat però, no ha estat fins als últims anys que ha cobrat un paper molt més important gràcies al Dr. George Streisinger (Stegeman et al., 2010). Les característiques que l'han fet destacar com a bon animal model són la seva mida petita (minimitza l'espai d'estabulació), un cost de manteniment menor que altres animals model i un temps de generació curt (3-4 mesos) que permet fer estudis generacionals així com obtenir organismes modificats genèticament en un

breu espai de temps. Així mateix, el seu genoma està seqüenciat totalment i té una elevada similitud amb els dels sers humans (aproximadament 87%).

Altres trets destacables del peix zebra són la elevada fertilitat de les femelles, amb una posta de 100 embrions cada 2-3 dies, i la estabilitat del seu cicle de vida que permet obtenir embrions durant tot l'any. A més de l'elevada disponibilitat d'ous fecundats, els embrions també presenten avantatges notables per la seva utilització, com el fet que es desenvolupen a l'exterior des del moment de la fertilització i que són transparents. Aquestes característiques permeten observar tot el procés de desenvolupament des del principi, així com introduir modificacions genètiques sense haver de manipular els animals adults. A més, el seu desenvolupament és relativament ràpid de



Figura I.17. Establució dels peixos zebra en aquaris.

manera que a les 24 hores ja tenen una estructura completa amb ulls, cap i cua, als 2-3 dies eclosionen del còrion (envoltura de l'ou) i a partir dels 5-6 dies deixen de ser eleuteroembrions i comencen a alimentar-se de forma externa. Fins a aquest moment, són considerats com un mètode alternatiu a l'assaig amb animals per l'EFSA (EFSA, 2005).

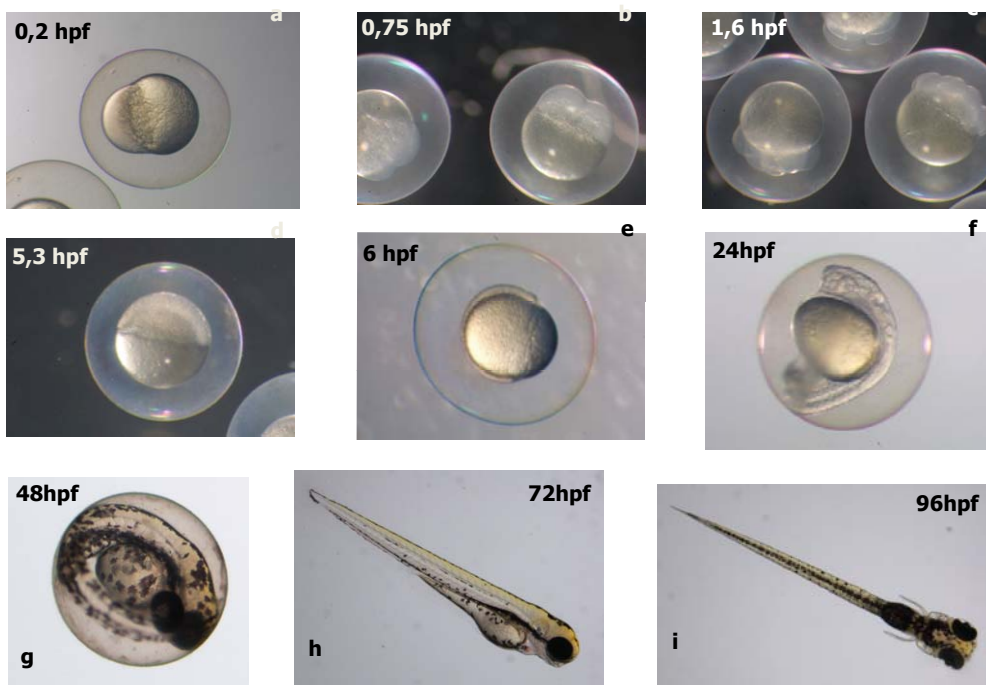


Figura I.18. Desenvolupament del peix zebra des d'una cèl·lula (aprox. 0,2 hpf) fins les 96 hpf. Imatges 1-6 amb © 2002 Steve Baskauf.

El peix zebra ha esdevingut un organisme molt útil pels estudis de desenvolupament, de càncer i de comportament. En el cas dels estudis de toxicitat, els embrions de peix zebra permeten avaluar la toxicitat de xenobiòtics (compostos, mostres i fàrmacs) en un organisme vertebrat sencer, sense danyar organismes adults i amb una fàcil incorporació dels contaminants al medi (i control de la seva concentració). Així mateix, al ser un organisme en fase de desenvolupament pot aportar informació sobre els seus possibles efectes teratogènics.

I.3.3.2. Adaptació del bioassaig en Embrions de *Danio rerio* per a la detecció d'activitat associada a dioxines

La seqüenciació del genoma del peix zebra i els desenvolupament de tècniques com la PCR quantitativa han obert la porta al desenvolupament d'un gran nombre de bioassais que permeten avaluar les respostes específiques d'un animal vertebrat sencer en front de xenobiòtics (substàncies i mostres ambientals), fàrmacs o substàncies de nova generació (cosmètics, complements alimentaris, etc.). Així com, comparar aquestes respostes amb els seus efectes patològics (letals, subletals i teratogènics).

La posta a punt del bioassaig en embrions de peix zebra desenvolupat en aquest treball, s'ha dut a terme a partir d'estudis realitzats amb altres espècies aquàtiques on s'havien aplicat tècniques de PCR quantitativa per avaluació de contaminants tipus HAHs (Eljarrat et al., 2007 i Liedtke et al. 2007). Per tal de definir l'assaig, es van tenir en compte els gens relacionats amb el sistema de detoxificació de xenobiòtics a través de l'AhR. El peix zebra, com la majoria dels actinopterigis i a diferència dels tetràpods, conté 3 gens homòlegs del AhR: *ahr1a*, *ahr1b* i *ahr2* dels quals només *ahr2* i *ahr1b* participen en l'activació transcripcional dels gens relacionats amb el metabolisme de xenobiòtics, essent *ahr2* l'activador principal (Tanguay et al., 1999; Andreasen et al., 2002a,b i Karchner et al. 2005).

Els principals enzims que responen a l'activació per l'AhR pertanyen a la superfamília dels citocroms P450 i, en concret, a la subfamília CYP1A que, a diferència dels humans, està formada només per un gen, el *cyp1a*. L'activació del *cyp1a* s'ha vist que es depenent del receptor l'AhR mitjançant estudis amb línies de peixos zebra knock-down (Prasch et al., 2003). Així mateix, també s'ha observat activació d'altres gens de la família del CYP1 (*cyp1b1*, *cyp1c1* i *cyp1c2*) però en menor mesura. La variació en els nivells d'activació pot estar relacionada amb el nombre de llocs d'unió per l'AhR (XRE) (Figura I.19; Jönsson et al., 2007).

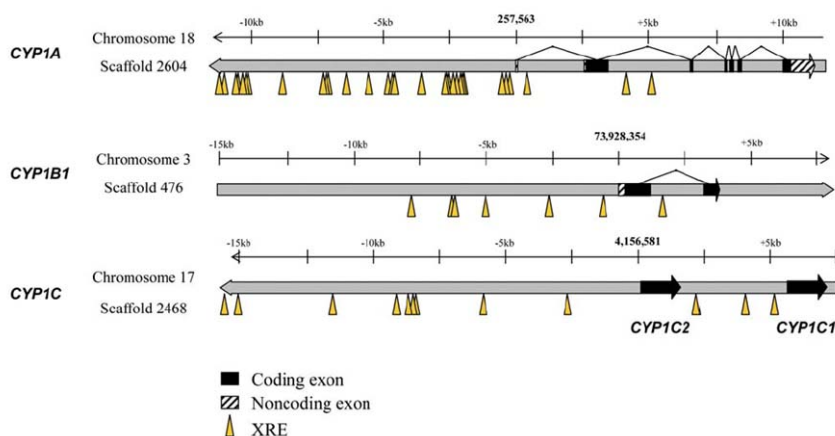


Figura I.19. Annotació de les seqüències dels diferents gens de la família *cyp1* amb les XRE a més de les zones codificants i no codificants (Jönson et al., 2007).

Els estudis sobre l'activitat basal de l'enzim *cyp1a* durant l'etapa embrionària del peix zebra (Otte et al., 2010) mostren que durant les primeres hores (8 hpf) hi ha un màxim d'activitat seguit per una forta baixada entre les 8-56 hpf, moment en el qual l'activitat augmenta poc a poc fins les 104 hpf. En canvi, si ens fixem en l'expressió del gen, es pot veure com l'expressió basal del gen CYP1A són molt baixes o nul·les fins les 72 hpf on es comença a observar un augment que continua de forma progressiva fins les 120 hpf (Liedtke et al. 2007). Per tant, l'activitat observada a l'inici hauria de provenir d'origen matern i, s'ha de tenir en compte que podria interferir en el bioassaig si interacciona amb els cofactors o el sistema de regulació. Per altra banda, a partir de les 72 hpf amb l'augment de l'expressió del *cyp1a*, la diferència entre l'expressió basal i la inducció del gen serà menor.

I.3.3.3. Sistema de detecció i quantificació

La PCR quantitativa (qPCR) permet quantificar l'expressió dels gens d'interès i, per tant, avaluar els nivells d'inducció o repressió d'aquests, de manera que resulta una eina molt útil per a l'avaluació de l'efecte de contaminants ambientals. Aquesta tecnologia requereix coneixements sobre les vies d'acció dels xenobòtics així com de les seqüències dels gens que es volen estudiar per tal de dissenyar encebadors (o primers) que amplifiquin de forma específica els gens diana de l'assaig.

El sistema de funcionament de la qPCR es basa en la monitorització continua de l'amplificació per PCR d'una seqüència específica de DNA mitjançant per mitjà de marcadors fluorescents (Figura I.20) i en el fet que el nombre de molècules de DNA amplificades a un cicle determinat (i per tant, l'augment de fluorescència en aquest mateix cicle), depèn directament de la

quantitat de DNA motlle inicial. D'aquesta manera, es pot relacionar de forma inversa el nombre de cicles de PCR necessaris per detectar l'amplificació específica del gen diana amb la quantitat de DNA motlle inicial d'una mostra.

Per tal de fer estudis de l'expressió gènica, s'extreu el RNA total de les mostres i es retrotranscriu a cDNA per, finalment, poder dur a terme la qPCR. Si la reacció es fa usant oligo dT com cebador, només es còpia el mRNA, que és el que es codifica per proteïnes. El DNA motlle inicial dels gens d'interès es troba entre la barreja de seqüències al cDNA que, a la seva vegada, és equivalent al mRNA extret de la mostra.

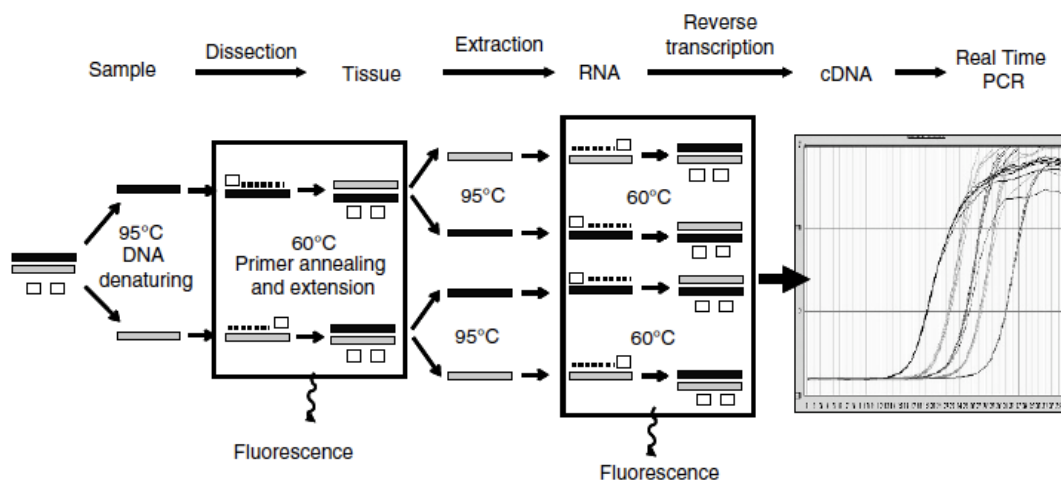


Figura I.20. Procés de tractament d'una mostra des de la recollida fins a la quantificació per PCR quantitativa (Piña et al., 2009).

El nombre de cicles necessari per detectar l'amplificació d'una seqüència concreta, dins de la zona de comportament exponencial de la reacció, es denomina Cicle de quantificació (Cq). El càlcul del Cq el realitza la plataforma de qPCR i, actualment, al mercat existeixen dos aproximacions que són igualment vàlides. Per una banda, es pot determinar el Cq com els cicles necessaris per assolir un valor de fluorescència constant i igual a un nivell basal preestablert l'aparell (Cicle llindar o *threshold*; Ct). L'altre mètode es basa en calcular la segona derivada de la corba d'amplificació de manera que el Cq s'identifica amb el punt de màxima acceleració de la fluorescència (anomenat Cp) (Piña et al., 2009). Ambdós mètodes tenen com objectiu determinar el nombre de cicles necessaris per distingir entre el nivell de fluorescència basal i el nivell de fluorescència que es genera a partir de l'amplificació d'un fragment de PCR a la zona exponencial de la reacció.

La qPCR ens permet determinar la quantitat inicial d'mRNA del nostre gen d'interès per cada mostra. La quantificació pot ser forma relativa o absoluta si es realitza una corba de calibratge

amb mostres que continguin quantitats de DNA motlle conegudes per cada assaig (parell de primers).

Per quantificar de forma relativa es necessari emprar un normalitzador que ens permeti comparar la quantitat d'un gen en diferents mostres sense dubtar si hi ha influències de la quantitat inicial de RNA missatger, de l'eficiència de la reacció de retrotranscripció i/o, de la presència d'inhibidors (entre d'altres). El mètode de normalització que es sol utilitzar es la quantificació relativa de gens amb expressió constant, que serveixen com a controls interns de cada mostra. La variació d'aquests gens de referència (REF) només depèn de la quantitat total d'mRNA present a cada mostra. Tradicionalment s'han utilitzat gens estructurals com la β -actina, gens involucrats en la glucòlisis o alguns dels gens ribosomals. Tot i així, s'aconsella identificar els gens de referència adequats per cada espècie, estadi de desenvolupament o teixit mitjançant l'avaluació de la seva estabilitat. En el nostre cas, al tractar amb organismes en desenvolupament, s'ha vist que molts gens de referència clàssics podrien no ser adequats. D'aquesta manera, es van avaluar altres candidats i es van escollir finalment el *ppia2* i l'*ef1 α* que codifiquen per la ciclofilin A i el Factor d'Elongació α , respectivament (Morais et al. 2007).

El sistema de quantificació de la qPCR es basa en la fórmula que descriu la generació de noves molècules de DNA per la reacció de PCR descrita a continuació:

$$N = N_0 (1 + E)^C$$

on N és el número de molècules de cDNA del nostre gen present a la mostra, N_0 és el número inicial de molècules de DNA motlle, E és l'eficiència de la reacció i C correspon al número de cicles de la reacció. D'aquesta manera, el nombre de molècules (N) augmenta de forma exponencial depenent del número de cicles de la PCR que, a la pràctica, és reflecteix amb un augment exponencial de la fluorescència a la qPCR.

Per tal de quantificar el nombre inicial de DNA motlle (N_0) i, poder establir comparacions amb altres mostres, es normalitza l'expressió del gen diana respecte al gen de referència de manera que:

$$R = \frac{N_{0 \text{ Diana}}}{N_{0 \text{ Ref}}} = \frac{N_{\text{Diana}} / (1 + E_{\text{Diana}})^{C_t \text{ Diana}}}{N_{\text{Ref}} / (1 + E_{\text{ref}})^{C_t \text{ Ref}}}$$

on (R) representa el nombre de còpies normalitzades pel gen de referència. Si es reorganitza la fórmula s'obté que:

$$R = \frac{N_{0 \text{ Diana}}}{N_{0 \text{ Ref}}} = \frac{(1 + E_{\text{ref}})^{C_t \text{ Ref}}}{(1 + E_{\text{Diana}})^{C_t \text{ Diana}}} \times \frac{N_{\text{Diana}}}{N_{\text{Ref}}}$$

I, si es considera que l'eficiència de la reacció és òptima (del 100%), E és igual a 1 i s'obté que:

$$R = k \times 2^{(C_t^{\text{Ref}} - C_t^{\text{Diana}})}$$

On K es el coeficient entre el número de còpies N de gen diana i referència.

Per tal de calcular la variació d'expressió del gen diana respecte diferents mostres, es compara l'expressió relativa del nostre gen diana entre les mostres control i les mostres tractades.

$$\text{Variació de l'Expressió} = \frac{R_{\text{Tractat}}}{R_{\text{Control}}} = 2^{(\Delta C_t^{\text{Tractat}} - \Delta C_t^{\text{Control}})}$$

A l'hora de tractar els valors per mètodes estadístics, es necessari tenir en compte que aquests no tenen una distribució normal perquè provenen d'un quocient entre dues magnituds. Per solucionar aquest problema, els valors es solen normalitzar transformant-los en valors logarítmics de manera que es puguin utilitzar models com l'anàlisi de la varianza (ANOVA) o la prova T d'Student. En el cas dels compostos individuals, es poden representar els valors d'expressió gènica respecte la concentració de xenobiòtic per tal d'obtenir del corbes dosi-reposta i calcular els diferents paràmetres de LOEC i EC50 per aquests bioassaigs.

1.3.4. Bioassaig basat en cèl·lules de vertebrat

Existeixen diferents tipus d'assaig que utilitzen cultius cèl·lulars de vertebrats per tal de monitoritzar la contaminació ambiental. Dintre d'aquests, es troben el DR-LUC que utilitza la línia cel·lular d'hepatoma de rata (H4IIE) transfectada amb un plàsmid (pGudluc1.1) que conté el gen reporter luciferasa sota el control d'un promotor induïble amb els llocs d'unió específics per l'AhR activat. Aquestes cèl·lules expressen el seu propi AhR de manera que, si s'incuben aquests hepatòcits amb lligands capaços d'activar l'AhR, s'induirà l'expressió de la Luciferasa (Sanderson et al., 1996; Hamers et al., 2000 i Casado et al., 2006).

Per tal de quantificar l'enzim produït, s'utilitza el substrat específic de la luciferasa, la D-luciferina. Una vegada que aquest és processat per la luciferasa, produeix llum de manera que es pot quantificar a través d'un luminòmetre. Aquest assaig és de punt final, de manera que només es té en compte el valor màxim de llum per cada mostra. Aquest valor correspon al moment que tots els enzims presents a la mostra estan ocupats per una molècula de D-luciferina. A partir dels valors obtinguts en Unitats Relatives de Llum (RLU, Relative Light Units)

és pot representar la corba dosi-resposta depenent de la concentració o del factor de dilució per tal de calcular els valors de LOEC, EC₅₀ i REP.

Aquest bioassaig és depenent del tipus de compost, de la seva concentració i del temps d'incubació. També és un assaig molt sensible i reproduïble, capaç d'identificar no només els lligands de l'AhR sinó també aquells que són capaços d'activar-lo, com el bioassaig de llevat. Les principals diferències entre ambdós tipus d'assaig són que els hepatòcits no tenen paret cel·lular de manera que facilita l'entrada dels compostos a la cèl·lula i que les cèl·lules de vertebrat expressen tots els cofactors implicats en la via del AhR així com les vies metabòliques que interactuen amb el receptor tan directe com indirectament. D'altra banda, el manteniment de cultius cel·lulars és més laboriós i l'especificitat de la via d'acció es menor degut a què els xenobiòtics poden actuar per rutes alternatives a l'hora d'activar el gen reporter o que aquesta activació es vegi inhibit per la presència de molècules repressores del sistema.

OBJECTIUS

II. OBJECTIUS

Objectiu General:

L'objectiu d'aquesta tesis és l'optimització de bioassaigs basats en llevat i embrions de peix zebra per caracteritzar els lligands de l'AhR així com la seva aplicació per a l'estudi ambiental de zones que possiblement afectades per aquest tipus de compostos.

Objectius específics:

1. Estandarització i aplicació del bioassaig basat en el llevat recombinant amb el AhR i l'ARNt integrats al genoma per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig.

- 1.1 Anàlisi de l'activitat tipus dioxina al tram baix del riu Ebre (medi fluvial)
- 1.2 Impacte ambiental a l'estuari de Urdaibai (Biskaia, medi marí)
- 1.3 Anàlisi de la toxicitat del material particulat aeri (atmosfera)

2. Disseny, validació i aplicació d'un nou bioassaig basat en la quantificació de l'expressió gènica dut a terme en l'estadi embrionari del peix zebra.

II. FACTOR d'IMPACTE

III. FACTOR D'IMPACTE dels ARTICLES PUBLICATS

Benjamí Piña Capó, director de la Tesis Doctoral presentada per Alba Olivares Polo, exposa que la doctoranda ha participat activament en la realització de tots els articles presentats a la memòria. En general, ha participat a la discussió i al disseny experimental així com ha contribuït de manera significativa a l'anàlisi de les mostres i en l'elaboració i correcció dels treballs.

A continuació es detallen els articles que formen part d'aquesta tesis, el grau de participació de la doctoranda i el Factor d'Impacte (F.I.) de les revistes a les quals s'han publicat.

1. Bosch C, **Olivares A.**, Faria M., Navas J.M., del Olmo I., Grimalt J.O., Piña B., Barata C. (2009) *Identification of water-soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry.* Aquat Toxicol. 94(1):16-27 *

F.I.: 3.124

Grau de participació: Disseny experimental i realització de l'extracció i anàlisi de les mostres mitjançant RYA.

*Aquest article apareix a la tesis doctoral de la Dra. Carme Bosch Suades amb el Títol *Contaminació per compostos orgànics persistents en el sistema fluvial del riu Ebre* (2009).

2. **Olivares, A.**, Quirós, L., Pelayo, S., Navarro, A., Bosch, C., Grimalt, J.O., Fabregat, M.C., Faria, M., Benejam, L., Benito, J., Solé, M., Barata, C., Piña, B. (2010) *Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point.* Sci. Tot. Env., 408(22):5592-9.

F.I.: 2.905

Grau de participació: Disseny experimental, realització de l'extracció i anàlisi de les mostres mitjançant RYA i participació en la correcció del manuscrit.

3. Puy-Azurmendi E., Navarro A., **Olivares A.**, Fernandes D., Martínez E., López de Alda M., Porte C., Cajaraville M.P., Barceló D., Piña B. (2010) *Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in sediment and fish from the biosphere reserve of Urdaibai (Bay of Biscay, Basque country, Spain).* Mar Environ Res. 70(2):142-9.

F.I.: 1.755

Grau de participació: Realització de l'anàlisi de les mostres per RYA i correcció del manuscrit.

4. **Olivares A.**, van Drooge B.L., Pérez Ballesta P., Grimalt J.O. and Piña B. (2011) *Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assays.* Atmospheric Environment 45, 271-274.

F.I.: 3.139

Grau de participació: Realització del treball experimental i participació en l'elaboració del manuscrit.

5. **Olivares A.**, van Drooge B.L., van der Ven L.T., Hamers T., Grimalt J.O. and Piña B. *Aerosol and coal burning particle toxicity to the developing zebrafish: Comparative study between whole embryo- and cell-based bioassays.* (en preparació)

Grau de participació: Realització del treball experimental i participació en l'elaboració del manuscrit.

Barcelona, 20 Juliol de 2011

Dr. Benjamí Piña Capó
Director de la tesis doctoral

IV. RESULTATS

IV. RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesis es presenten com a un compendi de publicacions dividits en 3 capítols. El tercer capítol, a més inclou el disseny experimental del bioassaig utilitzat amb els embrions de peixos zebra.

IV.1 CAPÍTOL 1: Aplicació dels Assaigs basats en llevats recombinants per a la determinació de la contaminació ambiental presents en sediments.

Article 1: Olivares, A., Quirós, L., Pelayo, S., Navarro, A., Bosch, C., Grimalt, J.O., Fabregat, M.C., Faria, M., Benejam, L., Benito, J., Solé, M., Barata, C., Piña, B. (2010) **Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point.** Sci. Tot. Env., 408(22):5592-9.

Article 2: Bosch C, Olivares A., Faria M., Navas J.M., del Olmo I., Grimalt J.O., Piña B., Barata C. (2009) **Identification of water-soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry.** Aquat Toxicol. 94(1):16-27

Article 3: Puy-Azurmendi E., Navarro A., Olivares A., Fernandes D., Martínez E., López de Alda M., Porte C., Cajaraville M.P., Barceló D., Piña B. (2010) **Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in sediment and fish from the biosphere reserve of Urdaibai (Bay of Biscay, Basque country, Spain).** Mar Environ Res. 70(2):142-9.

IV.2 CAPÍTOL 2: Aplicació de l'Assaig de llevats recombinant per a la determinació de contaminació amb activitat tipus dioxina associada al particulat de l'aire.

Article 4: Olivares A., van Drooge B.L., Pérez Ballesta P., Grimalt J.O. and Piña B. (2011) **Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assays.** Atmospheric Environment 45, 271-274.

IV.3 CAPÍTOL 3: Disseny, validació i aplicació del bioassaig en embrions de Peix zebra.

IV.3.1 Disseny del bioassaig basat en embrions de Peix zebra.

IV.3.2 Validació del bioassaig basat en embrions de peix zebra.

IV.3.3 Aplicació del bioassaig en peix zebra en mostres de contaminació atmosfèrica i mines de carbó.

Article 5. Olivares A., van Drooge B.L., van der Ven L.T., Hamers T., Grimalt J.O. and Piña B. **Aerosol and coal burning particle toxicity to the developing zebrafish: Comparative study between whole embryo- and cell-based bioassays.** (en preparació)

**IV.1 CAPÍTOL 1: Aplicació dels Assaigs basats
en llevats recombinants per a la determinació
de la contaminació ambiental presents en
sediments.**

Article 1: Anàlisi biològic i químic integrat de la contaminació per compostos organoclorats i els seus efectes biològics en un sistema fluvial aigües avall del punt de descarrega

Alba Olivares, Laia Quirós, Sergi Pelayo, Anna Navarro, Carme Bosch, Joan O. Grimalt, Maria del Carme Fabregat, Melisa Faria, Lluís Benejam, Josep Benito, Montserrat Solé, Carlos Barata, Benjamin Piña.

La contaminació dels sistemes fluvials, juntament amb els seus efectes biològics, pot propagar-se aigües avall, fins i tot, a distàncies considerables. En aquest treball es va analitzar la contaminació per compostos organoclorats (OC) a la part baixa del riu Ebre (nord-est d'Espanya), a partir d'on es troba situada una fabrica de procés clor-alcalí fins a la desembocadura. Els nivells màxims d'OC i de l'activitat biològica associada als compostos tipus dioxina, es troben a les mostres recollides directament dels residus de la fàbrica, i persisteix als sediments del riu a uns 40 km aigües avall (Xerta). L'anàlisi biològic de la carpa local (*Cyprinus carpio*) mitjançant bioassaigs a diferents nivells - EROD (activitat proteïca), expressió de l'mRNA de CYP1A al fetge, Índex Hepatosomàtic, Factor de Condició, i l'índex de micronuclis en sang perifèrica - van mostrar un patró similar, amb un impacte màxim a Ascó, a pocs quilòmetres aigües avall de la planta, i una clara reducció en Xerta. Aquesta combinació de dades químiques, moleculars, cel·lulars i fisiològiques permet una avaluació precisa dels efectes negatius de la planta de clor-àlcali tan en la qualitat dels sediments del riu com en els peixos i suggereix que els sediments poden ser un reservori per a les substàncies tòxiques, fins i tot en entorns dinàmics com els rius.

Paraules clau: Mecanisme Multimarcador; Biomonitorització; Micronuclis; Receptor d'hidrocarbur d'Aril; Assaig de Llevat Recombinant; PCR a temps real Quantitativa.

Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point

Alba Olivares ^a, Laia Quirós ^a, Sergi Pelayo ^a, Anna Navarro ^a, Carme Bosch ^a, Joan O. Grimalt ^a, Maria del Carme Fabregat ^a, Melisa Faria ^a, Lluís Benejam ^b, Josep Benito ^b, Montserrat Solé ^c, Carlos Barata ^a, Benjamin Piña ^a

^a Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain

^b Institut d'Ecologia Aquàtica, Dept. Ciències Ambientals, Ecologia, Universitat de Girona, 17071 Girona, Spain

^c Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta 37-49 08003 Barcelona, Spain

Pollution in riverine systems, along with its biological effects, may propagate downstream even at considerable distances. We analyzed the organochlorine compound (OC) pollution in a section of the low Ebro River (Northeast Spain) downstream a long-operating chlor-alkali plant. Maximal levels of OCs and of their associated dioxin-like biological activity occurred in residue samples from the plant, and persisted in river sediments some 40 km downstream (Xerta site). Biological analysis at multiple organization levels in local carp (*Cyprinus carpio*, EROD, Cyp1A mRNA expression in the liver, hepatosomatic index, condition factor, and micronuclei index in peripheral blood) showed a similar pattern, with a maximal impact in Ascó, few kilometers downstream the plant, and a clear reduction at Xerta. This combination of chemical, molecular, cellular and physiological data allowed the precise assessment of the negative impact of the chlor-alkali plant on the quality of river sediments and on fish, and suggests that sediments may be a reservoir for toxic substances even in dynamic environments like rivers.

Article history: Received 22 February 2010; revised 3 August 2010; accepted 5 August 2010. Available online 30 August 2010.

Keywords: Multimarker approach; Biomonitoring; Micronuclei; Aryl hydrocarbon receptor; Recombinant yeast assay; Quantitative real-time PCR

1. Introduction

The EU Directive 2000/60/EC (the "water framework directive" or WFD) declares as a major objective the prevention of any further deterioration of the chemical and biological statuses of aquatic ecosystems and associated wetlands. To meet this objective, WFD demands multi-level (or multi-tier) approaches, combining chemical analytical and biological methods (Fuerhacker, 2009). In this paper, we study the burden by organochlorine compounds (OC) and their biological impact in the lower course of the Ebro River (Northeast Spain), using a combination of chemical, molecular, cellular and physiological methods.

The Ebro River catchment is the largest river basin in Spain, with an area of 85,362 km² and a stable population of more than 3 million people (<http://www.chebro.es>). Its lower course is chronically polluted by a chlor-alkali plant operating in Flix, 120 km from the river's mouth, since the beginning of the 20th century. During this extended operational period, large amounts of heavy polluted industrial sludge accumulated in the adjacent dam. These sediments contain Tm quantities of organochlorine compounds and mercury, among other minor pollutants (Bosch et al., 2009, Fernández et al., 1999, Llorente et al., 1987 and Pastor et al., 2004). The accumulation and biological effects of these substances in local populations of molluscs, fish and birds have been evaluated only recently (Carrasco et al., 2008, Eljarrat et al., 2008, Navarro et al., 2009 and Quirós et al., 2008). Whereas mercury pollution represents a major concern, as its contents in fish surpass the legal limits for consumption (Navarro et al., 2009), the presence of very high levels of different OCs (PCBs, HCH, DDE, HCB and PeCB) in the residues also deserves a close surveillance, due to its putative detrimental effects on human and animal health. These organochlorine compounds were generated during different periods of the plant operational life and remain in the plant residues at very high mounts, despite that many of them are currently banned or not produced any longer. In a previous report, fish from the Flix dam showed physical responses associated to chemical pollution, specifically to coplanar PCB congeners (Eljarrat et al., 2008). The present work aims to study the spread of the burden associated to this chemical pollution downstream the river by chemical, molecular and physiological criteria.

Coplanar PCB congeners are representatives of the so-called "dioxin-like" pollutants, which include dioxins, furans and different polycyclic aromatic hydrocarbons. The presence of these compounds is associated to many deleterious effects in vertebrates, as immune dysfunction, endocrine disruption, reproductive toxicity, developmental defects, and cancer (Abbott et al., 1994, Poland and Knutson, 1982 and Safe et al., 1997). Dioxin-like compounds share the key structural property of binding and activate the vertebrate Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), a ligand-activated transcription factor that regulates specific phases I and II metabolic enzymes, among other functions (Hankinson, 1995, Hayes et al., 1996 and Nebert et al., 1993).

Activation of AhR constitutes the initial step of the metabolic chain leading to toxic effects of a variety of harmful pollutants, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-(p)-dioxin (TCDD), coplanar PCBs and benzopyrenes (Abbott et al., 1994, Poland and Knutson, 1982 and Safe et al., 1997). Therefore, assays to detect AhR activation and subsequent signal transduction are becoming an extremely useful approach to monitor pollution loads in environmental samples (Fent, 2003). In this work we used a yeast-based bioassay in which the yeast genetic make-up is modified to reconstruct at least partially the vertebrate AhR signaling pathway (Miller, 1997). In this genetic setup, the production of a reporter gene is diagnostic for the presence of AhR ligands in the medium, and can be quantified as an enzymatic activity with high precision (Noguerol et al., 2006b).

Among genes directly regulated by AhR, and therefore, activated by dioxin-like pollutants, Cytochrome P450 1A (Cyp1A) has been developed as an established biomarker of exposure to agonists of AhR in many vertebrate species, including fish (Arukwe, 2002, McClain et al., 2003 and Rees and Li, 2004). The increase on its expression levels upon the presence of AhR ligands may be evaluated at least at two levels, either by measuring one of its associated enzymatic activities, the ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) (Lavado et al., 2006, Machala et al., 2001 and Solé et al., 2003), or by analyzing changes in transcription of the Cyp1A gene by real-time PCR techniques (Eljarrat et al., 2008, Piña et al., 2007 and Quirós et al., 2007a). In this work, we used both techniques to describe the impact by dioxin-like pollution in wild carp populations.

Biochemical and gene expression biomarkers are useful tools to detect possible and specific environmental impacts, but they do not constitute per se a proof of any detrimental effect on the fitness of the studied animals. Toxic effects at higher organization levels can be analyzed with parameters involving whole tissues or the whole organism. At tissue level, the presence of high proportions of micronuclei in the peripheral blood, the micronuclei index or MNI, is an indicative of cellular or genetic damage in the sensitive hematopoietic process. High MNI values have been related to genotoxicity in different vertebrate species, including fish (al-Sabti and Metcalfe, 1995; Bolognesi et al., 2006; Fernández et al., 1993; Llorente et al., 2002; Muller et al., 1996; Quirós et al., 2008 and Russo et al., 2004). Similarly, changes in the relative size liver, the hepatosomatic index, is considered an indicator of chemical burden, and it has been associated to different forms of chemical pollution, including OC (Miller et al., 1998 and Zhang and Hu, 2008) (Carrola et al., 2009 and Hagenaaars et al., 2008). Finally, the Fulton's body condition factor is a non-lethal morphometric index that compares the weight and the cube of the length of individual fish (Fulton, 1904). This index assumes that, within a given species, heavier fish of a given length are in better condition than leaner ones, providing therefore an indication of the health and nutritional status of fish.

Environmental risk assessment often encounters a typical scale problem. Studies performed at organism or population levels have a high ecological significance, but lack the immediateness and the sensitivity to sublethal exposures offered by assays at molecular or cellular levels. On the other hand, chemical, molecular or biochemical parameters can detect toxic molecules or their biological activities at concentrations far below the ones required to affect the fitness of the exposed animals, but these findings lack the necessary information about their relevance in a physiological, ecological or, for humans, epidemiological context (Adams et al., 1992 and van der Oost et al., 2003). In this work, we intended to cope with this problem by using a multi-level approach (chemical, molecular, cellular and physiological) to describe the effects of pollutants generated by the Flix chlor-alkali plant when carried downstream to the lower course of the Ebro River.

2. Materials and methods

2.1. Site description and sediment and residue sampling

The study area covers 100 km of the low course of the Ebro River, from the large Riba-roja dam to Amposta, considering the upstream limit of the Ebro Delta (Fig. 1). This river section includes a small water reservoir adjacent to the Flix chlor-alkali plant and to which it discharges its effluents (see inset a, the top of Fig. 1). These discharges originated a large mass of residues close to the factory (see grey area on the inset in Fig. 1). Two overflow dams at the locations of Ascó and Xerta represent artificial barriers for fish and likely constitute points of increased sedimentation (see grey bars in Fig. 1). Ten composite surficial sediment samples were collected from the first 40 cm sediment layer during spring and summer 2006 (Fig. 1, Table 1, samples A, B, H, I, J, K, L, and N). Industrial residues from the Flix factory (see the upper inset of Fig. 1) were sampled in a previous survey (Grimalt, 2010; samples C to F, Table 1). Residues were cored all throughout its depth (1.2 to 3.5 m, depending on the position of sampling) and divided in 3-cm sections. These sections were analyzed individually for chemical contents. AhR-RYA results correspond to combined extracts of all sections from each core. Samples M, O, P, and Q correspond to river sediments sampled simultaneously to the residue cores (Grimalt, 2010). Once collected, samples were homogenized and stored at 4 °C in darkness until testing.

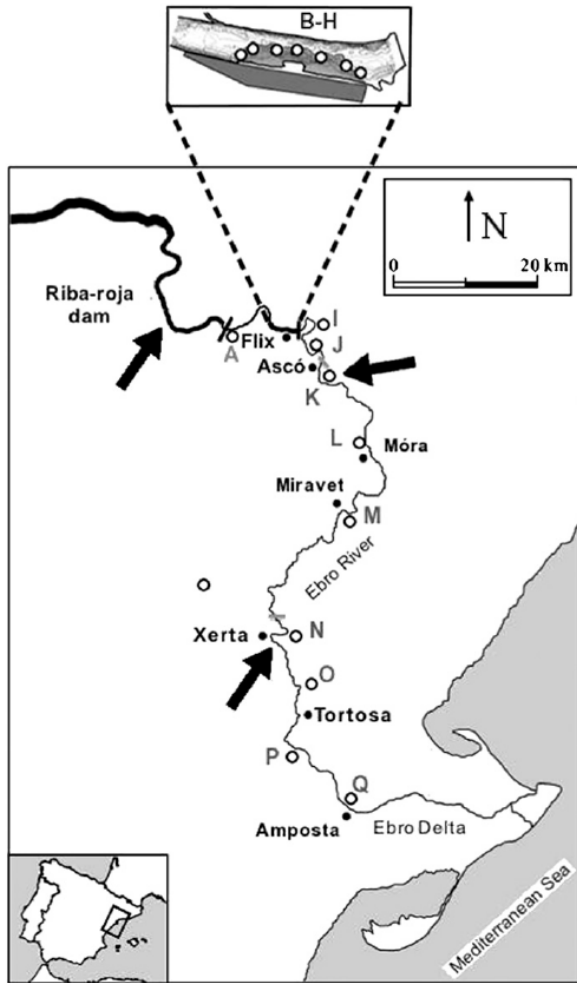


Fig. 1. Map of the low course of the Ebro River with indication of sampling sites. Approximate position of dams (black bars) and overflow dams (grey bars) is indicated. Empty dots mark the approximate sediment and core sampling sites; they are identified by upper case letters (A-Q), as listed in Table 1. The inset on the top shows a detail of the Flix chlor-alkali plant (grey polygon at the bottom), the adjacent dam and the area of the reservoir covered by industrial residues (grey area). Approximate sampling locations are represented as above. Black arrows indicate the three sites in which fish were sampled. Relevant locations (black dots) and geographical features are also shown. The inset at the bottom locates the represented area in the Iberian Peninsula.

Table 1
Characterisation of sediment and core sample from the Low Ebro River.

Sampling point ^a	Localisation	Latitude N	Longitude E	NFEQ (µg/g)	Organochlorine compounds (ng/g)													
					PeCB	HCB	α-HCH	β-HCH	γ-HCH	PCB-28	PCB-52	PCB-101	PCB-118	PCB-153	PCB-138	PCB-180	4,4'-DDE	4,4'-DDT
A	Riba-roja dam	41 14.3717'N	00 25.9673'E	0.02	0.6	3.1	0.3	1.8	0.5	21	7.3	0.7	0.3	1.6	2.2	17	3.6	1.7
B	Flix residues (surface)	41 13.9014'N	00 32.1177'E	0.49	1300	5570	0.3	1.8	0.5	21	7.3	0.7	0.3	1.6	2.2	17	3.6	1.7
C	Flix residues (core ^b)	41 13.9172'N	00 32.2020'E	3.91	6488	21137	83	222	83	552	354	10	11	18	25	20	260	442
D	Flix residues (core ^b)	41 13.9223'N	00 32.2697'E	3.28	13078	36072	63	166	63	486	199	181	93	167	296	345	459	262
E	Flix residues (core ^b)	41 13.9098'N	00 32.3210'E	4.12	15486	45549	42	421	42	750	406	232	134	225	434	178	705	256
F	Flix residues (core ^b)	41 13.9061'N	00 32.4041'E	0.81	38944	104076	57	137	57	5272	2419	1250	624	1187	2177	250	693	356
G	Flix residues (core ^b)	41 13.8862'N	00 32.4755'E	7.35	1765	21718	25	105	25	151	274	294	122	321	540	1019	895	1300
H	Flix residues (surface)	41 13.8566'N	00 32.5195'E	0.96	3603	15137	4.7	4.7	0.7	25	7	9	9	14	29	24	316	482
I	Flix-Ascó	41 14.7085'N	00 33.4514'E	0.04	9.1	232	0.3	0.3	0.3	29	15	39	35	145	134	168	42	354
J	Flix-Ascó	41 13.5669'N	00 32.9396'E	1.38	18	124	1.7	0.2	0.2	69	77	293	388	838	1117	2920	412	6395
K	Ascó	41 10.9587'N	00 3.201'E	0.09	4.3	138	0.9	0.9	0.9	12	5	8	6	28	31	85	30	402
L	Móra	41 05.4833'N	00 3.551'E	0.98	3.4	51	0.2	0.8	0.3	10	5	8	9	20	28	27	16	163
M	Miravet	41 01.8000'N	00 35.3500'E	0.20	15	480	6	43	6	16	15	18	16	33	59	17	40	350
N	Xerta	40 46.8500'N	00 31.2333'E	0.01	3.1	99	2.4	4.6	4.6	9.3	11.0	7.1	7.1	22	37	11	43	146
O	Xerta-Tortosa	40 55.3347'N	00 29.6706'E	0.26	0.7	28	0.2	0.2	0.2	1.5	1.5	1.6	2.6	3.7	4.0	5.9	18	71
P	Tortosa	40 50.9333'N	00 31.5833'E	0.01	0.1	40	2.4	39	2.6	8.9	8.3	6.8	4.0	7.6	15	21	18	71
Q	Amposta	40 43.7000'N	00 34.4500'E	0.01	150	1.8	2.9	2.1	2.1	6.1	6.1	4.5	2.4	3.2	6.0	21	11	95

^a See locations in Fig. 1.

^b Aggregated values for core samples (0 to 1.2–3.2 m, depending on sampling point).

Common carp (*Cyprinus carpio*) specimens were captured by direct current electric pulse, anesthetized in ice and its length and weight measured. They were sacrificed by decapitation and sexed by visual inspection of gonads. The livers were dissected, weighted and a small sample (50 mg) was placed in a cryogenic vial with 1 mL RNAlater (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), transported to the laboratory on ice, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for mRNA analysis. The rest of the liver was immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for biochemical determinations. Blood samples (0.5 mL) were obtained by puncture of the caudal vein and centrifuged in situ at 1500 rpm for 2 min. The supernatant (plasma) was gently removed and the pellet resuspended in sterilized citrate buffer, placed on ice and immediately transported to the laboratory for micronuclei analysis (Quirós et al., 2008). Hepatosomatic index was calculated as the percentage of the total body weight corresponding to the liver. Condition factor was calculated as hundred times the ratio of weight in grams divided by the cube of the length in cm.

2.3. Analysis of organochlorine compounds

Organochlorine compounds in sediment samples were extracted and analyzed as described with minor modifications (Carrizo et al., 2007 and Grimalt et al., 2004). Dried sediment samples (0.5–1 g) were extracted in parallel with laboratory blanks by sonication (three extractions, 20 min each) using a mixture of 20 mL of n-hexane/dichloromethane (4:1 v/v). The three extracts were combined, spiked with a surrogate recovery standard (PCB congeners 30 and 200), reduced to 2 mL by vacuum rotary evaporation and cleaned-up with concentrated sulfuric acid. Finally, extracts were vacuum evaporated to 0.5 mL and sulfur-containing compounds were removed using activated copper, which was subsequently eliminated by filtration through anhydrous sodium sulfate and n-hexane rinsing. Elution solvent and rinses were concentrated to 100 μL in isooctane by rotary vacuum and nitrogen stream evaporation.

Pentachlorobenzene (PeCB), hexachlorobenzene (HCB), α -, β - and γ -hexachlorocyclohexanes (HCHs), PCB congeners 28, 52, 101, 118, 153 and 180, p,p'-DDE and p,p'-DDT were analyzed by GC-ECD (Agilent Technologies, model 6890N, Palo Alto, CA, USA) with a 60 m \times 0.25 mm i.d. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA) coated with 5% phenyl 95% methylpolysiloxane (film thickness 0.25 μm). Before chromatographic analysis, an internal standard of PCB 142 was added to correct for instrument variability. The instrument was operated in splitless mode (closed for 1.5 min) and the oven temperature program started at 90 $^{\circ}\text{C}$ (held for 2 min) to 130 $^{\circ}\text{C}$ at 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and then to 290 $^{\circ}\text{C}$ at 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (holding time 20 min). Injector and detector temperatures were 280 $^{\circ}\text{C}$ and 320 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Helium and nitrogen were used as carrier (1.5 mL/min) and make-up (60 mL/min) gases respectively.

Calibration curves were performed for each compound to be quantified. Mean recovery values of the surrogates PCB 30 ($56 \pm 16\%$) and PCB 200 ($85 \pm 10\%$) were used to correct

quantitative data of more and less volatile compounds, respectively. Blank levels were used to calculate the limits of detection (LOD), which ranged between 0.001 and 0.03 ng g⁻¹.

2.4. Recombinant yeast assay

AhR-based recombinant yeast assays (AhR-RYA) were performed as previously described (Noguerol et al., 2006a and Noguerol et al., 2006b). The YCM4 yeast strain (Miller, 1997) was grown overnight in minimal medium (6.7 g/L) yeast nitrogen base without amino acids plus ammonium sulfate (DIFCO, Basel, Switzerland) supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required and with galactose as a carbon source to express AhR and the cofactor ARNT (Miller, 1999). The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 100 µL aliquots in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC™, Roskilde, Denmark; Garcia-Reyero et al., 2001) previously silylated by overnight exposure to an atmosphere of dimethylsilane. We performed a serial dilution scheme based on 1:3 dilution steps and using glass microcapillary tubes rather than pipette tips for all liquid transfers, to eliminate contact with plastic surfaces (Garcia-Reyero et al., 2001). Plates were incubated for 4 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 100 µL YPER™ (PIERCE™, Rockford, IL, USA) was added to each well and further incubated at 30 °C for 30 min. Afterwards, 100 µL of assay buffer supplemented with 0.1% 2-βmercaptoethanol and 0.5% of the 4-methylumbelliferone β-D-galactopyranoside (MuGal) solution (both from the FluorAce™ beta-galactosidase Reporter Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was added to the lysed cells. After brief centrifugation, plates were read in a Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 15 to 20 min (one measurement per min); β-galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary fluorescence units with time, using standard linear regression methods. To test possible inhibitory activity, yeast cultures were incubated for 4 h with 2 µM of β-naphthoflavone, added to a 1:30 dilution of each sample, and processed as before. Samples were tested in triplicate. AhR ligand activity values were calculated as naphthoflavone equivalents, NFEQ from dose-response curves by adjusting the data to a first-order Hill equation, as described (Noguerol et al., 2006a).

2.5. Cyp1A gene expression analysis

Total RNA was extracted from tissue samples as previously described (Garcia-Reyero et al., 2004). Total RNA concentration was estimated by spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies; Delaware, DE), treated with DNaseI (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) and reverse-transcribed to cDNA (Omniscript, Qiagen, Valencia, CA) and stored at -20 °C. Specific transcripts were quantified by

real-time PCR in a Abi Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the SYBR Green chemistry (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Gene specific primer sets were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). β -actin forward primer: 5' GCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGG 3'; β -actin reverse primer: 5' GTTTAGAAGCATTTCGCGGTGGACG 3' (Genebank accession number M24113, 131 bp); CYP1A forward primer: 5' CCTTCCTTCCTTTCACCATTCTC 3'; reverse primer, CTTGTTCAAGTCCGTACCATCCGC (Genebank accession number AB048939, 189 bp). Relative expression values were calculated according to Eq. (1) using threshold cycle (Ct) values from triplicate assays as previously described (Pfaffl, 2001).

PCR efficiency values for β -actin and the target gene, EAct and ETg, were calculated as described (Pfaffl, 2001). Results are given in copies of Cyp1A mRNA per 1000 copies of β -actin mRNA (referred to as ‰ of reference gene, for simplicity). The sequence of amplified PCR products was confirmed by DNA sequencing in Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) and sequences compared to GenBank references AB048939 for Cyp1A and M24113 for β -actin (Quirós et al., 2007b). The suitability of β -actin as a reference gene was assessed by the BestKeeper program (Pfaffl et al., 2004; data not shown).

2.6. EROD analysis

EROD activity was determined in the liver microsomal fractions as described (Lavado et al., 2004). Briefly, after weighing, the livers were flushed with ice cold 1.15% KCl, and homogenized in 1:5 w/v of cold 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, pH 7.4, containing 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM phenanthroline, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. Homogenates were centrifuged at 12,000× g for 20 min. The 12,000× g supernatant was further centrifuged at 100,000× g for 60 min to obtain microsomal fractions. Microsomal pellets were resuspended in a small volume of 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 20% w/v glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM phenanthroline, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. Microsomal proteins were measured by the method of Lowry (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard. EROD activity was determined at 30 °C essentially as described (Burke and Mayer, 1974). Liver microsomes (10 ml) were incubated for 10 min in a final volume of 1.0 ml containing 90 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, pH 7.4, 0.22 mM NADPH, and 3.8 mM 7-ethoxyresorufin. The reaction was stopped by adding 2 ml of ice-cold acetone, samples were centrifuged at 900× g for 10 min, and 7-hydroxyresorufin fluorescence was determined in a SFM-25 spectrofluorimeter (Kontron Instruments, Bletchley, UK) at 537/583 nm excitation/emission wavelengths.

2.7. Micronuclei quantitation

Citrated blood samples were counted and further diluted in citrate buffer to 106 cell/50 μ l. This erythrocyte suspension was treated by a two-step technique as described (Nusse and Marx, 1997). One milliliter of solution I (584 mg/liter NaCl, 1 μ g/liter Na-Citrate, 10 mg/ml RNase from bovine pancreas, 0.3 ml/liter Nonidet p-40, and 25 μ g/ml ethidium bromide (EB)) was added to 50 μ l of cell suspension. After 1 h at room temperature, 1 ml of solution II (15 mg/ml citric acid, 0.25 M sucrose, and 40 μ g/ml EB) was added and maintained at 4 °C until analysis. DNA frequency distributions of stained nuclei and micronuclei were analyzed using a Coulter XL flow cytometre (Beckman Coulter, Fullerton, CA); proportions of micronuclei relative to total erythrocyte nuclei was calculated from forward scattering vs. fluorescence plots as described (Llorente et al., 2002 and Quirós et al., 2008). The fraction of micronuclei present in samples is referred to as ‰ of total counted nuclei.

2.8. Statistical analysis

All statistics were performed using the SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) package. Values are presented as means \pm SEM (Standard Error of Means). Non-parametric tests were preferred when comparing very different sets of data; normality of data distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Bivariate correlations between different parameters were analyzed by the Pearson correlation (normal distributions) or by the non-parametric Spearman rank correlation test (not normal distributions). Statistical comparisons of mean values were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's post-hoc analysis.

3. Results

3.1. OC levels in residues from the Flix factory and Ebro River sediments

Industrial residues from the Flix factory showed extremely high concentrations of different OCs, exceeding 100 μ g/g of sediment in at least one of the cores (Fig. 2A, Table 1). River sediments sampled downstream Flix showed a gradual decrease in OC contents, only exceeding the 10 μ g/g mark in a single case (Sample J, very close to the Flix dam, Fig. 1). OC levels were further reduced in sediments sampled downstream Xerta, with OC contents well under the 1 μ g/g mark (samples N–Q, Table 1, Fig. 2A), suggesting a progressive decrease of the chemical pollution along the river course. However, even these low levels from downstream river sediments exceeded by almost a factor of magnitude the OC content of sample A, taken a few km upstream the factory (Table 1, Fig. 1 and Fig. 2). These data indicates that OC pollution in the studied area originated at the Flix factory.

The relative importance of different OC families varied along the studied area. Residues sampled near the factory (samples B–H) were predominantly polluted by PeCB and HCB (> 85% of total OC, Table 1, Fig. 2B), probably reflecting the relevance of these compounds in the factory output. In contrast, sediments sampled downstream showed a large proportion of pp'-DDE and pp'-DDT, as well as of different PCB congeners. This distribution probably reflects the persistence and hydrophobicity of these compounds and, hence, their ability to persist and accumulate in the sediments. The low levels of OC in sample A corresponded essentially to PCB congeners, arguably among the most persistent OC present in the environment (Fig. 2B).

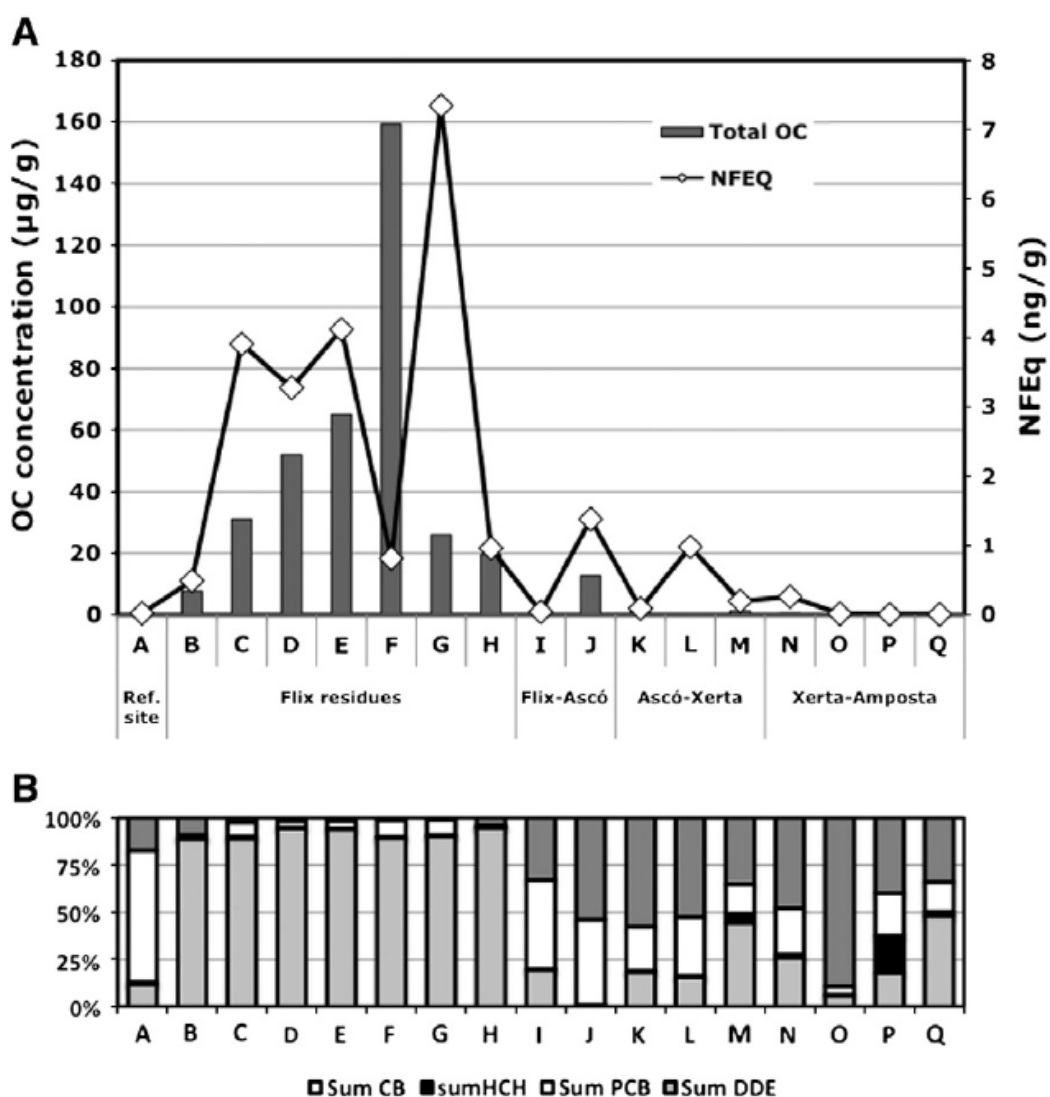


Fig. 2. A) Profile of the AhR ligand activity (square diamonds and solid line, right scale) and total OC content (grey bars, left scale) from sediment and residue samples from the low Ebro River. Samples are labelled as in Fig. 1 and Table 1; their location in the different sections of the studied portion of the river is also indicated. B) Relative composition in OC families in residues and sediment samples. CB (pale grey), eCB+HCB; HCH (black), hexachlorocyclohexane isomers; PCB (empty), sum of PCB congeners; DDE (dark grey, pp'-DDE+pp'-DDT).

3.2. AhR ligand activity in residues from the Flix factory and Ebro River sediments

Total AhR ligand activity in residue and sediment samples, as measured by AhR-RYA, showed a profile very similar to that of the total OC content in the same samples (Fig. 2A). Maximal activity corresponded to residues, followed by river sediments sampled between the Flix dam and Xerta (samples I to M). Very low values, close to detection limits, were found downstream Xerta (samples N to Q) and upstream the factory (Fig. 2, Table 1). Fig. 2A shows some discrepancies between the chemical content and AhR activity (notably, samples F, G and L) we attribute to the complexity of the samples and the combined action of agonistic and antagonistic signals. Spearman's rank test showed a very strong correlation ($p < 0.001$) between AhR ligand activity values and total OC, PeCB, and PCB118 contents (Table 2). These results suggest a very complex mix of AhR ligands in sediment and residue samples, most probably OC. The distribution of the AhR ligand activity downstream Flix points the chlor-alkali plant as the likely origin for most of the pollution by dioxin-like compounds in the low Ebro River.

Table 2

Spearman rank correlation between dioxin-like activity in sediments and cores and contents in different OCs.

	<i>rho</i>	Sig. (2-tailed)	<i>n</i>
PeCB	0.759	0.001***	16
HCB	0.632	0.007**	17
a-HCH	0.417	0.156	13
b-HCH	0.477	0.062	16
g-HCH	0.267	0.402	12
PCB-28	0.734	0.001**	16
PCB-52	0.559	0.030*	15
PCB-101	0.728	0.001**	16
PCB-118	0.741	0.001***	17
PCB-153	0.674	0.003**	17
PCB-138	0.654	0.004**	17
PCB-180	0.685	0.003**	16
4,4'-DDE	0.677	0.004**	16
4,4'-DDT	0.396	0.116	17
Total PCB	0.693	0.002**	17
Total HCH	0.518	0.033*	17
Total DDE	0.636	0.006**	17
Total CB	0.627	0.007**	17
Total OC	0.786	0.000***	17

*, $p > 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

3.3. Physiological status of carp populations from the low Ebro River

Analysis of molecular, biochemical and cytological biomarkers and of body indexes showed a very similar picture of the effects of pollution in the sampled carp populations (Table 3). Values of Cyp1A mRNA abundance and of the activity of its associated enzymatic activity (EROD) were significantly higher for fish captured close to Ascó than that for the other two populations (Table 3). These two biomarkers are diagnostic for the presence of dioxin-like pollutants, due to their capacity to bind the AhR. High expression levels of Cyp1A were accompanied by a higher

micronuclei frequency in peripheral blood, indicating possible genotoxic damage at the Ascó population. Hepatosomatic index values were significantly higher in this population, which also showed a significantly poorer condition factor. These data indicate a biological impact in the fish population inhabiting just few km downstream Flix, and that the impact is reduced to essentially upstream values after Xerta. The similarity of this pattern to the distribution of both OC content and AhR ligand activity (Fig. 2, Table 3) suggests a relationship of these biological effects with chemical pollution from the Flix factory.

All five biomarkers analyzed here showed a close correlation between them (Table 4). This mutual correlation suggests a common origin for the observed negative effects, namely the presence of OC in the river. In this regard, it is revealing the close correlation between high levels of Cyp1A mRNA, indicative for dioxin-like pollution, and low condition factor values or high micronuclei counts (Fig. 3); the expected correlation between Cyp1A mRNA abundance and its associated enzymatic activity (EROD) is also shown for comparison (Fig. 3). These data suggest that the poor condition factor and hepatosomatic indices showed by the impacted populations were closely related to the presence of AhR ligands in the river.

4. Discussion

Our data show a consistent picture of a strong environmental impact in the approximately 50 km between the Flix factory and the Xerta overflow dam. At the chemical level, this impact translates itself in elevated levels of different OCs and of AhR ligand activity in river sediments; these levels return to almost basal (upstream Flix) levels for samples taken downstream Xerta. Fish captured nearby the Ascó overflow dam show clear genetic and molecular signals of exposure to dioxin-like (i.e., AhR ligand) compounds, such as elevated levels of hepatic Cyp1A mRNA and of EROD activity. These biomarkers of chemical impact were accompanied by alterations of the micronuclei index (a typical marker for genotoxicity), increased liver size relative to the body weight (possible indication of liver inflammation or abnormal growth), and poorer condition factor — a general indicator of malnutrition or loss of fitness. As many dioxin-like pollutants are recognized mutagens and cancer promoters, we consider it likely that all these biomarkers have a common origin. These data show, therefore, not only a significant loss of fitness for the Ascó fish population, but also provide a causal explanation for it, namely the dioxin-like substances contained in the residues of the chlor-alkali plant. A recent multi-tier analysis of different species of fish from this area showed significant decreases in condition and fecundity of carp, roach (*Rutilus rutilus*) and pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) populations (Benejam et al., 2010). Therefore, it is likely that the effects observed in our study can be generalized to many, if not all, fish species inhabiting the low Ebro River.

Table 3
Physical characteristics and biomarker values for fish samples used in this study.

	Sampling site						ANOVA p-value	
	Riba-roja		Ascó		Xerta			
	Average	n	Average	p ^a	n	Average		p ^a
Sex ratio (1–male, 2–female)	1.5 ± 0.5	13	1.4 ± 0.5	N/A	10	1.8 ± 0.5	N/A	8
Weight (kg)	4.3 ± 1.3	13	2.6 ± 0.8	**	10	3.7 ± 0.8		8
Length (cm)	57.8 ± 5.9	13	53.6 ± 5.2		10	57.0 ± 4.0		8
Condition factor (g cm ⁻³)	2.2 ± 0.3	13	1.6 ± 0.1	***	10	2.0 ± 0.2		8
Hepatosomatic index (% body weight)	1.6 ± 0.3	13	2.2 ± 0.4	***	10	1.7 ± 0.6		8
Micronuclei index(%)	1.3 ± 0.6	4	22.1 ± 15.9	*	4	5.7 ± 5.4		7
EROD (pmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	16.0 ± 9.8	13	218.6 ± 177.1	***	10	91.7 ± 59.5	***	8
Cyp1A gene expression (% reference gene)	122.6 ± 86.6	12	2313.3 ± 1952.4	***	9	444.8 ± 219.7	***	7

*, p > 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

N/A, not applicable.

^a Differences from the Riba-roja fish population, Student's t-test.

In a recent paper, we described the distribution and physiological responses to mercury pollution in the same section of the Ebro River (Navarro et al., 2009). Mercury is used in the process of OC production by the chlor-alkali plant, and a part of it is discharged into the Ebro River. Mercury loads were maximal downstream Xerta, and no evident health problems appeared associated to mercury loads, in some cases exceeding 1 mg/Kg of muscle. In fact, the only physiological responses associated to mercury (elevated levels of GSH in the liver and of MT mRNA abundance in the kidney and scales) were related to metabolic acclimation to the continuous presence of mercury rather than to a direct damage (Navarro et al., 2009). This is at variance with both the distribution and putative biological effects of the pollutants monitored here. Unlike mercury, OC contents and AhR ligand activity in sediments were maximal at or near the discharging point, and a clear correlation was observed between its concentration and different markers of biological impact in fish. Therefore, we concluded that dioxin-like pollutants appeared to be a much more severe threat for the fish health status than mercury, independently from their impact on human health. It is important to stress that at least some of the observed effects may be related to the combination of both types of pollution, as fish populations may integrate effects from various stressors, either directly or via the food chain. These putative combined effects of mercury and OC pollution remain to be further studied.

The WFD refers to water quality in terms of “ecologically clean water”, and this obviously includes effects on both vertebrate and invertebrate populations. In previous reports, a battery of biochemical biomarkers was used to detect the effects of the Flix factory on local populations of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). The results indicated an oxidative stress in the populations downstream Flix sediments compared to those sampled upstream (Faria et al., 2010). These effects included elevated levels of antioxidant enzymes, like CAT, GPX, and GST, as well as increased DNA damage and lipid peroxidation levels. These toxic effects were dissected by using *Daphnia magna* feeding tests. Lye, on one hand, and heavy metals, on the other, appeared as the most active toxicants for *Daphnia* whereas OCs showed toxic effects only in vertebrate-based assays (Bosch et al., 2009). This is relevant to the interpretation of the effects of the combination of pollutants present in the Flix residues in different animal groups, for the key factor determining toxicity by OCs in vertebrates is the activation of the AhR. This process does not occur in protostomata, in which the AhR

homologous transcription factors are apparently devoid of any ligand-binding domain (Hahn, 2002 and Nebert et al., 1993).

Table 4
Bivariate Pearson correlations for different fish biomarkers.

	Condition factor	Hepatosomatic index	EROD	Cyp1A gene expression	MNI (%)
Condition factor	1	-0.430 (31)*	-0.408 (31)*	-0.441 (28)*	-0.439 (15)
Hepatosomatic index		1	0.318 (31)	0.456 (28)*	0.357 (15)
EROD			1	0.900 (28)**	0.849 (15)**
Cyp1A gene expression				1	0.948 (13)**
MNI (%)					1

*, p>0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

It is important to stress that all these chemical burdens and physiological consequences for fish occurred at concentrations of OC or mercury in the river water well below the acceptable levels

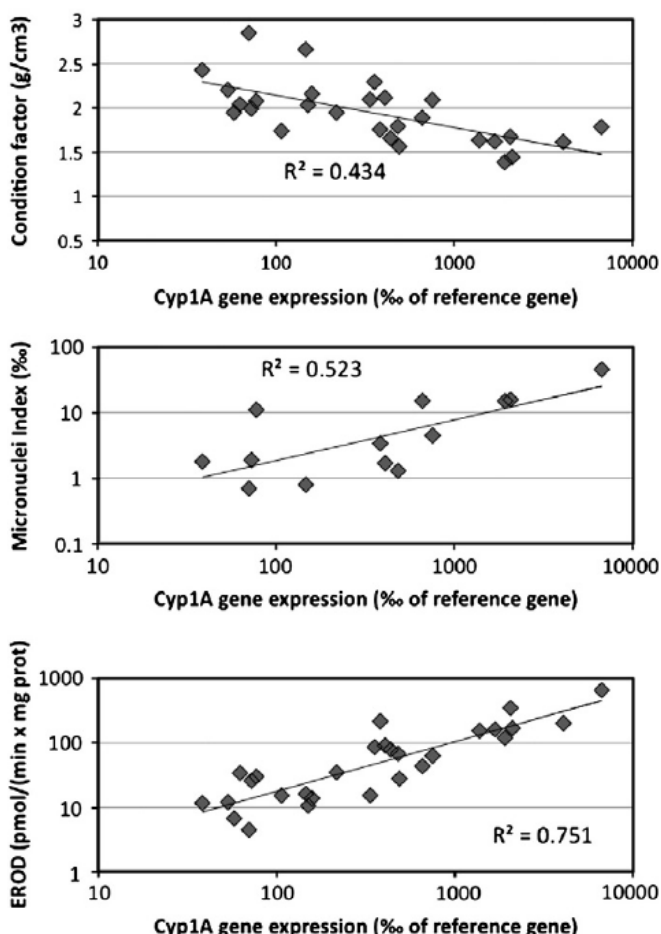


Fig. 3. Double logarithmic correlations between Cyp1A gene expression and EROD (left), condition factor (centre) and micronuclei index (right). Power regression lines and R² values are also shown.

for human consumption. Public weekly data on water quality control performed in Ascó and other sites by the Ebro Water Authority (Confederación Hidrográfica del Ebro, <http://195.55.247.234/bajoebro/>) showed only very sporadic episodes of OC and Hg levels above detection limits for the last 8 years. We conclude that the observed impact in fish (and invertebrates) likely comes from pollutants present in sediments and/or particulate matter, which are not reflected in the standard water quality analysis. Particularly, our data suggests that sediments may be a reservoir for toxic substances even in dynamic environments like rivers, and argue for their routinely analysis in water quality control programs.

Acknowledgments

This work has been supported by the Spanish Ministry for Science and Innovation (CGL2008-01898/BOS), the Spanish Ministry for the Environment and the Catalan Water Agency (ACA) of the Generalitat de Catalunya.

References

Abbott BD, Perdew GH, Birnbaum LS. Ah receptor in embryonic mouse palate and expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;126:16–25.

Adams SM, Crumby WD, Greeley Jr MS, Shugart LR, Saylor CF. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 1992;24:347–60.

al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 1995;343:121–35.

Arukwe A. Complementary DNA cloning, sequence analysis and differential organ expression of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;133:613–24.

Benejam L, Benito J, Garcia-Berthou E. Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. *Water Air Soil Pollut* 2010;210:231–42.

Bolognesi C, Perrone E, Roggeri P, Pampanin DM, Sciutto A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat Toxicol* 2006;78(Suppl 1):S93–8.

Bosch C, Olivares A, Faria M, Navas JM, del Olmo I, Grimalt JO, et al. Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry. *Aquat Toxicol* 2009;94:16–27.

Burke MD, Mayer RT. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 1974;2:583–8.

Carrasco L, Diez S, Soto DX, Catalan J, Bayona JM. Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. *Sci Total Environ* 2008;407:178–84.

Carrizo D, Grimalt JO, Ribas-Fito N, Sunyer J, Torrent M. Influence of breastfeeding in the accumulation of polybromodiphenyl ethers during the first years of child growth. *Environ Sci Technol* 2007;41:4907–12.

Carrola J, Fontainhas-Fernandes A, Matos P, Rocha E. Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) from the Tinhela River, subjected to mine drainage from the abandoned Jales Mine (Portugal). *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;83:35–41.

- Eljarrat E, Martínez MA, Sanz P, Concejero MA, Piña B, Quirós L, et al. Distribution and biological impact of dioxin-like compounds in risk zones along the Ebro River basin (Spain). *Chemosphere* 2008;71:1156–61.
- Faria M, Huertas D, Soto DX, Grimalt JO, Catalan J, Riva MC, et al. Contaminant accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro River (NE Spain). *Chemosphere* 2010;78:232–40.
- Fent K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 2003;140–141:353–65.
- Fernández M, L'Haridon J, Gauthier L, Zoll-Moreux C. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutat Res* 1993;292:83–99.
- Fernández M, Alonso C, González M, Hernández L. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere* 1999;38:33–43.
- Fuerhacker M. EU water framework directive and Stockholm convention: can we reach the targets for priority substances and persistent organic pollutants? *Environ Sci Pollut Res Int* 2009;16(Suppl 1):S92–7
- Fulton T. The rate of growth of fishes. *Annu Rep Fish Board Scotland* 1904;22:141–241.
- García-Reyero N, Grau E, Castillo M, López de Alda MJ, Barceló D, Piña B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:1152–8.
- García-Reyero N, Raldua D, Quirós L, Llavera G, Cerda J, Barcelo D, et al. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:670–5.
- Grimalt JO. http://mediambient.gencat.cat/cat/ciudadans/informacio_ambiental/Flix/estudi.jsp?ComponentID=42291&SourcePageID=42851#1. Last accession, August 2010.
- Grimalt JO, van Drooge BL, Ribes A, Vilanova RM, Fernández P, Appleby P. Persistent organochlorine compounds in soils and sediments of European high altitude mountain lakes. *Chemosphere* 2004;54:1549–61.
- Hagenaars A, Knapen D, Meyer IJ, van der Ven K, Hoff P, De Coen W. Toxicity evaluation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol* 2008;88:155–63.
- Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 2002;141:131–60.
- Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:307–40.
- Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR. 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9776–81.
- Lavado R, Thibaut R, Raldua D, Martín R, Porte C. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:247–57.

Lavado R, Urena R, Martin-Skilton R, Torreblanca A, Del Ramo J, Raldúa D, et al. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ Pollut* 2006;139:330–9.

Llorente GA, Farran A, Ruiz X, Albaiges J. Accumulation and distribution of hydrocarbons, PCBs and DDTs in tissues of three species of anatidae from the Ebro Delta (Spain). *Arch Environ Contam Toxicol* 1987;16:563–72.

Llorente MT, Martos A, Castano A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology* 2002;11:27–34.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.

Machala M, Dusek L, Hilscherova K, Kubinova R, Jurajda P, Neca J, et al. Determination and multivariate statistical analysis of biochemical responses to environmental contaminants in feral freshwater fish *Leuciscus cephalus*, L. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:1141–8.

McClain JS, Oris JT, Burton Jr GA, Lattier D. Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 2003;22:361–70.

Miller III CA. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem* 1997;272:32824–9.

Miller C. A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;160:297–303.

Miller HC, Mills GN, Bembo DG, MacDonald JA, Evans CW. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. *Aquat Toxicol* 1998;44:183–93.

Muller WU, Nusse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 1996;366:163–9.

Navarro A, Quirós L, Casado M, Faria M, Carrasco L, Benejam L, et al. Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. *Aquat Toxicol* 2009;93:150–7.

Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann NY Acad Sci* 1993;685:624–40.

Noguerol T, Boronat S, Jarque S, Barceló D, Piña B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 2006a;69:351–8.

Noguerol TN, Boronat S, Casado M, Raldúa D, Barcelo D, Piña B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal Bioanal Chem* 2006b;385:1012–9.

- Nusse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutat Res* 1997;392:109–15.
- Pastor D, Sanpera C, González-Solís J, Ruiz X, Albaigés J. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere* 2004;55:567–76.
- Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper– Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004;26:509–15.
- Piña B, Casado M, Quirós L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *TrAC, Trends Anal Chem* 2007;26:1145–54.
- Poland A, Knutson JC. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982;22:517–54.
- Quirós L, Jarque S, Lackner R, Fernández P, Grimalt JO, Piña B. Physiological response to persistent organic pollutants in fish from mountain lakes: analysis of Cyp1A gene expression in natural populations of *Salmo trutta*. *Environ Sci Technol* 2007a;41: 5154–60.
- Quirós L, Piña B, Solé M, Blasco J, López MA, Riva MC, et al. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies. *Chemosphere* 2007b;67:1144–54.
- Quirós L, Ruiz X, Sanpera C, Jover L, Piña B. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environ Pollut* 2008;155:81–7.
- Rees C, Li W. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquat Toxicol* 2004;66:357–68.
- Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;57:168–74.
- Safe S, Connor K, Ramamoorthy K, Gaido K, Maness S. Human exposure to endocrineactive chemicals: hazard assessment problems. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26: 52–8.
- Solé M, Raldúa D, Barceló D, Porte C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;56:373–80.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;13: 57-149.
- Zhang Z, Hu J. Effects of p,p'-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Environ Sci (China)* 2008;20:347–52.

Article 2: Identificació de compostos vinculats soluble en aigua i les partícules que causen efectes tòxics subletals. Un estudi de camp en els sediments afectats per una indústria de clor-àlcali

Carme Bosch, Alba Olivares, Melissa Faria, Jose M. Navas, Iván del Olmo, Joan O. Grimalt, Benjamín Piña, Carlos Barata

Una combinació d'assaigs que valoren efectes subletals com els tests d'alimentació en *Daphnia magna*, els bioassaigs basats en cèl·lules de llevats i vertebrats i els procediments d'Avaluació d'Identificació de Toxicitat (TIE, *Toxicity Identification Evaluation*) es va utilitzar per caracteritzar els compostos tòxics presents en els sediments recollits en un tram del riu Ebre sota la influència dels afluents d'una indústria clor-àlcalina (riu Ebre, NE d'Espanya). Els assaigs van ser dissenyats per mesurar i identificar els compostos tòxics de les partícules i les fraccions d'aigua filtrada d'elutriats dels sediments. L'ús combinat de bioassaigs que responen als elutriats i compostos tipus dioxina mostren l'evidència de tres grups principals de contaminants perillosos en el lloc més pol·luït: (A) els metalls com el cadmi i el mercuri adherit a partícules de sediment fi que puguin ser fàcilment resuspesos i viatjar es aigües avall, (B) compostos solubles (presumiblement, sosa) capaç d'alcalinitzar l'aigua a nivells tòxics, i (C) compostos organoclorats d'alta activitat similars a les dioxines. Aquests resultats proporcionen evidència que la resposta en l'alimentació de *D. magna* a l'elutriat pot ser utilitzada com a substitut d'assaigs de toxicitat crònica total més tediosos, i que la incorporació d'aquets assaigs en l'avaluació de sediment als procediments de TIE pot millorar la capacitat d'identificar la toxicitat dels contaminants tan associats a les partícules com solubles en l'aigua.

Paraules clau: TIE de sediments, elutriar, Dafnia, alimentació, mercuri, PCB

Identification of water-soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry

Carme Bosch^a, Alba Olivares ^a, Melissa Faria ^a, Jose M. Navas ^b, Iván del Olmo^b, Joan O. Grimalt^a, Benjamín Piña^a, Carlos Barata^{a,*}

^a Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain.

^b INIA Dpto. Medio Ambiente, Laboratorio de Ecotoxicología, Ctra de la Coruña Km 7.5, E-28040 Madrid, Spain

A combination of cost effective sublethal *Daphnia magna* feeding tests, yeast- and cell culture-based bioassays and Toxicity Identification Evaluation (TIE) procedures was used to characterize toxic compounds within sediments collected in a river area under the influence of the effluents from a chlor-alkali industry (Ebro River, NE Spain). Tests were designed to measure and identify toxic compounds in the particulate and filtered water fractions of sediment elutriates. The combined use of bioassays responding to elutriates and dioxin-like compounds evidenced the existence of three major groups of hazardous contaminants in the most contaminated site: (A) metals such as cadmium and mercury bound to sediment fine particles that could be easily resuspended and moved downstream, (B) soluble compounds (presumably, lye) able to alkalinize water to toxic levels, and (C) organochlorine compounds with high dioxin-like activity. These results provided evidence that elutriate *D. magna* feeding responses can be used as surrogate assays for more tedious chronic whole sediment tests, and that the incorporation of such tests in sediment TIE procedures may improve the ability to identify the toxicity of particle-bound and water-soluble contaminants in sediments.

©2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article history: Received 29 December 2008; Received in revised form 15 May 2009. Accepted 21 April 2009.

Keywords: Sediment TIE, Elutriate, *Daphnia*, Feeding, Mercury, PCB

1. Introduction

The adsorption of chemicals onto sediment particles is an important process through which many contaminants are removed from the water column. Bottom sediments may act both as a sink and as a long-term source of toxicants (Burton, 2002). This dual role is particularly relevant in rivers, in which pollutants stored in sediments may be easily remobilized by sudden increases of river flow and the consequent increase of toxicant concentrations. However, acute toxic effects in large bodies of water are limited by their dilution capacity. Consequently, the adoption of sensitive sublethal endpoints is generally required to measure toxicity in these ecosystems and to assess the potential effects of pollution to aquatic life in a given area (Vigano, 2000).

Benthic organisms may be exposed to sediment contaminants dissolved in pore water or bound to sediment particles (Harkey et al., 1994; Vigano, 2000). Sediment particles may also affect water column species in case of resuspension (Knezovich et al., 1987; Vigano, 2000). In Mediterranean rivers, which are affected by episodic torrential rains, resuspension of fine sediment particles can reach high levels (>1 g/L; Vericat and Batalla, 2006; Négrel et al., 2007). In such situations, contaminants bound to resuspended fine particles are likely to be of environmental concern. Particle-feeding organisms are of special interest since contaminated particles might end up in their gastrointestinal tract and exert toxic effects.

One approach to identifying potential causes of sediment toxicity is chemical screening, quantifying the contents of priority pollutants. These values can then be compared to numerical benchmarks for sediment contamination, or correlated with measurements of toxic effects. These approaches are limited by the presence of unmeasured toxic chemicals, possible co-correlation of sediment contaminants, and differences in bio-availability and mixture toxicity (EPA, 2007). Sediment toxicity identification and evaluation (TIE) procedures were developed by the US-EPA precisely to solve these problems, first for aqueous samples and more recently also for sediment testing (EPA, 2007). This strategy has grown increasingly popular since the 1990s, especially for pinpointing active substances present in complex mixtures displaying endocrine disrupting activities (Burnison et al., 2003). TIE procedures were mainly used in the past in connection with effluent discharge regulations, but today they are also used in environmental risk assessment (ERA) as well as in remediation work. Several bioassay/effect directed analyses (BDA/EDA) concepts are being developed based on the TIE procedures, such as receptor-based *in vitro* assays, to characterize biological active contaminants present in sediment samples (Hurst et al., 2004; Noguerol et al., 2006a,b; Dindal et al., 2007; Otte et al., 2008). Current methods of sediment toxicity normally use elutriates or solvent extracts (e.g. Brack et al., 1999; Burgess et al., 2000; Phillips et al., 2003), although TIE procedures for whole sediment tests have recently been implemented (EPA, 2007).

Nevertheless, in both sediment TIE and toxicity procedures, the biological effects of particle-bound contaminants are seldom assessed (Ingersoll et al., 1995; Weltens et al., 2000; Schulz and Liess, 2001; Piol et al., 2006). Previous studies (Allen et al., 1995; Taylor et al., 1998; McWilliam and Baird, 2002b; Barata et al., 2008) showed that feeding responses of *Daphnia magna* individuals during and after exposure to contaminants were mechanistically linked to sorption of contaminants to particles. Indeed, McCarthy (1983), Taylor et al. (1998) and Barata et al. (2002) determined that polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and cadmium sorbed to food particles assimilated by daphnids became desorbed within the gut and impaired feeding.

The present study combines different bioassay procedures and analytical methods to characterize toxic effects associated to sediment samples collected from the lower part of Ebro River. The Ebro catchment is the largest river basin in Spain, covers an area of 85,362 km² (<http://www.chebro.es>) and receives the potential influence of three million people, including some heavily industrialized areas. One of these areas is the Flix site, where an organochlorine industry operates since the beginning of the 20th century. This long operational period, along with the construction of a dam next to the factory around 1960, resulted in the accumulation of high amounts of heavily polluted sediments in the adjacent riverbed (Fernández et al., 1999; Grimalt, 2006; Eljarrat et al., 2008). Major pollutants reported in these wastes include hexachlorobenzene (1900 ng/g), polychlorobiphenyls (39,000 ng/g), DDEs–DDTs (1300 ng/g), polychlorostyrenes (360 ng/g), polychloronaphthalenes (1100 ng/g), mercury (49 µg/g), cadmium (2.3 µg/g), chromium (210 µg/g) and nickel (67 µg/g, mean values, Grimalt, 2006). Pollutants originated at Flix site are carried downstream by the Ebro River to its delta 90 km away, which is an UNESCO wildlife reserve for birds (Grimalt, 2006; Ruiz and Llorente, 1991; Pastor et al., 2004). Nevertheless, toxicological information of sediments affected by the chlor-alkali industry to aquatic organisms is limited to a single study that reported the occurrence of dioxin-like PCBs at Flix site (Eljarrat et al., 2008).

The present study aims to develop cost effective tests to assess the toxicity of metallic and organochlorine contaminants, distinguishing between water-soluble and particle-bound toxicants. We will use these tests to characterize toxic components of sediments contaminated by chlor-alkali wastes from the low Ebro River using a TIE sediment approach.

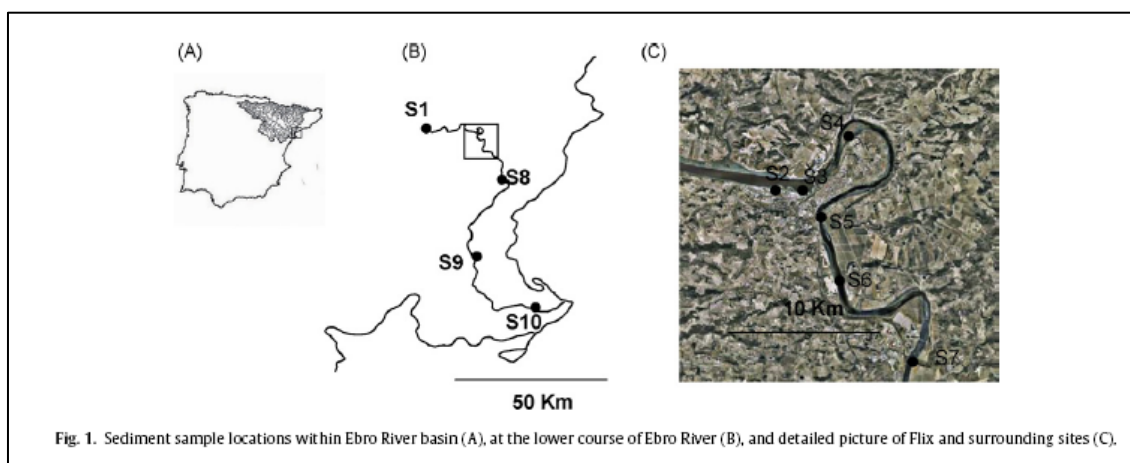
The proposed approach includes chemical and toxicity evaluation of whole sediments, elutriates and solvent extracts. Analytical methods included gas chromatography with electron capture detection (GC-ECD) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Toxicity of different sediment fractions was determined using seven different bioassays: the whole sediment, 10-day *D. magna* chronic assay, bioluminescence *Vibrio fischeri* and algal growth (*Desmodesmus subspicatus*) tests; the *D. magna* feeding and post-feeding assays; the Aryl

hydrocarbon Receptor Recombinant Yeast Assay (Noguerol et al., 2006 a,b), and the measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in trout RTG-2 cells (Navas et al., 2006). This battery of bioassays was designed to evaluate chronic and/or sublethal toxic effects in bacteria, algae, arthropoda and vertebrates exposed to Ebro sediments polluted by residues from the Flix chlor-alkali factory.

2. Materials and methods

2.1. Sediment sampling

The study area covers the last 100km of the Ebro River, including the water reservoir to which the effluents of a chlor-alkali plant are discharged, and the Ebro delta. Ten composite surface sediment samples were collected from the first 40 cm sediment layer during spring and summer 2006 along the lower course of Ebro River between Riba Roja reservoir and its delta (Fig. 1). The sampling included two samples from Flix reservoir (S2 and S3), highly contaminated with Hg and organochlorine compounds, one sample collected upstream (S1) and eight samples collected downstream (S4–S10). This last series of eight samples was selected to include fine sediment particles and encompassed locations with key hydrological and anthropological features such as the meander that follows Flix reservoir (S4 and S5), weirs (S6, S7, and S9), villages (S8) and the delta (S10). Once collected, sediment samples were homogenized and stored at 4 °C in darkness until further manipulations or testing.



2.2. Physico-chemical sediment characterization

A sub-sample of each composite sediment was frozen-dried and the contents of organic matter determined by loss on ignition (4 h at 450 °C). Grain size of fine (<63 µm) and coarse (>63 µm) fractions were determined by dry sieving. Chemical analyses were performed in the fine sediment fraction.

2.2.1. Metal analyses

Metal analyses were restricted to the most abundant elements (Hg, Cd, Cr, Ni, As, Cu, Zn) based on previous studies (Mañosa et al., 2001; Grimalt, 2006). Total ion metals in sediments were extracted and analyzed using aqua regia leaching and ICP-MS. Briefly, 0.5 g of sediment were digested in 8 mL of HCl–HNO₃ 3:1 (Baker RA quality, Peterborough, Cambridgeshire, UK) in Teflon bombs in a microwave oven (Milestone Ethos Plus, Shelton, CT) at 200 °C during 15 min. Once cooled at room temperature the acid residue was filtered and washed with 0.5 M HNO₃ and diluted in a volumetric flask with deionized ultrapure water until 1% acid. Within each digestion series, appropriate blanks with no sediment were also subjected to the same procedure to account for background contamination levels. The studied metals were determined using a Agilent model 7500 CE inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS).

Calibration standards and a reagent blank were analyzed with every 10 samples to monitor signal drift. In every instance, the signal typically changed by 3–5% throughout an analytical run. Rhenium was used as an internal standard to correct for non-spectral interferences. Samples of similar weight of a certified reference material (LGC6187; LGC, Middlesex, UK) were digested during each analytical run and measured trace metal concentrations were within the certified range for the metal.

2.2.2. Analysis of organochlorine compounds

Organochlorine compounds in sediment samples were extracted and analyzed as described with minor modifications (Grimalt et al., 2004; Carrizo and Grimalt, 2007). Dried sediment samples (0.5–1 g) were extracted in parallel with laboratory blanks by sonication (3 extractions, 20 min each) using a mixture of 20 mL of n-hexane/dichloromethane (4:1, v/v). The three extracts were combined, spiked with a surrogate recovery standard (PCB congeners 30 and 200), reduced to 2 mL by vacuum rotary evaporation and cleaned-up with concentrated sulfuric acid. Finally, extracts were vacuum evaporated to 0.5 mL and sulfur-containing compounds were removed using activated copper, which was subsequently eliminated by filtration through anhydrous sodium sulfate and n-hexane rinsing. Elution solvent and rinses were concentrated to 100 µL in isooctane by rotary vacuum and nitrogen stream evaporation.

Pentachlorobenzene (PeCB), hexachlorobenzene (HCB), α -, β - and γ -hexachlorocyclohexanes (HCHs), PCB congeners 28, 52, 101, 118, 153 and 180, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT and p,p'-DDT were analyzed by GC-ECD (Agilent Technologies, model 6890N, Palo Alto, CA, USA) with a 60 m × 0.25 mm i.d. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA) coated with 5% phenyl 95% methylpolysiloxane (film thickness 0.25 µm). Before chromatographic analysis, an internal standard of PCB 142 was added to correct for instrument

variability. The instrument was operated in splitless mode (closed for 1.5 min) and the oven temperature program started at 90 °C (held for 2 min) to 130 °C at 15 °C/min, and then to 290 °C at 4 °C/min (holding time 20min). Injector and detector temperatures were 280 and 320 °C, respectively. Helium and nitrogen were used as carrier (1.5 mL/min) and make up (60 mL/min) gases, respectively.

Calibration curves were determined for each compound to be quantified. Mean recovery values of the surrogates PCB 30 (56 ±16%) and PCB 200 (85 ±10%) were used to correct quantitative data of more and less volatile compounds, respectively. Blank levels were used to calculate the limits of detection (LOD), which ranged between 0.001 and 0.03 ng g⁻¹.

2.3. Toxicity testing

The toxicity of all sediment samples was evaluated using whole sediment tests, elutriates and organic extracts, whereas TIE assessment where restricted to elutriates of S2 and S3 sediments (Table 1). Tests were performed in triplicate for the bioluminescent bacteria, algal growth, RYA and EROD assays, whereas five and ten replicates were used for sublethal *D. magna* feeding and whole sediment tests.

2.3.1. Whole sediment tests Whole sediment tests were based on the ASTM (1999) method and were initiated with 5 days old *D. magna* juveniles exposed to 10 g of sediment in 40mL of medium containing artificial water (ASTM hard) plus food (5×10⁵ cells/ml of *Chlorella vulgaris*), which was replaced daily. The experiments lasted 10 days and the cumulative total number of offspring produced and final body length were monitored and used as endpoints.

Table 1
Toxicity assays used to characterize the physico-chemical nature of toxicants in whole sediments and in the filtered and particulate elutriate fractions obtained. Phase I and III toxicity identification manipulations are also included.

Environmental fractions and sediment samples	Assays
Whole sediments (S1–S10)	<i>D. magna</i> chronic
Filtered elutriates (S1–S10)	Bioluminescence <i>V. fischeri</i> , algal growth, <i>D. magna</i> feeding
Particulate elutriate fractions (S1–S10)	Post-exposure <i>D. magna</i> feeding
Organic extracts (S1–S2)	RYA, EROD
TIE phase I (S2, S3)	
Filtered elutriates	
pH ^a	<i>D. magna</i> feeding
pH neutralization (pH 7) ^b	<i>D. magna</i> feeding
pH neutralization (pH 7) and C18 SPE ^c	<i>D. magna</i> feeding
Particulate elutriate fractions	
S2, S3 ^d	Post-exposure <i>D. magna</i> feeding
S2, S3, EDTA ^e	Post-exposure <i>D. magna</i> feeding
TIE phase III	
pH adjustment (pH 10.5, 11.7) ^f	<i>D. magna</i> feeding
S1 ^g	Post-exposure <i>D. magna</i> feeding
S1, Hg, Cd ^h	Post-exposure <i>D. magna</i> feeding
S1, Hg, Cd, EDTA ⁱ	Post-exposure <i>D. magna</i> feeding

^a pH_i, initial pH, which has 10.5 and 11.7 for S2 and S3, respectively.

^b Adjusted pH 7 with HCl.

^c Elutriate with pH adjusted and fractioned through a C18 solid phase extraction column.

^d Initial toxicity of ASTM water containing 1 or 0.2 g/L of sediment particles of S2, S3, respectively.

^e Co-exposure of treatment (d) with 0.1 mM EDTA.

^f Water spiked with NaOH to reach pHs of 10.5 and 11.7.

^g Exposure water spiked with 0.5 g/L of suspended solids from S1 alone.

^h Treatment (g) spiked with 2 µg/g of Cd and 15 µg/g of Hg.

ⁱ Treatment (h) spiked with 0.2 mM EDTA.

2.4. Elutriate tests

2.4.1. Elutriate preparation

Elutriates were prepared 24 h before the start of the experiments by gently mixing 100 g of fresh sediment to 1 L of ASTM hard water in a 1:10 wet sediment to liquid volumetric ratio during 24 h at 10rpm in a rotatory wheel at 20 °C. A fraction of the sediment–water slurry (200mL) were filtered across a 20 µm staining steel mesh to obtain the fine particulate fraction. The remaining 800 mL of slurry were left to settle for 24 h and the overlaying water was filtered through a glass microfiber (0.7 µm pore size; Whatman GF/F, Maidstone, UK), to obtain the filtered elutriate fraction. Metals (Hg, Cd, Cr, Ni, As, Cu, Zn) and total ammonia in filtered elutriate fractions were analyzed by ICP-MS and using an Orion ammonia electrode (Thermo Scientific, Waltham, MA), respectively. Suspended solids in elutriate particulate fractions were determined following APHA-AWWA-W methods (EF, 1995). Additionally, pH, oxygen and conductivity levels of test solutions were determined at the start and the end of experiments using a WTW Multi 340i handheld meter, as a quality assurance in all aquatic tests.

2.4.2. Bioluminescent bacteria test

For the bioluminescent bacteria inhibition assay the standardized Microtox[®] test (ISO 11348-3: 1998) was performed by triplicate with light measurements at 0 and 15 min in a Microtox[®] Model 500 Toxicity Analyzer (Barata et al., 2008). Bacteria assays were conducted in serial 1:1 (v:v) dilutions in bacteria medium, starting from a 50% dilution of the original filtered elutriate.

2.4.3. Algal growth test

Algal (*Desmodesmus subspicatus*, formerly *Scenedesmus subspicatus*, CCAP 276/20, Cumbria, UK) growth tests were conducted following OECD (201) guidelines following Barata et al. (2008). Each dissolved elutriate fraction was tested at two dilutions, 1.5:0.5 and 1:1 (v:v), in algal medium, corresponding to 7.5% and 5% (w/v) dilutions of the original sediments in water, respectively. Algae were incubated at 23± 2°C under continuous white light (120 µ/Esm²) and kept in suspension by continuous shaking at 60 rpm. The average growth rates were calculated from measurements of chlorophyll absorbance at λ = 650nm in a dual-beam spectrophotometer (Uvikon 941, Kontron Instruments, France) and converted to proportional responses relative to controls.

2.4.4. *Daphnia* bioassays

Bioassays with the grazer *D. magna* were conducted to evaluate sublethal feeding and post-exposure feeding effects of filtered and particle fractions of elutriates, respectively. Feeding

responses to undiluted (10% sediment:water (w/v) dilution of the original mixture) or diluted filtered elutriates (0.2–5%) were assessed in 24 h toxicity tests following Barata et al. (2008). Groups of 5 neonates were exposed to 20 mL of test concentrations in 30 mL borosilicate flasks in the presence of food. *Chlorella vulgaris* was added at a concentration of 5×10^5 cells/ml (equivalent to 1.5 $\mu\text{g C/ml}$). Treatments consisted of an ASTM hard water control and the selected elutriates with five replicates each. Each group of replicates consisted of five vessels with animals and one blank. Blanks were used to assure that initial algal concentrations did not increase significantly over the exposure period.

For the post-exposure feeding assays, *D. magna* neonates were first pre-exposed in groups of 50–60 individuals to particle suspensions (concentrations ranging from 0.01 to 3 g/L) of the studied sediments, in 1 L of ASTM hard water during 24 h in a rotary wheel. After exposure, feeding rates were then measured in groups of 10 individuals in 10 mL of ASTM hard water with 5×10^5 *C. vulgaris* cells/ml. Incubations lasted 4 h and were performed by quintuplicate. Both feeding and post-exposure feeding experiments were conducted in the dark to avoid algal growth. Individual feeding rates (number of algal cells ingested per animal per hour) were determined as the change in cell density during 4–24 h according to the method described by Allen et al. (1995) and converted to proportional feeding rates relative to control. Cell density was estimated from absorbance measurements at $\lambda = 650\text{nm}$ using standard calibration curves based on at least 20 data points ($r^2 > 0.98$).

2.4.5. *In vitro* cell-based tests

Organic solvent fractions were obtained by extracting 4 g of $<60 \mu\text{m}$ sieved freeze-dried sediment with hexane: CH_2Cl_2 (1:1) using a SPLE method at 100 °C and 1500 psi (Petrovic et al., 2001). The final extract was then evaporated under N_2 and resuspended in 2 mL methanol for *in vitro* testing. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-based recombinant yeast assays (AhR-RYA) were performed as previously described (Noguerol et al., 2006 a,b). The YCM1 yeast strain (Miller, 1997) was grown overnight in minimal medium (6.7 g/L) yeast nitrogen base without amino acids plus ammonium sulfate (DIFCO, Basel, Switzerland) supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required and with galactose as a carbon source to express AhR and the cofactor ARNT (Miller, 1997). The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 100 μL aliquots in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNCTM, Roskilde, Denmark; García-Reyero et al., 2001) previously silylated by overnight exposure to an atmosphere of dimethylsilane. A serial dilution scheme based on 1:3 dilution steps using glass microcapillary tubes rather than pipette tips for all liquid transfers, to eliminate contact with plastic surfaces was performed (García-Reyero et al., 2001). Plates were incubated for 4 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 100 μL YPER™ (PIERCETM, Rockford, IL, USA) were

added to each well and further incubated at 30 °C for 30 min. Afterwards, 100 µL of assay buffer supplemented with 0.1% 2-βmercaptoethanol and 0.5% of the 4-methylumbelliferone β-d-galactopyranoside (MuGal) solution (both from the FluorAce™ beta-galactosidase Reporter Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were added to the lysed cells. After brief centrifugation, plates were read in a Victor3 Wallac spectrofluorometer (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, USA), at 355 nm excitation and 460nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 15–20 min (one measurement per min); β-galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary fluorescence units with time, using standard linear regression methods. To test antigand (inhibitory) activity, yeast cultures were incubated for 4 h with 2 µM of β-naphthoflavone, added to a 1:30 dilution of each sample, and processed as before. Samples were tested in triplicate (Noguerol et al., 2006a,b).

The fibroblast RTG-2 cell line derived from rainbow trout gonad was used to study the ability of the different sample solvent extracts to induce EROD activity (Navas et al., 2006). Cells were maintained in minimum essential medium (MEM) containing Earle's salts (EMEM) (Cambrex, North Brunswick, NJ) with phenol red and supplemented with 10% fetal bovine serum (Cambrex), 1% 2mM l-glutamine (Cambrex) and penicillin–streptomycine (10 U/ml to 10 µg/ml, respectively, Cambrex). Cells were grown at 20 °C in 75 cm² Nunclon tissue culture flasks (Nunc, Roskilde, Denmark). Cells were detached from confluent flasks using trypsin (Sigma, St. Louis, MO), seeded in 96-well Falcon plates (Becton Dickinson, Oxnard, CA) at a density of 20,000 cells/ml in 200 µl culture medium per well, and allowed to grow to confluency for 24 h. After that, the medium was substituted with new medium containing a maximal of 0.4 % of the different extracts recuperated in methanol. Following 24 h of treatment, the medium was removed, cells were washed with PBS (pH 7.5), and the plates were frozen by means of liquid nitrogen and kept at –80 °C to facilitate break. After 2 h, analyses of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and protein levels were performed as previously described (Navas et al., 2006).

2.4.6. TIE assessment

A simplified TIE procedure, based on feeding responses of *D. magna*, was applied to samples S2 and S3 (filtered and particle elutriate fractions) according to Table 1. Filtered elutriate fractions from S2 and S3 samples (5% and 2% sediment:water w/v dilution of the original mixture) were tested unmodified (pHi, initial pH), after neutralization with HCl (pH 7), and after pH neutralization and removal of non-polar organic contaminant (solid phase extraction C18 columns, Bond Elut C18, Phenomenex Ltd., Macclesfield, UK). Feeding tests (24 h) were performed following *Daphnia* bioassay section. Particle elutriate fractions (<63 µm particles) from S2 and S3 samples were re-suspended in ASTM water at 1 and 0.2 g/L and tested with and without addition of 0.2mM of EDTA (Barata et al., 2002). Postexposure feeding responses

of *D. magna* individuals were then measured according to *Daphnia* bioassay section. The possibility that dissolved lye and particle bound Cd and Hg could account for the observed elutriate toxicity was further assessed as follows. Firstly, concentrations of OH^- and CO_3^{2-} were determined in filtered elutriates by acid titration methods using HCl (0.0018M). Secondly, the effect of lye was tested determining feeding responses of *Daphnia* juveniles exposed to ASTMwater adjusted to pH 10.5 or 11.7 (initial pH values of S2 and S3 elutriates, respectively) with NaOH. The toxicity of Hg and Cd bound to the particle fraction was assayed by measuring post-exposure feeding responses of *Daphnia* juveniles to sediment particles from the non-toxic S1 sample (freeze-dried and sieved to 100 μm) spiked with Hg (15 $\mu\text{g/g}$) and Cd (1.5 $\mu\text{g/g}$) with and without the addition of 0.2mM EDTA.

2.5. Data analysis

2.5.1. Estimation of median effect concentrations (EC_{50}) and their corresponding 95% CI

Bacteria bioluminescence responses were analyzed in doublelog plots of gamma values (ratio of the light lost at a given time relative to the remaining light) versus elutriate dilution. *In vitro* RYA and EROD cell line responses were analyzed by converting the appropriate biological responses (β -galactosidase and EROD activity, respectively) into β -naphthoflavone equivalents as described (Noguerol et al., 2006a). For *Daphnia* feeding responses, feeding rates were converted to proportions relative to controls and then data were fitted to an allosteric decay function through non-linear regression (Barata and Baird, 2000).

2.5.2. ANOVA analyses

Proportional responses were arcsine transformed; feeding rates, number of offspring and body length values were log transformed to meet ANOVA assumptions of normality and variance homocedasticity (Zar, 1996). Differences in bioassay responses among treatments were compared by one-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test at a $P < 0.05$ significance level. Endpoints included cumulative offspring production and final body length in whole sediment *D. magna* chronic tests, proportional algal growth relative to controls and proportional feeding rates relative to controls in TIE treatments. In the cases in which no complete dose/response curves could be obtained, *Daphnia* feeding rate responses between treatments and controls were compared by one-way ANOVA following by the Dunnett's test.

2.5.3. Cause-effect relationships

Analytical data on organochlorine (Ocl_{sed}) and metals (Me_{sed}) in sediment samples, and on metal levels in filtered elutriates (Me_{elu}) were analyzed by Principal Component Analysis (PCA). Ecotoxicological data (EcoTox) including bacterial, algal and *D. magna* responses were also

studied by PCA to identify patterns of response between whole sediment and elutriate tests and across species. Cause–effect relationships were then determined comparing PCA scores, physico-chemical sediment and *in vitro* cell based responses using Pearson correlation analysis. Since variables were very different and they were not measured using the same scale units, data was first log transformed and then auto-scaled prior to analysis. Values under limit of detection were assigned half of the detection limit. Analyses were performed with the SPSS Statistics 17 package (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Physico-chemical characterization

Physico-chemical parameters of the studied sediment samples denoted substantial differences in fine material ($<63\ \mu\text{m}$), organic matter and ammonia content (Table 2). Values ranked from less than 1% in sample S4 to almost 60% in sample S5 of fine particles in the first case; from <0.4 (in samples S2, S3, and S9) to more than 10% for samples S5, S7, S8 of organic matter. Differences in total soluble ammonia levels in the studied elutriates were of two orders of magnitude (i.e. from 21.71 to 0.25 mg/L in samples S7 and S3, respectively, Table 2). Organic and metallic contaminant sediment load also varied dramatically across sediment samples (Table 2). Bi-plots of loadings and scores of the first two PCA components denoted different patterns of contamination for organochlorine and metallic sediment contaminants (Fig. 2). The first and second PCA components (Ocl_{sed1} , Ocl_{sed2}) explained up to 90% of data variability of organochlorine compounds and showed high positive loadings for PCBs, DDTs and HCHs, HCB, respectively (Fig. 2A). As a result, PCA identified sediments from Flix (S2 and S3), characterized by high amounts of HCH and HCB, others such as S5 showing high levels of aroclor (PCBs) and DDTs, and sediments S1 and S10, containing low concentrations of these compounds (Fig. 2A). For metal levels in sediments, the first and second PCA components (Me_{sed1} , Me_{sed2} , Fig. 2B) distinguished loadings of Cr, As, Cu, Zn from those of Hg, Cd, Ni, respectively. These two components configured three categories of sampled sites: S2 and S3, with high levels of all metals analyzed; S1, with low levels of Hg and Cd but high levels of the rest of metals, and the remaining sites, with relatively low levels of metals (Fig. 2B). Metal levels in filtered elutriates showed a more complex pattern resolving into three sediment categories: (i) high levels of metals but with no Cd or As (S1, S2, and S3), (ii) low metallic content but with relative high amounts of Cd and As (S8, S6, and S7) and (iii) low levels of metals (S4, S5, S9, and S10) (Fig. 2C).

Table 2
Location of sediments, percentage of fine particles (<0.63 µm) and organic matter (OM), metal level and organochlorine residues in sediment and metals and total ammonia (NH₃-N) in filtered elutriates. Abbreviations are explained in the text.

	Latitude N		Longitude E	<63 µm	OM%	Total metal ions in sediments (µg/g)					Total metal ions (µg/L) and ammonia (NH ₃ -N, mg/L) in filtered elutriates									
	S1-S10	S1-S10				Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Hg	NH ₃ -N
S1	41 14 22 51	00 25 58 07	9.9	0.64	118	320	34	124	17	0.4	<0.5	70	118	41	147	1.2	0.2	0.2	2.73	
S2	41 13 54 97	00 31 58 63	15.4	0.2	178	63	41	125	20	0.9	3.0	105	30	15.5	156	0.1	<0.05	0.1	0.33	
S3	41 13 53 22	00 32 22 23	16.2	0.3	306	94	47	127	23	1.4	15.1	193	50	19.4	195	0.1	<0.05	0.1	0.25	
S4	41 14 42 85	00 33 27 14	0.6	2.72	34	23	16	61	8	0.6	2.8	20	9	4.8	121	2.4	0.1	<0.1	4.58	
S5	41 13 34 03	00 32 56 63	59.6	11.6	39	26	30	35	8	0.7	2.7	22	11	6.9	43	2.8	0.1	<0.1	1.83	
S6	41 12 45 33	00 33 13 30	14.2	6.2	37	27	24	75	9	0.6	1.3	20	8	13.9	223	1.6	0.2	<0.1	4.26	
S7	41 10 57 87	00 34 16 35	28.8	10.8	50	32	33	90	11	0.8	1.9	35	13	9.3	126	8.2	0.1	0.1	21.71	
S8	41 05 29 00	00 38 38 51	12.6	13.3	39	24	32	102	11	0.6	1.4	26	10	6.7	261	11.4	0.1	<0.1	11.08	
S9	40 55 20 14	00 29 40 40	15.3	0.1	24	11	8	50	6	0.3	<0.5	11	5	3.0	36	0.7	0.1	<0.1	0.57	
S10	40 42 46 70	00 43 16 63	8.4	0.19	24	19	15	65	11	0.3	<0.5	7	8	5.0	350	3.4	0.1	<0.1	0.64	
Organochlorine levels in sediments (ng/g)																				
	PeCB	HCB	αHCH	βHCH	γHCH	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180	2,4'-DDE	4,4'-DDE	2,4'-DDD	4,4'-DDD	2,4'-DDT	4,4'-DDT	4,4'-DDT	
S1	0.6	3.1	0.1	<0.01	0.3	<0.02	0.7	0.3	0.3	1.6	2.2	16.6	0.4	3.6	0.4	0.4	0.1	0.1	1.7	
S2	1300.0	5569.9	1.7	1.8	0.5	7.3	9.8	10.7	18.0	18.0	25.4	20.3	29.4	260.0	14.0	38.3	7.1	7.1	441.9	
S3	3603.1	1513.7	5.2	4.7	0.7	6.5	9.0	9.0	14.4	14.4	28.6	23.9	38.5	316.3	13.2	56.2	8.2	8.2	482.1	
S4	9.1	231.5	<0.01	0.3	0.0	29.0	15.4	38.5	35.4	144.8	134.2	167.9	1.8	41.9	37.5	45.5	7.4	7.4	353.7	
S5	17.7	124.1	0.6	1.7	0.2	68.6	77.3	292.8	387.9	837.8	1117.2	2919.5	43.7	411.7	565	577.0	1158.3	1158.3	6394.9	
S6	42.2	1290.1	0.2	2.9	0.2	26.1	13.5	18.4	7.4	66.1	57.5	108.7	2.1	21.2	32.1	64.1	36.7	36.7	669.9	
S7	4.3	137.9	0.1	0.9	<0.01	11.5	5.2	7.9	6.3	27.8	30.7	85.2	1.7	29.8	16.5	47.7	18.7	18.7	402.3	
S8	3.4	51.2	0.2	0.8	0.3	9.6	4.7	8.2	8.7	19.7	28.1	27.3	0.9	15.9	13.4	21.9	5.5	5.5	163.1	
S9	0.7	28.4	0.0	0.2	<0.01	1.5	1.0	1.6	2.6	3.7	4.0	5.9	0.5	10.0	5.9	23.8	25.0	25.0	398.8	
S10	<0.03	1.0	0.0	<0.01	<0.01	<0.02	0.2	0.2	<0.02	0.1	0.2	0.2	0.2	2.7	1.9	6.9	0.2	0.2	1.7	

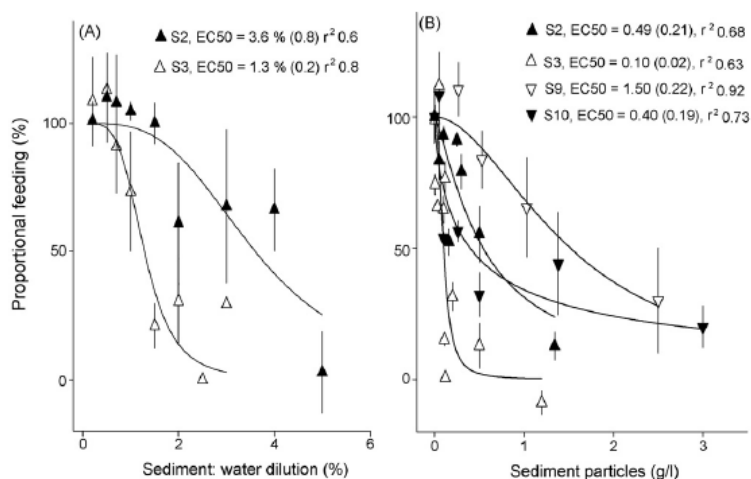


Fig. 3. Feeding responses to filtered elutriates of samples S2 and S3 (A) and to suspended sediment particles of samples S2, S3, S9, and S10 (B). Responses have been fitted to the allosteric regression model. Estimated EC_{50} s (their errors) and r^2 of regression models are also depicted. Elutriate dilution values in graph A are depicted relative to the original mixture sediment:water.

3.2. Toxicological responses

Biological assay responses are depicted in Table 3 and Fig. 3. Whole sediment and elutriate tests with *D. magna* evidenced a strong toxicity of sediments S2, S3 and a moderate one for samples S4, S5, S9 and S10 (Table 3). The observed strong effects on feeding in some samples, allowed modeling elutriate–toxicity responses using a non-linear allosteric regression model (Fig. 3). Interestingly the post-exposure feeding response-suspended sediment particle regression model for S3, predicted strong toxic effects at quite low levels of resuspended sediment particles (<100 mg/L).

Water quality measures in elutriates and whole sediment tests were within acceptable limits (pH of 7.2–8.1, O_2 of 52–100%, conductivity of 380–1100 $\mu\text{S}/\text{cm}$) except for S2 and S3 elutriate samples, with pH values of 9.3–10.5 and 10.1–11.7, respectively. Algal growth than *V. fischeri* tests to elutriate showed a different pattern. In most occasions, algal growth was higher in elutriates than in ASTM hard water, thus denoting none or marginal toxic effects (Table 3). Estimated EC_{50} for *V. fischeri* showed high ($EC_{50} < 0.5\%$ sediment: water dilution of the original mixture) and moderate (<5% sediment: water dilution of the original mixture) toxicity in S3, S6, S7 and S2, S5, S8, S9, S10 samples, respectively (Table 3). Owing to the high dilution of sediments and the buffering capacity of algal and *V. fischeri* medium, pH levels in those tests deviated little from neutrality (pH 7–7.5).

PCA bi-plots of whole sediment and elutriate toxicity tests denoted good relationships (high positive loadings to the first component; EcoTox1) between whole sediment and elutriate *D. magna* responses, whereas algal and *V. fischeri* loadings were only high in the second component (EcoTox2, Fig. 4). As a result the first component separated the most toxic sediment samples to *D. magna* (S3, S2, S10) and the second those in which algal growth was

lower (S1) or which impaired *V. fischeri* bioluminescence (all but S1, S4; Fig. 4). In vitro responses to sediment organic extracts denoted substantial dioxin-like activity in S2, S3, S5 and S8 samples (Table 3).

3.3. Relationships

Pearson correlation coefficients between PCA contaminant scores identified similar distribution patterns for PCBs (Ocl_{sed1}) and the metals Hg, Cd (Me_{sed2}) in sediments; and among organochlorine pesticides (HCH, HCB, DDEs (Ocl_{sed2}) and the metals Cr, Ni, Zn in sediment and filtered elutriates ($Mesed1$, $Meelu1$) (significant $P < 0.05$ positive correlations, Table 4). For the remaining sediment physico-chemical characteristics only total ammonia levels in elutriates were significantly related ($P < 0.05$) with organic matter (0.67) and levels of Cd, As, Zn in elutriates ($Meelu2$; 0.69; Table 4).

Bivariate comparisons between PCA contaminant scores and biological PCA scores or *in vitro* responses denoted significant and inverse relationships of *D. magna* responses (EcoTox1) with organochlorine pesticides (Ocl_{sed2}), and the metals Cr, Ni, Zn in sediment and filtered elutriates (Me_{sed1} , $Meelu1$) (Table 4). These correlations were closely related to the strong toxicity effects of S2, S3 samples (Fig. 5A), as excluding these samples from the analysis resulted in a substantial decrease of the observed relationships, which became non-significant (data not shown, $P > 0.05$). Significant positive relationships in Table 4 included: algal growth or inhibition of *V. fischeri* bioluminescence (EcoTox2) with levels of Hg, Cd (Me_{tot2}); *Daphnia* responses (EcoTox1) with sediment organic matter; and dioxin-like effects (RYA and EROD responses) with levels of PCBs and DDTs ($Ocl1$). The EcoTox2 and $Mesed2$ relationship, however, has to be considered with caution since algae and

Table 3 Toxicological responses to the studied sediments for cumulative offspring produced (offspring) and final body length (length) in whole sediment *D. magna* chronic tests, proportional algal growth relative to controls (%) exposed at 5% and 7.5% sediment:water dilutions; proportional *D. magna* feeding (feeding) and post-exposure feeding (post-exp. feeding) responses relative to controls exposed to 10% sediment: water dilutions or 1g/L suspended sediment particles, respectively; bioluminescence *V. fischeri* (expressed as % dilution of sediment:water of the original mixture); AHR recombinant yeast (RYA) and EROD responses to organic extracts (expressed as µg naphthoflavone equivalents/g sediment).

Sample	offspring		length		algae 5%		algae 7.5%		feeding		post exp. feeding		<i>V. fischeri</i>		RYA		EROD		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
S1	25	1.1	3.40	0.03	c	115.9	16.2	a	33.5	5.2	a	78.2	12.5	nd-nd	> 5	0.02	0.02	0.60	0.40
S2	nd	nd	2.58	0.04	a	233.8	28.4	c	129.2	18.2	b	3.4	0.8	0.75-1.45	β	1.05	0.29	0.84	2.04
S3	nd	nd	2.63	0.03	d	163.3	42.8	bc	56.0	6.8	a	0.02	<0.01	0.10-0.40	β	0.2	0.96	1.65	3.88
S4	18.6	2.1	3.22	0.03	bc	178.8	15.1	b	183.1	18.2	c	43.4	15.0	nd-nd	β	116.4	9.5	0.04	0.03
S5	20.5	2.0	3.18	0.03	bc	282.5	54.3	cd	135.1	20.4	b	63.9	12.5	0.40-5.85	β	1.6	1.38	2.05	2.41
S6	33.4	2.0	3.64	0.03	c	226.4	41.7	c	211.7	18.2	c	127.3	9.3	0.10-0.20	β	0.15	nd	0.72	0.49
S7	21.5	2.2	3.32	0.05	c	240.8	72.5	cd	208.1	30.4	c	118.6	16.0	0.25-0.45	β	0.35	0.09	0.08	0.1
S8	20.5	2.0	3.15	0.03	bc	325.1	29.8	d	258.5	21.4	d	82.5	5.0	1.80-3.70	β	2.35	0.98	4.98	1.66
S9	16.9	1.1	3.09	0.04	b	187.1	12.4	b	151.9	15.5	b	101.5	14.7	1.30-3.40	β	2.6	0.26	0.32	0.4
S10	7.7	0.9	3.00	0.05	b	230.6	17.5	b	134.2	19.5	b	34.3	16.3	nd	β	2.25	nd	0.14	0.04

For offspring produced, algal growth and feeding responses different letters or asterisks indicate significant ($P < 0.05$) differences among groups or between treatment and controls based on ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's post hoc tests, respectively. β estimated values from the regressions depicted in Fig. 3; median effect concentration (EC₅₀); CI, confidence interval; nd, undetermined values.

bacteria assays were performed in filtered elutriates with negligible or undetected levels of Cd and Hg (see Table 2). On the other hand, results depicted in Fig. 5B and C, indicated that the observed correlations between dioxin-like versus PCB (Ocl1) and *Daphnia* performance (EcoTox1) versus organic matter were independent of samples S2 and S3.

Table 4

Bivariate correlation analyses between PCA scores, percentage of fine particles (FS) and organic matter (OM) in sediment, total ammonia levels in elutriates (NH3-N) and *in vitro* AhR (RYA) and EROD responses. For clarity bivariate comparisons between physico-chemical parameters and between the former and biological responses are depicted separately. Ocl_{sed}1, Ocl_{sed}2, Me_{sed}1, Me_{sed}2, Me_{elu}1, Me_{elu}2, EcoTox1, EcoTox2 are first and second PCAs for organochlorine and metal levels in sediments, metals measured in filtrated elutriates, and toxicity bioassays, respectively, n = 10.

	Me _{sed} 1	Me _{sed} 2	Me _{elu} 1	Me _{elu} 2	FS	OM	NH3-N		
Ocl _{sed} 1	0.20	0.81*	0.15	-0.1	0.35	0.48	0.01		
Ocl _{sed} 2	0.82*	0.01	0.83*	-0.22	0.06	-0.45	-0.31		
Me _{sed} 1		0	0.95*	0.15	0.13	-0.17	0.001		
Me _{sed} 2			-0.11	-0.26	0.19	0.36	0.082		
Me _{elu} 1				0	0.07	-0.33	-0.13		
Me _{elu} 2					0.03	0.47	0.69*		
FS						0.30	0.15		
OM							0.67*		
	Ocl _{sed} 1	Ocl _{sed} 2	Me _{sed} 1	Me _{sed} 2	Me _{elu} 1	Me _{elu} 2	FS	OM	NH3-N
EcoTox1	-0.09	-0.88*	-0.67*	-0.21	-0.67*	0.54	-0.03	0.65*	0.45
EcoTox2	0.47	0.02	-0.1	0.69*	-0.25	0	0.34	0.42	0.30
RYA	0.63*	0.22	0.28	0.44	0.19	-0.2	0.53	0.28	-0.13
EROD	0.74*	0.54	0.37	0.48	0.40	-0.13	0.35	0.15	-0.13

* P<0.05.

3.4. TIE assessment

The results depicted in Table 5 suggested that the toxicity of filtered elutriates of sediments S2 and S3 was mainly due to the high pH levels, with only a marginal contribution of 10–20% for organochlorine compounds retained by solid phase C18 extraction. Measured concentrations of OH⁻ and CO₃²⁻ in filtered S3 elutriates were 3.1 and 1.3 mM, respectively. Whereas CO₃²⁻ levels probably reflected the dissociation of bicarbonate ions from the ASTM medium, we attributed the observed high pH values in S3 to industrial lye leached from the factory. As post-exposure feeding inhibition effects of particulate fractions were alleviated or totally suppressed by EDTA, we concluded that most of the toxicity of these fractions were due to particle-bound metals, most likely Hg and Cd (Table 5). Results from TIE III treatments with dissolved lye and particle bound Cd and Hg at concentrations similar to those observed in sediment samples were consistent with these hypotheses (Table 5).

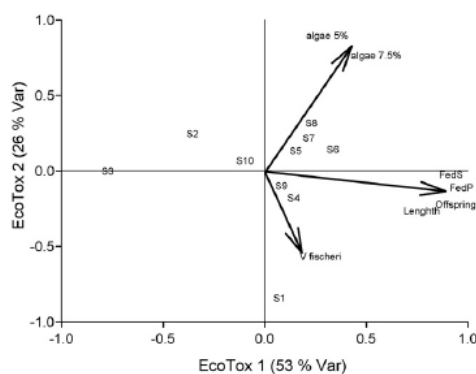


Fig. 4. PCA bi-plots of loadings and site scores for bacteria, algae and *D. magna* responses. Loadings with greater contributions to the PCAs 1 and 2 are indicated with arrows. EcoTox1 and EcoTox2 are first and second PCAs, respectively. For further explanation see text.

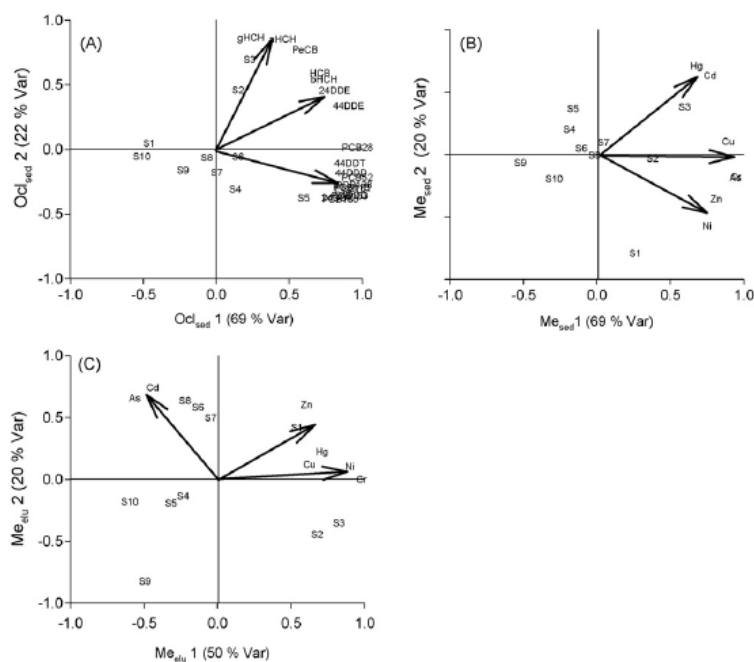


Fig. 2. PCA bi-plots of loadings and site scores for organochlorine (A) and metal (B) levels in sediments, and metals in elutriates (C). Loadings with greater contributions to the PCAs 1 and 2 are indicated with arrows. Ocl_{sed}1, Ocl_{sed}2, Me_{sed}1, Me_{sed}2, Me_{elu}1, Me_{elu}2, are first and second PCAs for organochlorine and metal levels in sediments and metals in elutriates, respectively. The percentage of variance explained by each PC is also depicted. Contaminant abbreviations are explained in the text.

4. Discussion

To correctly assess the toxicity of complex freshwater sediments, a battery of sublethal tests including organisms from different trophic levels and exposure routes should be used (Burton et al., 1989, 1996; Burton, 1991). Moreover, there is an urgent need in sediment ecotoxicology to improve the ecological relevance of assays and/or their ability to discriminate toxic contaminants within sediment exposure routes (Sibley et al., 1997; Burton et al., 2000; Vigano, 2000; Peeters et al., 2001). The first aim of our study was to develop cost effective tests able to assess the toxicity of water-soluble and particle-bound contaminants. With just a few modifications of existing sediment elutriate (EPA, 1994) and sublethal procedures (Mc William and Baird, 2002b), feeding and post-exposure *D. magna* assays allowed to assess the toxicity of water-soluble and particle-bound contaminants, respectively. The amended modifications included a 1/10 instead of a 1/4 sediment: water proportion, 24 h instead of 4 h shaking for elutriate preparation, and the use of feeding and post-exposure *D. magna* feeding for assessing the toxicity of water and suspended sediment particles, respectively. Elutriate assays also included standardized tests performed with the aqueous fraction using *V. fischeri* bioluminescence and algal growth. PCA results considering whole sediment and elutriate toxicity responses across 10 sediment samples gave similar responses within *D. magna* tests regardless of the assay type, and dissimilar response patterns across species. The observed toxicity differences across species are in concert with previous findings (Burton et al., 1989, 1996). The similarities found between whole sediment and elutriate *D. magna* tests support the argument that the selected feeding *D. magna* elutriate test mimics chronic responses to whole sediment

exposures and hence could be used as short and cost-effective surrogate assays instead of chronic whole sediment tests.

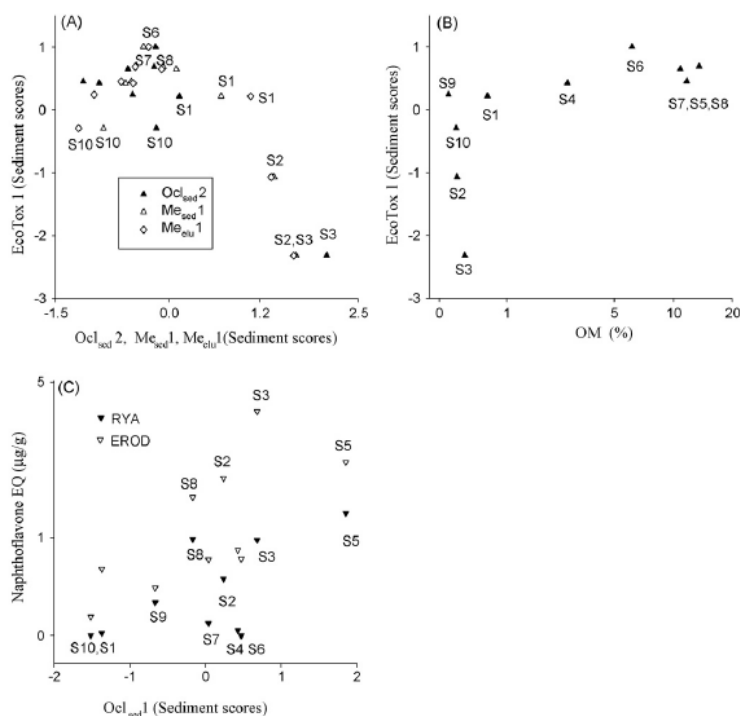


Fig. 5. Plots of PCA scores for toxicity tests (EcoTox I), RYAs and EROD responses versus PCA scores of contaminant levels (Ocl_{sed} 1, Ocl_{sed} 2, Me_{sed} 1, Me_{du} 1) and sediment organic matter (OM) across the studied sediments. For clarity in graphs A and C not all sites are identified. RYA, EROD and OM values are depicted in log_e scale.

The second objective was to characterize toxic components of the studied sediments using TIE sediment approaches and to compare chemical data and toxicity responses (Boxall and Maltby, 1995; Maltby et al., 1995; Ankley et al., 1996; Lebo et al., 2000; Kwok et al., 2005; Wiklund and Dag Broman, 2005). Chemical analyses included compounds that were present at high amounts in chloralkali wastes, including PCB, HCB, DDTs Hg, and Cd (Grimalt, 2006; Eljarrat et al., 2008), as well as other metals (Cr, Ni, Cu, Zn, As) and organochlorine compounds (HCH) that were historically produced or used by both the chlor-alkali industry and agriculture activities occurring in the studied area (Mañosa et al., 2001; Grimalt, 2006).

Toxicity methods included activity assays to detect dioxin-like compounds and a directed TIE interstitial water analysis using *Daphnia* feeding responses to characterize toxic compounds dissolved and bound to sediment particles. Sediment TIE procedures have been recently developed for whole sediment and interstitial water (EPA, 2007). The standard procedure includes three steps. Phase I included six sets of assays: baseline tests to determine the toxicity of unaltered water, aeration test to evaluate volatile, sublutable or easily oxidized toxicants; solid phase extraction test targeted to remove non-polar organic toxicants; EDTA addition test to address cationic metals, Zeolite tests to remove ammonia and graduated pH to evaluate pH dependence of the toxicity. Phase II aims to identify toxicants causing the toxicity observed in

phase I by a combination of chemical analysis and sample fractionation and specific tests for putative toxicants. Finally, phase III intends to confirm phase II results by spiking non-toxic environmental samples with the suspected toxicants at concentrations similar to those observed in the toxic samples (EPA, 2007). In the present study we closely followed this scheme, with the exception of aeration and zeolite sample treatments in phase I TIE, under the consideration that elutriates were aerated when mixing sediment and water and that ammonia content was unrelated with toxicity. Phase II TIE was restricted to chemical analyses of major contaminants and putative bases in filtered water and whole sediment samples, and phase III treatments were limited to show experimentally that the levels of dissolved OH⁻ from lye and of Hg, Cd could account for most of the observed toxicity in filtered elutriates and in particle elutriate fractions, respectively.

Table 5
TIE phase I and III results for filtered and particulate elutriate fractions obtained for S2, S3 sediments. Treatments are listed in Table 1. Results are expressed as proportional *D. magna* feeding (Feeding) and post-exposure feeding (Post-exp. feeding) responses relative to water only treatments. SE, standard error. Different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences following ANOVA and Tukey's post hoc tests. For TIE phase I, a water spiked with EDTA treatment (EDTA only) was also included.

	TIE treatment	Mean	SE	TIE treatment	Mean	SE
Phase I						
Filtered fraction						
Feeding						
	S2			S3		
	Water only	100,0	22,8 a	Water only	100,0	8,0 a
	pHi	30,4	11,2 b	pHi	6,2	3,3 c
	pH 7	81,2	9,2 a	pH 7	75,0	11,0 b
	pH 7, Cl8	104,6	6,3 a	pH 7, Cl8	82,1	8,7 a
Particulate fraction						
Post-exp. feeding						
	Water only	100,0	9,5 a	Water only	100,0	15,5 a
	EDTA only	94,9	12,2 a	EDTA only	105,0	10,2 a
	S2	48,5	6,4 b	S3	31,5	5,4 b
	S2, EDTA	98,7	5,2 a	S2, EDTA	95,7	4,6 a
Phase III						
Water						
Feeding						
	Water only	100,0	8,8 a			
	pH 10,5	40,4	5,1 b			
	pH 11,7	15,3	7,5 c			
Particulate fraction						
Post-exp. feeding						
	Water only	100,0	5,5 a			
	S1	96,9	4,9 a			
	S1, Hg, Cd	32,5	2,9 b			
	S1, Hg, Cd, EDTA	82,1	7,6 a			

Correlation analysis results between organochlorine and metallic PCA scores denoted a close relationship between measured metals in whole sediment samples (Mesed1) and organochlorine pesticides (Oclsed2). Consequently, it was difficult to distinguish which of the two-contaminant classes truly affected *D. magna* responses. Nevertheless, the combination of directed bioassay analysis and a simplified TIE approach identified three major contaminant classes. The toxicity of filtered elutriates was mostly explained by the presence of strong alkaline compounds (lye), metals like Hg and Cd were the major toxicants in sediment particulates, and PCBs constituted the most biologically active compounds in the organic extractable fraction. The production of lye is common in chloralkali plants (Wagstaffe, 1976) and it is likely to constitute a threat to aquatic organisms. Our data indicate that lye disposed in sediments and re-dissolved into water is responsible for most, if not all, toxicity of samples S2 and S3.

Although contradictory results exist on the contribution of particle and dissolved contaminant fraction on the bioavailability/ toxicity of contaminants to aquatic biota (Piol et al., 2006), toxicity of particulate-bound contaminants have been reported for organic and metallic contaminants in different taxa (Taylor et al., 1998; Schlekot et al., 2000; Weltens et al., 2000; Barata et al., 2002; Mc William and Baird, 2002a). Phase I and confirmation phase III TIE treatments of organisms exposed to contaminated sediment particles with and without EDTA evidenced that metals instead of organic contaminants bound to sediment particles inhibited *D. magna* feeding rates. More specifically, in the present study it was reported that 0.1 g/L of resuspended particles from site S3 containing 0.14 and 1.51 µg of Cd and total Hg, respectively (values estimated from metallic contents of Table 2) could have dramatic effects on feeding (50% inhibition). In a previous work, Taylor et al. (1998) and Barata et al. (2002) found that *D. magna* individuals exposed to algae with equivalent levels (2^{-9}) of bound Cd had also dramatic effects on feeding. Although there is little information on the toxicity or/and bio-availability of particle bound Hg (Diez et al., 2008), its distribution across the studied sediment samples and ability to bound to sediment particles and complex with EDTA (Vuceta, 1978; Gagnon and Fisher, 1997), makes it also a good candidate to cause toxicity. Working with another crustacean species, Winger et al. (1993) reported that exposure to whole chlor alkali sediments highly contaminated with Hg (1–27 µg/g Hg dw) inhibited feeding in *Hyalella azteca* individuals. In the present study the most toxic and bio-available form of mercury (methylmercury) was not differentiated from its inorganic forms (Diez et al., 2008). Nevertheless, the fact that treatment with EDTA remove the toxicity of particle-bound metals indicate that, at least at the most contaminated site; Cd^{2+} and Hg^{2+} were likely the main metal species causing biological effects in *D. magna* (Barata et al., 2002).

Different organochlorine compounds present in chlor-alkali plant sediment or soil wastes are known to cause dioxin-like toxicity (Kannan et al., 1998a,b). these included co-planar PCBs and polychlorinated naphthalene (PCN), polychlorinated dibenzo-pdioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs). In the present study there was substantial dioxin-like toxic effect (high AhR yeast and EROD fish cell line activities) at and downstream the chlor-alkali contaminated sediments, activities apparently related to high levels of PCBs. Although specific organochlorine compounds with dioxin-like activity were not analyzed in this study, previous reports from the same area showed that physiological responses to dioxin-like compounds in fish from this area were directly correlated with co-planar PCBs burden (Eljarrat et al., 2008). Furthermore, the reported dioxin-like toxicity of sediments at and downstream the contaminated site is in agreement with reports indicating high organochlorine levels, elevated EROD activities, and induction of CYP1A gene expression in liver from feral carps and barbs collected in the same sections of the Ebro River (Lavado et al., 2006; Quiros et al., 2007). These and previous results indicate a great potential of organochlorine compound wastes coming from the studied chlor-alkali plant to bioaccumulate and become toxic to fish.

5. Conclusions

In summary, results reported in this study provided evidence that elutriate *D. magna* feeding responses can be used as surrogate assays for more tedious chronic whole sediment tests, and that the incorporation of such tests in sediment TIE procedures may improve the ability to identify the toxicity of particle-bound and water-soluble contaminants in sediments. Within the three hazardous classes of contaminants identified in the studied sediments, levels of Cd and Hg bound to sediment particles and those of organochlorine contaminants should be considered to be of environmental concern. Heavy metal ions shows a high potential to move downstream, and affect both benthic and water column organisms under sediment resuspension (Bonnet et al., 2000; Schlegel et al., 2000), a common phenomenon in Mediterranean rivers (Vericat and Batalla, 2006; Négrel et al., 2007). Organochlorine compounds are particularly toxic to vertebrate species (McFarland and Clarke, 1989; Safe, 1993; Monosson, 1999). Both groups of contaminants have a great potential to bioaccumulate through the aquatic food web; there is evidence that their presence is already affecting aquatic life at the lower part of Ebro River (Lavado et al., 2004, 2006; Quirós et al., 2008).

Acknowledgements

This work has been supported by the Spanish Ministry for the Environment, the Spanish Ministry for Science and Innovation (CGL2008-01898/BOS), and the Catalan Water Agency (ACA) of the Generalitat Catalunya. Carme Bosch was founded by a Ph.D. grant I3P-BDP2004 from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

References

- Allen, Y., Calow, P., Baird, D.J., 1995. A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1625–1630.
- Ankley, G.T., Schubauer-Berigan, M.K., Dierkes, J.R., 1996. Application of toxicity identification evaluation techniques to pore water from Buffalo River sediments. J. Great Lakes Res. 22, 534–544.
- APHA-AWWA-WEF, 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Association/American Water Works Association/ Water Environment Federation, Washington, DC.
- ASTM, 1999. Standard methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. E 1706-95b. In: Annual Book of ASTM standards. ASTM, Philadelphia, pp. 65–68.
- Barata, C., Alañón, P., Gutierrez-Alonso, S., Riva, M.C., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2008. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents. Sci. Total Environ. 405, 78–86.
- Barata, C., Baird, D.J., 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of toxicants from measurements on individuals: results from short duration chronic tests with *Daphnia magna* Straus. Aquat. Toxicol. 48, 195–209.

- Barata, C., Markich, S.J., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., 2002. The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. *Aquat. Toxicol.* 61, 143–154.
- Bonnet, C., Babut, M., Ferard, J.F., Martel, L., Garric, J., 2000. Assessing the potential toxicity of resuspended sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1290–1296.
- Boxall, A.B.A., Maltby, L., 1995. The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff. *Water Res.* 29, 2043–2050.
- Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Möder, M., Segner, H., Schuurmann, G., 1999. Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany)—a contribution to hazard assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 164–174.
- Burgess, R.M., Cantwell, M.G., Pelletier, M.C., Ho, K.T., Serbst, J.R., Cook, H.F., Kuhn, A., 2000. Development of a toxicity identification evaluation procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 982–991.
- Burnison, B.K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M.R., Ternes, T., Van Der Kraak, G., 2003. A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2243–2250.
- Burton, G.A., 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1585–1627.
- Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Burnett, L.C., Henry, M., Hinman, M.L., Klaine, S.J., Landrum, P.F., Ross, P., Tuchman, M., 1996. A comparison of sediment toxicity test methods at three Great Lake Areas of Concern. *J. Great Lakes Res.* 22, 495–511.
- Burton, G.A., Pitt, R., Clark, S., 2000. The role of traditional and novel toxicity test methods in assessing stormwater and sediment contamination. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30, 413–447.
- Burton, G.A., Stemmer, B.L., Winks, K.L., Ross, P.E., Burnett, L.C., 1989. A multitrophic level evaluation of sediment toxicity in Waukegan and Indiana Harbors. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1057–1066.
- Burton, G.A., 2002. Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology* 3, 65–75.
- Carrizo, D., Grimalt, J.O., 2006. Rapid and simplified method for the analysis of polychloronaphthalene congener distributions in environmental and human samples by gas chromatography coupled to negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1118 (2), 271–277.
- Diez, S., Barata, C., Raldúa, D., 2008. In: Prasad, M.N.V. (Ed.), *Exposure to Mercury: A Critical Assessment of Adverse Ecological and Human Health Effects. Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health.* John Wiley & Sons, New York, pp. 345–373.
- Dindal, A., Thompson, E., Aume, L., Billets, S., 2007. Application of site-specific calibration data using the CALUX by XDS bioassay for dioxin-like chemicals in soil and sediment samples. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8376–8382.
- Eljarrat, E., Martínez, M.A., Sanz, P., Concejero, M.A., Piñna, B., Quirós, L., Raldúa, D., Barceló, D., 2008. Distribution and biological impact of dioxin-like compounds in risk zones along the Ebro River basin (Spain). *Chemosphere* 71, 1156–1161.
- EPA, 1994. *Methods for Assessing the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Estuarine and Marine Amphipods.* EPA/600/R-94/025. USEPA, Washington, DC.
- EPA, 2007. *Sediment Toxicity Identification Evaluation Procedures. Phases I, II and III. Guidance Document.* EPA/600/R-07/080. USEPA, Washington, DC.
- Fernández, M.A., Alonso, C., González, M.J., Hernández, L.M., 1999. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere* 38, 33–43.
- Gagnon, C., Fisher, N.S., 1997. Bioavailability of sediment-bound methyl and inorganic mercury to a marine bivalve. *Environ. Sci. Technol.* 31, 993–998.

- García-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., De Alda, M.J.L., Barceló, D., Piñna, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152–1158.
- Grimalt, J.O., van Drooge, B.L., et al., 2004. Persistent organochlorine compounds in soils and sediments of European high altitude mountain lakes. *Chemosphere* 54 (10), 1549–1561.
- Grimalt, J.O., 2006. http://mediambient.gencat.cat/cat/ciudadans/informacio_ambiental/Flix/inici.jsp.
- Harkey, G.A., Landrum, P.F., Klaine, S.J., 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1315–1329.
- Hurst, M.R., Balaam, J., Chan-Man, Y.L., Thain, J.E., Thomas, K.V., 2004. Determination of dioxin and dioxin-like compounds in sediments from UK estuaries using a bioanalytical approach: chemical-activated luciferase expression (CALUX) assay. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 648–658.
- Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit, D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, E.J., Hoke, R.A., Landrum, P.E., Norberg-King, T.J., Winger, P.V., 1995. Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: a review of methods and applications. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1885–1894.
- Kannan, K., Imagawa, T., Blankenship, A.L., Giesy, J.P., 1998a. Isomer-specific analysis and toxic evaluation of polychlorinated naphthalenes in soil, sediment, and biota collected near the site of a former chlor-alkali plant. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2507–2514.
- Kannan, K., Watanabe, I., Giesy, J.P., 1998b. Congener profile of polychlorinated/ brominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soil and sediments collected at a former chlor-alkali plant. *Toxicol. Environ. Chem.* 67, 135–146.
- Knezovich, J.P., Harrison, F.L., Wilhelm, R.G., 1987. The bioavailability of sediment sorbed organic chemicals: a review. *Water Air Soil Pollut.* 32, 233–245.
- Kwok, Y.C., Hsieh, D.P.H., Wong, P.K., 2005. Toxicity identification evaluation (TIE) of porewater of contaminated marine sediments collected from Hong Kong waters. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1085–1091.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldúa, D., Martín, R., Porte, C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro river. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 247–257.
- Lavado, R., Ureña, R., Martín-Skilton, R., Torreblanca, A., del Ramo, J., Raldúa, D., Porte, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ. Pollut.* 139, 330–339.
- Lebo, J.A., Huckins, J.N., Petty, J.D., Ho, K.T., Stern, E.A., 2000. Selective removal of organic contaminants from sediments: a methodology for toxicity identification evaluations (TIEs). *Chemosphere* 40, 811–819.
- Maltby, L., Boxall, A.B.A., Forrow, D.M., Calow, P., Betton, C.I., 1995. The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems. 2. Identifying major toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1093–1101.
- Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R., 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro biota and wildlife. *Environ. Monit. Assess.* 71, 187–205.
- McWilliam, R.A., Baird, D.J., 2002a. Application of postexposure feeding depression bioassays with *Daphnia magna* for assessment of toxic effluents in rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1462–1468.
- McWilliam, R.A., Baird, D.J., 2002b. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1198–1205.
- McCarthy, J.F., 1983. Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 559–568.
- McFarland, V.A., Clarke, J.U., 1989. Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ. Health Perspect.* 81, 225–239.

Miller, C.A., 1997. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.* 272, 32824–32829.

Monosson, E., 1999. Reproductive and developmental effects of PCBs in fish: a síntesis of laboratory and field studies. *Rev. Toxicol.* 3, 25–75.

Navas, J.M., Babin, M., Casado, S., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2006. The Prestige oil spill: a laboratory study about the toxicity of the water-soluble fraction of the fuel oil. *Mar. Environ. Res.* 62, S352–S355.

Négrel, P., Roy, S., Petelet-Giraud, E., Millot, R., Brenot, A., 2007. Long-term fluxes of dissolved and suspended matter in the Ebro River Basin (Spain). *J. Hydrol.* 342, 249–260.

Noguerol, T.N., Boronat, S., Casado, M., Raldúa, D., Barcelo, D., Pi ña, B., 2006a. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1012–1019.

Noguerol, T.N., Boronat, S., Jarque, S., Barcelo, D., Pi ña, B., 2006b. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 69, 351–358.

OECD, 1984. Guideline for testing of chemicals. Alga, Growth Inhibition Test, OECD 201.

Otte, J.C., Andersson, C., Abrahamson, A., Olsman, H., Keiter, S., Engwall, M., Hollert, H., Brunström, B., 2008. A bioassay approach to determine the dioxin-like activity in sediment extracts from the Danube River: ethoxyresorufin-O-deethylase induction in gill filaments and liver of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Environ. Int.* 34, 1176–1184.

Pastor, D., Sanpera, C., González-Solís, J., Ruiz, X., Albaigés, J., 2004. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere* 55, 567–576.

Peeters, E.T.H.M., Dewitte, A., Koelmans, A.A., van der Velden, J.A., Den Bestel, P.J., 2001. Evaluation of bioassays versus contaminant concentrations in explaining the macroinvertebrate community structure in the Rhine-Meuse Delta, The Netherlands. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2883–2891.

Petrovic, M., Eljarrat, E., Lopez de Alda, M.J., Barcelo, D., 2001. Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *Trends Anal. Chem.* 20, 637–648.

Phillips, B.M., Anderson, B.S., Hunt, J.W., Thompson, B., Lowe, S., Hoenicke, R., Tjeerdema, R., 2003. Causes of sediment toxicity to *Mytilus galloprovincialis* in San Francisco Bay California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 492–497.

Piol, M.N., López, A.G., Miño, L.A., Dos Santos Afonso, M., Verrengia Guerrero, N.R., 2006. The impact of particle-bound cadmium on bioavailability and bioaccumulation: a pragmatic approach. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6341–6347.

Quiros, L., Pina, B., Solee, M., Blasco, J., Lopez, M.A., Riva, M.C., Barcelo, D., Raldúa, D., 2007. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbas graellsii*: laboratory and field studies. *Chemosphere* 67, 1144–1154.

Quirós, L., Ruiz, X., Sanpera, C., Jover, L., Pi ña, B., 2008. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environ. Pollut.* 155, 81–87.

Ruiz, X., Llorente, G.A., 1991. Seasonal variation of DDT and PCB accumulation in muscle of carp (*Cyprinus carpio*) and eels (*Anguilla anguilla*) from the Ebro Delta, Spain. *Vie et Milieu* 41, 133–140.

Safe, S., 1993. Toxicology, structure–function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ. Health Perspect.* 100, 259–268.

Schlekat, C.E., Decho, A.W., Chandler, G.T., 2000. Bioavailability of particle-associated silver, cadmium, and zinc to the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* through dietary ingestion. *Limnol. Oceanogr.* 45, 11–21.

Schulz, R., Liess, M., 2001. Toxicity of aqueous-phase and suspended particle-associated fenvalerate: chronic effects after pulse-dosed exposure of *Limnephilus lunatus* (Trichoptera). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 185–190.

-
- Sibley, P.K., Legler, D.D., Dixon, D.G., Barton, D.R., 1997. Environmental health assessment of the benthic habitat adjacent to a pulp mill discharge. I. Acute and chronic toxicity of sediments to benthic macroinvertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 274–284.
- Taylor, G., Baird, D.J., Soares, A.M.V., 1998. Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 412–419.
- Vericat, D., Batalla, R.J., 2006. Sediment transport in a large impounded river: the lower Ebro, NE Iberian Peninsula. *Geomorphology* 79, 72–92.
- Vigano, L., 2000. Assessment of the toxicity of River Po sediments with *Ceriodaphnia dubia*. *Aquat. Toxicol.* 47, 191–202.
- Vuceta, J., 1978. Chemical modeling of trace metals in freshwaters: role of complexation and adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 12, 1302–1309.
- Wagstaffe, F.J., 1976. The control of water pollution and the disposal of solid wastes in the industries producing basic inorganic chemicals. *Pure Appl. Chem.* 45, 141–145.
- Weltens, R., Goossens, R., VanPuymbroeck, S., 2000. Ecotoxicity of contaminated suspended solids for filter feeders (*Daphnia magna*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 315–323.
- Wiklund, A.K.E., Dag Broman, B.S., 2005. Toxicity evaluation by using intact sediments and sediment extracts. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 660–667.
- Winger, P.V., Lasier, P.J., Geitner, H., 1993. Toxicity of sediments and pore water from Brunswick Estuary, Georgia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 371–376.
- Zar, J.H., 1996. *Bioestatistical Analysis*. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall International, Inc., New Jersey.

Article 3: Origen i distribució de la contaminació per Hidrocarburs Aromàtics Policíclics en sediments i peixos de la reserva de la biosfera d'Urdaibai (Golf de Biscaia, País Basc, Espanya)

Eunate Puy-Azurmendi, Asunción Navarro, Alba Olivares, Denise Fernandes, Elena Martínez, Miren López de Alda, Cinta Porte, Miren P. Cajaraville, Damià Barceló, Benjamín Piña

L'estuari d'Urdaibai és una reserva de biosfera de la UNESCO impactada per les activitats recreatives, agrícoles i industrials. Els Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs) són els principals contaminants en Urdaibai, i el seu control i la identificació de les seves fonts és fonamental en la preservació de la zona. L'anàlisi química per GCeMS va mostrar una contaminació significativa per hidrocarburs aromàtics policíclics en mostres de sediments d'Urdaibai, principalment de fonts pirolítics, amb contribucions menors de vessaments de petroli. El mesurament de l'activitat tipus dioxina, mitjançant l'ús d'un bioassaig basat en el llevat, va mostrar un excés d'activitat biològica en mostres de sediments de la part interior de la Ria. L'anàlisi de metabòlits de PAH en la bilis de la Llissa vera (*Chelon labrosus*) va mostrar un gran excés de 2-naftol per sobre del 1-naftol i del 1-pirenoel, el que suggereix una contaminació específica en l'interior de l'estuari d'Urdaibai per algun procés industrial. Per tant, la combinació d'aquestes tres tècniques permet definir les diferents fonts de contaminació per PAHs a Urdaibai: un origen pirolític important amb vessaments ocasionals de petroli, i determinades activitats industrials.

Paraules clau: Activitat tipus dioxina, Assaig de Llevat Recombinant, GCeMS, metabòlits PAH.

Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in sediment and fish from the biosphere reserve of Urdaibai (Bay of Biscay, Basque country, Spain)

Eunate Puy-Azurmendi^a, Asunción Navarro^b, Alba Olivares^b, Denise Fernandes^b, Elena Martínez^b, Miren López de Alda^b, Cinta Porte^b, Miren P. Cajaraville^a, Damià Barceló^{b,c}, Benjamín Piña^b

^a Laboratory of Cell Biology and Histology, Department of Zoology and Cell Biology, University of the Basque Country, B_ Sarriena, 48940 Leioa, Basque Country, Spain.

^b Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain.

^c Catalan Institute for Water Research (ICRA), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, Edifici Jaume Casademont, 15, 17003 Girona, Spain.

The Urdaibai estuary is a UNESCO biosphere reserve impacted by recreational, agricultural and industrial activities. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are major pollutants in Urdaibai, and their control and the identification of their sources is central on the preservation of the area. Chemical analysis by GCeMS showed a significant pollution by PAHs in Urdaibai sediment samples, mainly from pyrolytic sources, with minor contributions from oil spills. Measurement of the dioxin-like activity using a yeast based bioassay showed an excess of biological activity in sediment samples from the inner part of the estuary. Analysis of PAH metabolites in bile of thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) showed a large excess of 2-naphthol over 1-naphthol or 1-pyrenol, suggesting a specific contamination in the inner Urdaibai estuary by some industrial process. Therefore, the combination of these three techniques defined different PAH pollution sources in Urdaibai: a major pyrolytic origin, occasional oil spills, and specific industrial activities.

Article history: Received 30 October 2009; Received in revised form 6 April 2010. Accepted 12 April 2010.

Keywords: Dioxin-like activity, Recombinant yeast assay, GCeMS, PAH metabolites

1. Introduction

The estuary of Urdaibai ($43^{\circ}23'N$ - $2^{\circ}41'W$) is located in the Bay of Biscay, in the Northern Iberian Peninsula (Figure 1). It is 13 km long and an average width of 500 m, and presents a limited maritime traffic. The main human activity in the zone is agriculture but a variety of industries can be found such as metallurgic industries, shipyards, treatment of surfaces, dyes and manufacture of cutlery, concentrated in the surroundings of the main town in the area, Gernika-Lumo. Due to its unique landscape and to its good balance between human activities and the natural environment, it was declared a Biosphere's Reserve by UNESCO in 1984.

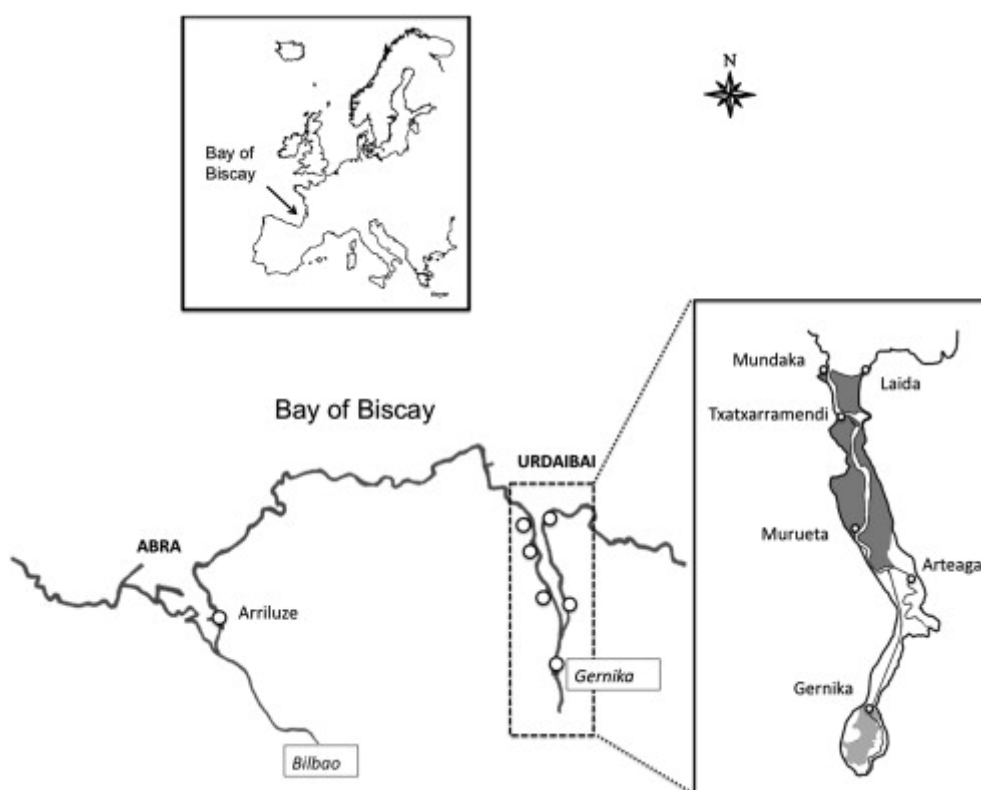


Fig. 1. Map of sampled sites. Sediment samples were collected at four localities inside the Urdaibai estuary (Gernika, Murueta, Arteaga and Txatxarramendi, detailed map on the right), Mundaka, at the river mouth, and Laida, outside the sand barrier limiting the estuary (grey areas in the detailed map). The leisure harbour of Arriluze, in the Abra estuary, was sampled as polluted external site. Fish were sampled only in Gernika and Arriluze. The approximate outline of the main city in Urdaibai, Gernika, is indicated with a discontinuous line at the bottom of the detailed map.

There are several environmental menaces looming over the Urdaibai ecosystem. Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is of special concern, as they can be derived from both human activities (industrial byproducts, incomplete combustion of carburants) or from oil spills, either internal (shipping, carburant handling) or external. In this regard, massive oil spills, like the Prestige spill in 2002, are known to affect the estuary in the recent past (Cortazar et al., 2008; Orbea et al., 2006). Therefore, the continuous surveillance of PAHs pollution and the identification of its possible sources are central on the maintaining of the environmental health of the Urdaibai estuary. The present work addresses these issues using a combination of chemical analyses and bioassays directed to determine PAHs levels and

composition in sediments, evaluate their biological activity, and analyze metabolites diagnostic for their origin and possible sources.

Due to their hydrophobicity, PAHs accumulate both in sediments and in the fat of exposed animals. They are considered hazardous for human health and a number of them are known carcinogenic compounds (Freire et al., 2009; IARC, 1983). PAHs constitute a very extended family of compounds, from which regulatory bodies have defined more or less comprehensive lists of priority compounds. The sixteen compounds listed by the US Environmental Protection Agency (EPA) or the eight ones included by the Water Framework Directive of the European Union (EU WFD) are used to define annual average and maximum allowable concentrations in surface waters (EC, 2008). In contrast, no comparable quality standards for sediments have been defined yet, despite the tendency of these compounds to accumulate in hydrophobic compartments. In this work, we analyze the sixteen EPA PAHs along the Urdaibai estuary to identify areas of accumulation and to infer possible sources.

The carcinogenic effect of different PAHs is a consequence of the ectopic up regulation of the oxidative metabolism in liver and other tissues from vertebrates. This effect is mediated by the binding of the pollutant to the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Gonzalez and Fernández-Salguero, 1998; Shimizu et al., 2000; van der Oost et al., 2003). The capacity of substances or environmental samples to activate the AhR system (the so-called dioxin-like activity, as dioxins are known to bind to AhR with extremely high affinity) can be quantified by a variety of aryl hydrocarbon-responsive reporter assays based on either in vivo animal tests (Willey et al., 1998) or different vertebrate cell lines (Villeneuve et al., 2002). Yeast-based bioassays represent a fast and cheaper alternative, although reports of their use for detection of AhR ligands in environmental samples are still scarce (Boronat et al., 2009; Lee et al., 2005; Murahashi et al., 2007). Yeasts lack AhR or any equivalent receptor, but their genetic make-up can be easily modified to reconstruct at least partially the mammalian pathway (Miller, 1999; Miller, 1997). In the present study, we used a yeast strain expressing the human AhR and the cofactor ARNT to activate a reporter gene (β -galactosidase) upon the presence of AhR ligands in the cell culture (Miller, 1997). In this genetic setup, the production of the reporter gene is diagnostic for the presence of AhR ligands in the medium, and can be quantified as an enzymatic activity with high precision (Noguerol et al., 2006a). With these tools, we determined AhR ligand activity in sediment samples from Urdaibai and compared these values with the observed chemical burden, to evaluate the importance of PAH pollution in the total toxicity of the sediments.

Fish living in PAH-contaminated environments absorb PAHs through the body surface and gills or by ingestion of contaminated sediment or food (Orbea et al., 2006; Raingeard et al., 2006;

Varanasi et al., 1989). In this work, we assessed the exposure to PAHs in the thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*, Mugilidae), a coastal fish present in eastern Atlantic Ocean and abundant in Urdaibai and other estuaries. This species is a good sentinel of human impact, as it feeds mainly on benthic diatoms, algae, small invertebrates and detritus. Direct measure of PAHs in tissues is impaired by the high capacity to metabolize and excrete PAHs of fish liver (Meador et al., 1995). Quantification of PAHs excreted through the bile as conjugated metabolites is a suitable alternative to assess PAHs exposure in fish, both in the field and in laboratory experiments, since bile metabolites can easily be detected with high precision and sensitivity (Escartin and Porte, 1999; Fernandes et al., 2002, 2008 a,b; Yu et al., 1995). This methodology not only allows an estimation of the total PAH burden, but it also reveals information about the composition of this pollution, a central issue in the evaluation of the possible pollution sources.

2. Materials and methods

2.1. Study area and sample collection

Surface sediment samples (one per site) were collected in April 2007, October 2007, and April 2008, in order to explore temporal trends, at six localities within the Urdaibai estuary, from its upstream limit to the mouth (Fig. 1): Gernika, Murueta, Arteaga, Txatxarramendi, Mundaka and Laida. Murueta is a small town in the middle part of the estuary, where a medium size shipyard is placed. Arteaga is a small rural village, whereas Txatxarramendi is a small island in the outer part of the estuary. Mundaka is a small town in the mouth of the Oka River whose main activities are fisheries, agriculture and tourism. Laida is a beach at the mouth of the estuary, opposite Mundaka. For comparison purposes, sediments were also sampled in the leisure harbour of Arriluze, in the Abra estuary in the Basque Coast (43°23'N–3°W, Fig. 1), a site known by its high levels of pollution by PAHs (Cearreta et al., 2004). Surface sediment samples, collected in precleaned amber-glass bottles, were transported to the laboratory in refrigerated containers, and then frozen at –20 °C.

Fish (thicklip grey mullet *C. labrosus*) were sampled at approximately 1 km distance from Gernika-Lumo urban center, near a sewage treatment plant, and in the Arriluze harbor, to compare PAH burden inside and outside Urdaibai. Six animals were captured in each site and campaign (36 animals in total). Fish were anaesthetized by immersion in a saturated solution of aminobenzocaine. Length (29.5 ± 5.5 cm) and weight (395.9 ± 184.6 g) of each fish were recorded, and the bile was taken, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until analysis.

2.2. Analysis of PAHs in sediments

Sediment samples were lyophilized during 48 h (10^{-2} mbar vacuum) (Lioalfa, Telstar, Spain). The freeze-dried material was ground and homogenized using a mortar. Samples were sieved through 500 and 120 μm mesh to obtain an homogeneous sediment material and stored in precleaned glass bottles at -20 °C until extraction. Analysis of PAHs in the sediments was performed as described (Martinez et al., 2004). Sediment samples (1 g) were extracted by ultrasonication with 3×20 mL of a mixture of hexane:dichloromethane (1:1), and the resulting extracts were cleaned-up by solid phase extraction (SPE) using neutral alumina, reconstituted in 250 μL hexane, and the resulting purified extracts were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) with electron impact ionization (70 eV) acquiring 3 characteristic ions per compound. Quantitation, based on peak areas, was performed by the internal standard method using surrogate deuterated standards. This method allows the determination of the 16 EPA PAHs at ng/g levels (limits of detection between 0.1 and 2 ng/g) with satisfactory precision (relative standard deviation calculated from 3 replicates below 20%) and accuracy (recovery percentage above 50% for all compounds except naphthalene (20%) and Benzo[g,h,i]Perylene (47%)). Analysis ($n = 3$) of a certified freshwater harbour sediment material (BCR535) within the sample sequence yielded concentrations matching the certified values with a percentage of error below 12%.

Ratios of the PAH isomers Phenanthrene to Anthracene (Ph/An), Fluoranthene to Pyrene (Fl/Py) and Benzo[a]Anthracene to Chrysene (BaA/Chrys) were calculated as indicators of PAH origin. Values of Ph/An > 50 , Fl/Pyr < 1 and BaA/Chrys < 1 are typical of samples of petrogenic (oil spill) origin, whereas the corresponding ratios of samples originated in combustion processes (pyrolytic) are typically Ph/An < 10 , Fl/Pyr > 1 and BaA/Chrys > 1 (Karacik et al., 2009; Poster et al., 2000 and Webster et al., 2001).

2.3. Recombinant yeast assay

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-based recombinant yeast assays (AhR-RYA) were performed as previously described (Noguerol et al., 2006a and Noguerol et al., 2006b). The YCM1 yeast strain (Miller, 1997) was grown overnight in minimal medium (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids plus ammonium sulfate (DIFCO, Basel, Switzerland) supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required and with galactose as a carbon source to express AhR and the cofactor ARNT (Miller, 1999). The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 100 μL aliquots in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC™, Roskilde, Denmark; (Garcia-Reyero et al., 2001) previously silylated by overnight exposure to an atmosphere of dimethylsilane. We performed a serial dilution scheme based on 1:3 dilution

steps and using glass microcapillary tubes rather than pipette tips for all liquid transfers, to eliminate contact with plastic surfaces (Garcia-Reyero et al., 2001). Plates were incubated for 4 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 100 µL YPER™ (PIERCE™, Rockford, IL, USA) were added to each well and further incubated at 30 °C for 30 min. Afterwards, 100 µL of assay buffer supplemented with 0.1% 2-β mercaptoethanol and 0.5% of the 4-methylumbelliferone β-D-galactopyranoside (MuGal) solution (both from the FluorAce™ beta-galactosidase (Reporter Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were added to the lysed cells. After brief centrifugation, plates were read in a Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 15–20 min (one measurement per min); β-galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary fluorescence units with time, using standard linear regression methods. To test possible inhibitory activity (false negatives), yeast cultures were incubated for 4 h with 2 µM of β-naphthoflavone, added to a 1:30 dilution of each sample, and processed as before. No sample exhibited inhibitory activity high enough to significantly distort the results (not shown). In this particular system, the ratio of false positives is negligible (Miller, 1997 and Noguerol et al., 2006a); several negative controls (wells with only vehicle plus yeast culture) were included in each plate. Samples were tested in triplicate. AhR ligand activity values were calculated as naphthoflavone equivalents, NFEQ, defined as the concentration of β-naphthoflavone required to elicit the same response as the sample in the assay. These values were calculated from dose–response curves by adjusting β-galactosidase values to a first-order Hill equation, as described (Noguerol et al., 2006a), using at least 9 determinations for each value.

2.4. Analysis of PAH metabolites in fish bile

Hydroxylated-PAH metabolites were analyzed by a modification of a previously described method (Escartin and Porte, 1999). Briefly, 100 mg of bile (6 samples per area and sampling campaign) were incubated for 1 h at 40 °C in the presence of 1 ml 0.4 M acetic acid/sodium acetate buffer pH 5.0, containing 2000 U of β-glucuronidase and 50 U of sulfatase. Hydrolyzed metabolites were extracted with 1 ml of ethyl acetate (×3), the extracts recombined and concentrated under a nitrogen stream. Dry residues of bile metabolites were then derivatized by the addition of 100 µl of bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), heated for 1 h at 70 °C, and further reduced under a nitrogen stream. Analyses were carried by gas chromatography–mass spectrometry electron impact mode (GC–MS–EI) in a Fisons GC 8000 Series chromatograph interfaced to a Fisons MD800 mass spectrometer using a 30 m × 0.25 mm internal diameter HP-5MS column crosslinked with 5% PH ME siloxane (Hewlett–Packard, USA). The instrument was programmed from 90 °C to 140 °C at 10 °C min⁻¹

and from 140 °C to 300 °C at 4 °C min⁻¹, using helium at 80 kPa as carrier gas. The injector temperature was 250 °C and the ion source and the analyzer were maintained at 200 °C and 250 °C, respectively. Just prior to sample analysis, calibration curves were performed with reference compounds and operating in selected ion monitoring mode (SIM). Hydroxylated-PAHs were identified by comparison of retention times and spectra of reference compounds. The silylation derivative ions used for monitoring and quantification of hydroxylated-PAHs were: *m/z* 216 and 201 for 1- and 2-naphthol; *m/z* 254 and 165 for 9-fluorenel; *m/z* 266 and 251 for 9-phenanthrol; and *m/z* 290 for 1-pyrenol. Recovery of extraction procedure was higher than 90% for all the compounds tested (1-naphthol, 9-fluorenel and 9-phenanthrol), except for 1-pyrenol which was 85% (Escartin and Porte, 1999). Concentrations are expressed as nanograms per gram of bile.

2.5. Statistics

All statistical calculations, including linear and non-linear regression methods, were performed using the SPSS v. 17 package (SPSS Inc., Chicago, IL) Unless otherwise noted, significance levels were set at $p < 0.05$. Normality of distributions was tested with the Kolmogorov–Smirnov *Z* test. Most variables analyzed showed a non-normal distribution by the *Z* test; therefore, non-parametric test were preferred. In cases in which parametric test were required (e.g., ANOVA plus Tukey's test), they were performed using logarithmic transformants of the data, which followed a normal distribution with uniform variances for all categories tested (*Z*- and Levene's tests).

3. Results and discussion

3.1. PAH levels in sediments

Total PAH levels in Urdaibai sediments varied some 50-fold among sampling sites (Table 1, profiles in Fig. 2A, bars). Except for Mundaka, which showed an extremely high variability, results from the three campaigns were similar for all sites, as revealed by K-means cluster analysis (Fig. 2B). The three sites at the inner part of the Urdaibai stuary showed similar, relatively low PAHs burdens, compared to Txatxarramendi and Arriluze sites (Fig. 2). The two outer sites, Laia and Mundaka showed low PAH burdens comparable to those from the Urdaibai inner sites, except for the October 2007 sample from Mundaka, which we consider directly contaminated with oil (see next paragraph). A similar survey performed in years 2002–2004 recorded PAH levels between 1000 and 10,000 ng/g, with some occasional samples largely exceeding these values (Cortazar et al., 2008). These results suggest that PAH levels remained

essentially identical since at least 2002, suggesting a continuous, chronic contamination by PAHs, not necessarily linked to episodic oil spills.

Analysis of ratios between PAH isomers indicates a mainly pyrogenic origin of PAHs found in Urdaibai sediments (Table 1). Twenty out of 21 samples showed Ph/An ratios well below 10, indicative of a combustion process. Similarly, 14 out of 18 samples showed BaA/Chr ratios over 1, also diagnostic of pyrogenesis (Karacik et al., 2009, Poster et al., 2000 and Webster et al., 2001). In contrast, Fl/Pyr ratios below 1 shown by 11 out of the 21 samples suggest some contribution from oil spills (petrogenic) in at least some of them (Table 1). Petrogenic pollution, albeit never predominant, seemed to be more important in Gernika, Murueta and in the recreational harbor of Arriluze (Table 1), likely from seafaring and occasional oil spills from different sources. The October 2007 sample from Mundaka, which showed the highest PAH contents in all the series, is the only one with a Ph/An ratio close to 50, indicative of petrogenic

Table 1
Concentration (ng/g) of EPA PAHs and isomer ratios in sediments from the Urdaibai estuary.

Area	Site	Sampling date	Naphthalene	Acenaphthylene	Acenaphthene	Fluorene	Phenanthrene	Anthracene	Fluoranthene	Pyrene
Urdaibai, internal	Gemika	Apr-2007	42	1.1	2.7	2.9	22	4.3	11	18
		Oct-2007	214	2.0	4.1	5.0	152	58	47	78
	Arteaga	Apr-2008	n.d.	305	3.1	322	264	79	13	34
		Apr-2007	0.4	10	5.5	55	74	22	217	177
		Oct-2007	0.5	13	6.9	8.5	111	33	137	149
		Apr-2008	n.d.	154	4.5	155	156	57	42	103
	Murueta	Apr-2007	66	805	38	6.7	62	19	18	22
		Oct-2007	101	525	18	7.7	138	52	42	47
Apr-2008		304	181	3.3	145	237	92	38	110	
Apr-2007		102	615	11	126	611	227	1531	741	
Urdaibai, external	Txatxarramendi	Oct-2007	236	966	17	1187	487	188	1020	557
		Apr-2008	n.d.	1649	90	497	696	284	1070	972
		Apr-2007	616	34	5.9	24	96	28	95	114
	Mundaka	Oct-2007	962	9100	609	551	560	13	2075	1552
		Apr-2008	32	19	4.4	11	22	7.9	52	38
		Apr-2007	260	298	1286	125	10	45	160	160
		Oct-2007	147	1286	362	185	30	82	115	114
	Polluted reference	Arriluze	Apr-2007	1002	164	84	240	799	281	683
Oct-2007			230	246	88	215	593	221	50	84
Apr-2008			n.d.	523	145	578	907	300	22	59

n.d., Not detected.

aValues diagnostic for pyrogenic origin of PAHs are marked in bold.

Benzo (a) anthracene	Benzo (b) fluoranthene	Benzo (k) fluoranthene	Benzo (a) pyrene	Chrysene	Indeno (1,2,3-c,d) Pyrene	Benzo (g,h,i) Pyrene	Dibenzo (a,h) anthracene	EPA PAHs	Isomer ratios ^a		
									Ph/An	Fl/Pyr	BaA/Chr
46	58	65	72	45	20	19	4.5	435	5.07	0.63	1.02
232	294	340	296	283	60	61	4.7	2130	2.64	0.60	0.82
449	552	346	345	n.d.	441	15	40	3209	3.33	0.39	
96	113	105	67	69	65	66	10	1153	3.32	1.22	1.39
187	208	240	149	167	99	100	12	1619	3.31	0.92	1.12
318	384	173	166	118	502	122	301	2754	2.74	0.40	2.70
114	133	114	71	74	66	68	10	1687	3.24	0.82	1.55
36	266	307	209	255	97	101	11	2213	2.64	0.90	0.14
424	528	165	232	35	712	68	98	3372	2.58	0.35	12.15
344	374	170	156	170	137	146	21	5482	2.69	2.07	2.03
451	467	244	226	248	1679	185	23	8182	2.58	1.83	1.82
1048	1188	338	474	100	1716	226	258	10607	2.45	1.10	10.52
24	35	45	37	26	34	39	4.1	1257	3.42	0.84	0.95
283	267	64	215	197	149	161	20	16778	42.35	1.34	1.44
42	57	17	11	8.7	2035	1312	925	4593	2.72	1.34	4.88
41	44	53	42	31	35	36	6.4	2634	0.22	1.00	1.33
177	143	192	147	134	43	53	11	3222	0.36	1.01	1.33
27	37	23	30	n.d.	142	n.d.	n.d.	338	3.48	1.03	
817	724	786	597	457	393	498	53	8217	2.85	1.07	1.79
766	675	1322	887	1032	285	401	35	7129	2.68	0.59	0.74
1958	2626	2082	1195	n.d.	1135	n.d.	n.d.	11530	3.02	0.37	

origin (Table 1, Fig. 2A and B). We concluded that this particular sample may have been contaminated by an oil spill, probably a local one. With the exception of this particular sample, our results indicate that most PAHs found in Urdaibai and Arriluze have a pyrolytic origin, with a possible additional contribution from petrogenic hydrocarbons. A similar conclusion was reached in previous reports of PAH contents in Urdaibai sediments (Cortazar et al., 2008) and in the Istanbul Strait (Karacik et al., 2009), both showing PAHs levels and isomeric ratios similar to the ones observed in our study.

3.2. AhR ligand activity in sediments

All samples from Urdaibai sediments were positive for AhR ligand activity, indicating a general contamination by dioxin-like compounds (Fig. 2). Maximal activities corresponded to Txatxarramendi and Arriluze sites, whereas minimal values were found in Mundaka and Laida sites (Fig. 2, continuous line). Differences between samples collected at a given site during the three campaigns were relatively small (less than a factor of two), except for some few exceptions (Fig. 2). K-means clustering of data clearly distinguished the two outer sites (Mundaka and Laia) as the ones with the lowest AhR ligand activity, followed by the three Urdaibai inner sites (Gernika, Arteaga and Murueta). In the same analysis, Txatxarramendi appeared as the most contaminated site, surpassing even the Arriluze site (Fig. 2B). The Abra estuary is much more heavily industrialised than the Urdaibai estuary, having received considerable amounts of industrial, urban and agricultural untreated wastewater for the last 150 years. Since 1980 a sewage treatment plant was set up and the environmental quality of the estuary started a recovery process (Gorostiaga et al., 2004), although levels of pollution by PAHs and other chemicals are still considered very high (Cearreta et al., 2004). Therefore, the presence in Urdaibai of a site with pollution levels similar to (if not even higher than) those from the Arriluze site, both in terms of chemical content and biological activity, argues for the requirement for a stricter control of pollution in the Urdaibai estuary, generally regarded as a preserved area.

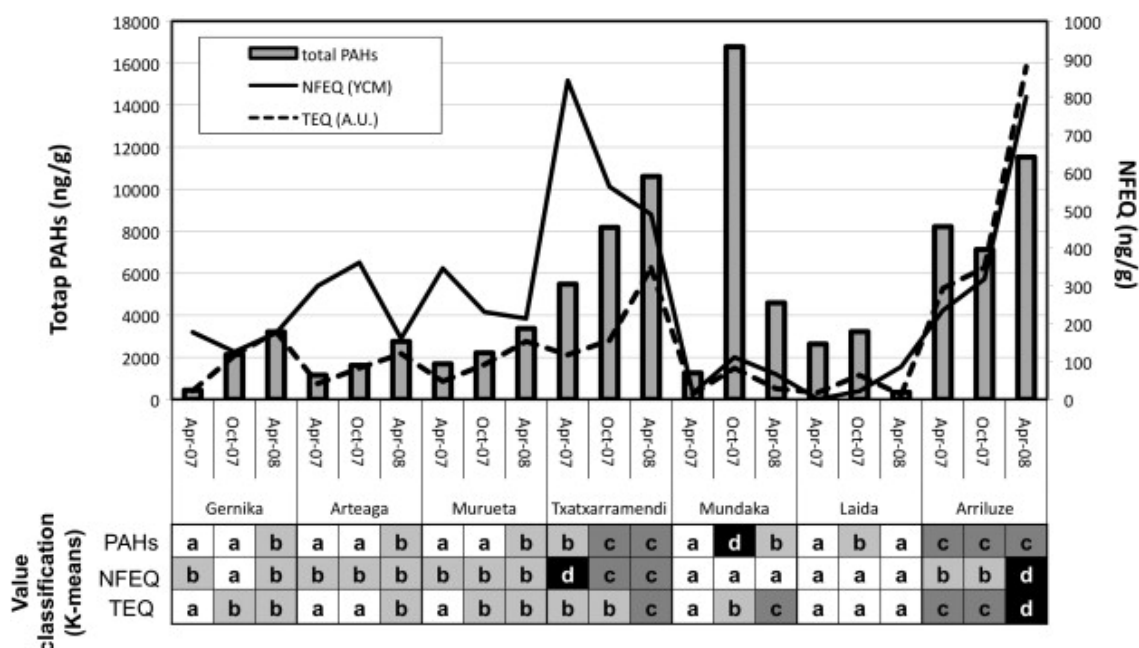


Fig. 2. (A) Profiles of EPA PAHs contents (bars, left axis), AhR ligand activity in NFEQ (β -naphthoflavone equivalents, calculated by AhR-RYA; continuous line, right axis) and predicted TEQ values (discontinuous line, arbitrary units) in sediment samples from 6 localities in Urdaibai and from Arriluze, taken during three consecutive campaigns. (B) Value classification by K-means clustering (4 groups). Letters from "a" to "d" indicate samples belonging to statistically differentiated clusters ordered by increasing average (centroid) values; shadows of gray indicate the degree of pollution, from the cleanest cluster (white, labeled "a") to the most contaminated one (black, labeled "d").

Comparison between AhR ligand activity and PAH burden profiles showed some significant similarities as well as differences. For example, both profiles show an increasing tendency from the innermost Urdaibai site, Gernika, to Txatxarramendi, close to the mouth of the estuary (Fig. 2A and B, map in Fig. 1). This last site showed values for both parameters comparable to the ones from the polluted Arriluze site in both profiles. In contrast, Mundaka and Laida showed a rather poor correlation between chemical and bioassay data, especially for the Mundaka site. In both cases, the observed low AhR ligand activity was at variance with their relatively high PAH burden. These discrepancies were diminished when the chemical data was converted to predicted dioxin-like activity, measured as TCDD equivalents (TEQ, Fig. 2, discontinuous line), using relative effector potency (REP) values previously defined for AhR-RYA (Murahashi et al., 2007). By comparing the three profiles in Fig. 2, we concluded that sediment samples from Mundaka and Laida were particularly poor in biologically active PAHs. This was particularly significant for the very highly polluted October 2007 Mundaka sample, which shows very low biological activity. Conversely, most samples from the estuary, from Gernika to Txatxarramendi, may contain some unidentified AhR ligand to explain their higher than predicted dioxin-like activity in the AhR-RYA assay (Fig. 2).

AhR ligand activity values showed strong positive correlation with the concentration of two groups of individual PAHs: The three-ringed Phenanthrene and Anthracene as one group and

the four-ringed Benzo[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene and Benzo[a]pyrene as the second one (Table 2). Most of these compounds are known to bind the human AhR and to activate AhR-regulated genes, both *in vitro* and *in vivo* (Murahashi et al., 2007, Villeneuve et al., 2002 and Willey et al., 1998). Consistently, we found a good correlation between AhR-RYA results and the predicted TEQ values (Table 2). These results therefore indicate that a substantial fraction of the total AhR ligand activity present in Urdaibai sediments can be explained by their contents in the 16 EPA PAHs.

Table 2
Spearman's rank correlation between AhR ligand activity and concentration of PAHs in Urdaibai samples.

	<i>Rho</i>	<i>Sigma</i> ^a	<i>n</i>
Naphthalene	-0.31	0.249	16
Acenaphthylene	0.27	0.241	21
Acenaphthene	0.13	0.563	21
Fluorene	0.27	0.239	21
Phenanthrene	0.65	0.002***	21
Anthracene	0.55	0.010*	21
Fluoranthene	0.17	0.457	21
Pyrene	0.23	0.328	21
Benzo (a) anthracene	0.64	0.002***	21
Benzo (b) fluoranthene	0.62	0.003***	21
Benzo (k) fluoranthene	0.57	0.008**	21
Benzo (a) pyrene	0.52	0.015*	21
Chrysene	0.42	0.081	18
Indeno (1,2,3-c,d)pyrene	0.39	0.084	21
Benzo (g,h,i) perylene	0.43	0.069	19
Dibenzo (a,h) anthracene	0.26	0.276	19
EPA PAHs	0.34	0.130	21
TEQ	0.64	0.002***	21

^a Two-tailed significance level. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

3.3. PAH metabolites in fish bile

Levels of PAH hydroxylated metabolites in bile of fish captured in Urdaibai and in Arriluze reflected the relative concentration of PAHs found in the sediments from both sites (Fig. 3A). Fish collected in Arriluze showed values of PAH metabolites in bile (734–4079 ng/g of bile) about three times higher than those from Gernika (283–1616 ng/g), although the variation between the three campaigns makes difficult to draw definite conclusions (Fig. 3A). The general tendency for both sites was a decrease in OH-PAHs throughout the sampling seasons, especially in Gernika (Fig. 3A). Metabolite profiles differed in both sites, suggesting different sources of PAHs. For example, 2-naphthol was the dominant PAH metabolite detected (38–71%) in fish from Gernika, whereas in fish from Arriluze the major metabolite detected was of 1-pyrenol (52–92%) (Fig. 3B). 1-Pyrenol is considered a key PAH metabolite in fish bile to monitor PAH exposure (Ruddock et al., 2002); consistently, its concentration in bile was significantly higher in fish from Arriluze than from Urdaibai (Mann–Whitney U test plus Bonferroni correction, $p = 0.001$). Conversely, levels of 2-naphthol were higher in Gernika than in Arriluze (Mann–

Whitney *U* test plus Bonferroni correction, $p < 0.001$). Both 1-naphthol and 2-naphthol originate from naphthalene at very similar ratios through a 1,2 epoxy intermediate (Varanasi et al., 1989 and Yang et al., 1999), and significant imbalances in their relative concentrations are attributed to contamination from other sources unrelated to PAH metabolism, at least for human urine

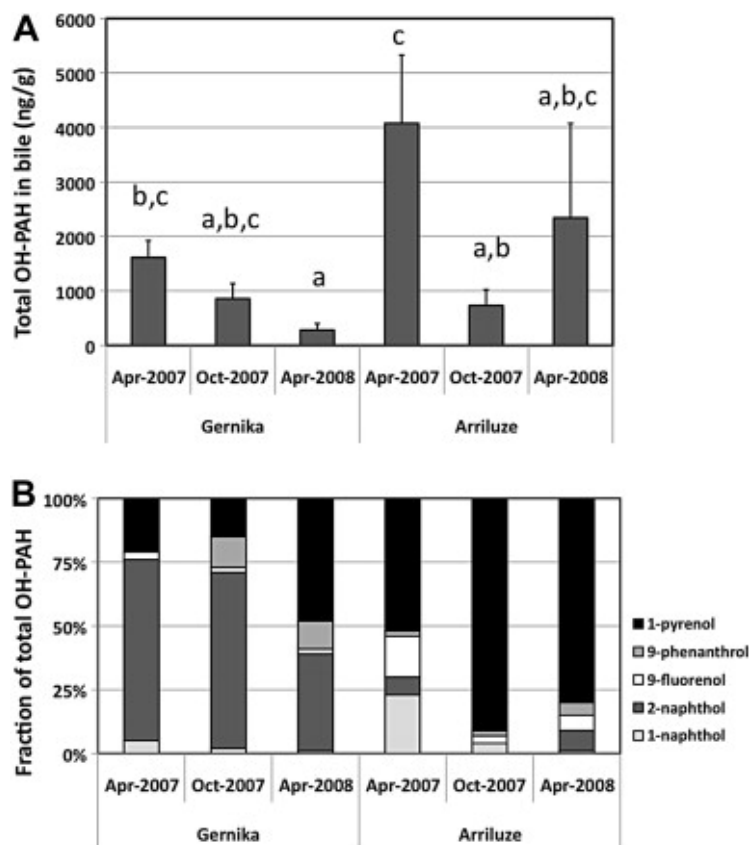


Fig. 3. (A) Biliary levels of hydroxylated-PAHs detected in thicklip grey mullets collected in Gernika and Arriluze. Bars indicate total OH-PAHs content. SEM values are represented by lines. Letters correspond to homogeneous subsets of data (ANOVA plus Tukey's test, logarithmic transformants). (B) Relative contributions of different hydroxylated metabolites to the total hydroxylated-PAH contents in bile. Samples are identical to that of Fig. 3A.

(Meeker et al., 2007 and Serdar et al., 2003). Although it is possible that the ratios of synthesis and/or excretion of the two isoforms may differ between the two examined mullet populations, the almost 40-fold excess of 2-naphthol over 1-naphthol in the Gernika population (but not in the Arriluze population) argues for a specific contamination by some industrial process liberating 2-naphthol or a precursor substance. The fact that 2-naphthol made up to 70% of total biliar OH-PAHs in Gernika fish (Fig. 3B) also argues for a specific source of this compound.

Biliary levels OH-PAHs in grey mullet were 3 to 45-fold higher than those detected in bile of *Trisopterus luscus*, a benthoplagic fish, collected along the inner shelf of the Basque coast (Fernandes et al., 2008a), suggesting a significantly higher anthropogenic pressure in the reserve of Urdaibai compared to the coastline. OH-PAHs levels found in grey mullet from Urdaibai were also similar or even higher than those detected in *Mullus barbatus* (91–1589 ng/g of bile) from the NW Mediterranean coast (Escartin and Porte, 1999). Direct comparison between different fish species is always difficult due to differences in habitat, metabolism and diet. This notwithstanding, the data suggest a significant contamination by PAHs in the Urdaibai endogenous fish population compared to the one observed in fish population from the coast, in line with our data on PAHs content and dioxin-like activity.

3.4. General discussion and conclusions

Sediments from Urdaibai showed a significant contamination by PAHs, particularly at the outer locality of Txatxarramendi. This site showed PAH levels comparable to those found in Arriluze, located in the neighbouring highly polluted Abra estuary. Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Txatxarramendi show a high prevalence of oocyte atresia in developing or ripe bivalves (Puy-Azurmendi et al., in press), a condition that has been experimentally linked to exposure to petroleum hydrocarbons (Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville, 2006). These results were a first indication that levels of PAHs and other pollutants in Urdaibai may be exceeding tolerance levels for at least some animal species.

The origin of PAHs in Urdaibai and Arriluze seems to be mainly pyrolytic, with some contribution of petrogenic sources in Gernika, Murueta and Arriluze. Comparison between chemical data with predicted and observed dioxin-like activity values defined different subsets of samples. Sampling points with a strong marine influence, like Mundaka and Laida, showed a low proportion of dioxin-like PAHs, although their total PAH burden was similar to (or even higher than) that of other samples with much stronger dioxin-like activity. Conversely, many samples from inside the estuary presented dioxine-like activity values higher than predicted by their content in PAHs, suggesting a contribution of dioxin-like compounds from other sources unrelated to PAH pollution. Finally, relative concentrations of 1-pyrenol, 1-naphthol and 2-naphthol in fish bile could indicate a specific industrial impact in Gernika relative to Arriluze, which may be related to the excess of dioxin-like activity observed in the inner Urdaibai samples. We conclude that PAHs are responsible for at least a substantial part of the AhR ligand activity we observed in the AhR-RYA assay, consistently with their property of being powerful AhR ligands. The substantial amounts of PAH metabolites found in bile of fish from Gernika and Arriluze confirms recent exposure to PAHs, although their actual physiological impact remains to be elucidated.

Acknowledgements

This work was supported by Catedra UNESCO of the University of the Basque Country (UPV/EHU) through the project DERBiUr (UNESCO06/19), by the Basque Government through the project ETORTEK-IMPRES and a grant to consolidated research groups (GIC07/26-IT-393-07), and by the Spanish Ministry for Science and Innovation (CGL2008-01898/BOS, CGL2007-64551/HID and Consolider-Ingenio 2010 CSD2009-00065). Denise Fernandes acknowledges a postdoc fellowship (SFRH/BPD/34289/2006) from the Portuguese Fundação para a Ciência e

Tecnologia (FCT) of the Ministry of Science and Technology of Portugal. We greatly acknowledge the help of Dr. Maren Ortiz-Zarragoitia in coordinating the samplings and of all the students in the Laboratory of Cell Biology and Histology of the University of the Basque Country that participated in samplings.

References

Boronat, S., Garcia-Reyero, N., Fonts, R., Fernández, P., Grimalt, J., Piña, B., 2009. Biological activity of aryl hydrocarbon receptor ligands in sediments from remote European lakes. *Freshwater Biol.* 54, 2543e2554.

Cearreta, A., Irabien, M.J., Pascual, A., 2004. Human activities along the Basque coast during the last two centuries: geological perspective of recent anthropogenic impact on the coast and its environmental consequences. In: Borja, A., Collins, M. (Eds.), *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country*. Elsevier BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 27e50.

Cortazar, E., Bartolome, L., Arrasate, S., Usobiaga, A., Raposo, J.C., Zuloaga, O., Etxebarria, N., 2008. Distribution and bioaccumulation of PAHs in the UNESCO protected natural reserve of Urdaibai, Bay of Biscay. *Chemosphere* 72, 1467e1474.

EC, 2008. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. In: Commun, O.J.E. (Ed.). *European Parliament and Council*, Brussels, pp. 84e97.

Escartin, E., Porte, C., 1999. Assessment of PAH pollution in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 1200e1206. Fernandes, D., Andreu-Sanchez, O., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008a. Assessment of pollution along the Northern Iberian shelf by the combined use of chemical and biochemical markers in two representative fish species. *Environ. Pollut.* 155, 327e335.

Fernandes, D., Potrykus, J., Morsiani, C., Raldua, D., Lavado, R., Porte, C., 2002. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality in two low-stream rivers (NE Spain). *Environ. Res.* 90, 169e178. Fernandes, D., Zanuy, S., Bebianno, M.J., Porte, C., 2008b. Chemical and biochemical tools to assess pollution exposure in cultured fish. *Environ. Pollut.* 152, 138e146.

Freire, C., Abril, A., Fernandez, M.F., Ramos, R., Estarlich, M., Manrique, A., Aguirre, A., Ibarluzea, J., Olea, N., 2009. Urinary 1-hydroxypyrene and PAH exposure in 4-year-old Spanish children. *Sci. Total Environ.* 407, 1562e1569.

Garcia-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1152e1158.

Gonzalez, F.J., Fernández-Salguero, P., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab. Dispos.* 26, 1194e1198.

Gorostiaga, J.M., Borja, A., Díez, I., Francés, G., Pagola-Carte, S., Sáiz-Salinas, J.I., 2004. Recovery of benthic communities in polluted systems. In: Borja, A., Collins, M. (Eds.), *Oceanography and Marine Environment of the Basque Country*. Elsevier BV, Amsterdam, The Netherlands, pp. 549e578.

IARC, 1983. Polynuclear aromatic compounds, Part 1, chemical, environmental and experimental data. In: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenicity Risk of Chemical to Humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Karacik, B., Okay, O.S., Henkelmann, B., Bernhöft, S., Schramm, K.W., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons and effects on marine organisms in the Istanbul Strait. *Environ. Int.* 35, 599e606.

Lee, B.-C., Shimizu, Y., Matsuda, T., Matsui, S., 2005. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different size fractions in deposited road particles (DPRs) from lake Biwa area, Japan. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7402e7409.

Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143, 79e165.

Meeker, J.D., Barr, D.B., Serdar, B., Rappaport, S.M., Hauser, R., 2007. Utility of urinary 1-naphthol and 2-naphthol levels to assess environmental carbaryl and naphthalene exposure in an epidemiology study. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.* 17, 314e320.

Miller, C., 1999. A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 297e303.

Miller 3rd, C.A., 1997. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J. Biol. Chem.* 272, 32824e32829.

Murahashi, T., Watanabe, T., Kanayama, M., Kubo, T., Hirayama, T., 2007. Human aryl hydrocarbon receptor ligand activity of 31 non-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons as soil contaminants. *J. Health Sci.* 53, 715e721.

Noguerol, T., Boronat, S., Jarque, S., Barceló, D., Piña, B., 2006a. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *TALANTA* 69, 349e358. Noguerol, T.N., Boronat, S., Casado, M., Raldua, D., Barcelo, D., Pina, B., 2006b.

Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1012e1019.

Orbea, A., Garmendia, L., Marigomez, I., Cajaraville, M.P., 2006. Effects of the 'Prestige' oil spill on cellular biomarkers in intertidal mussels: results of the first year of studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 306, 177e189.

- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers of exposure and reproduction-related Effects in mussels exposed to endocrine disrupters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 361e369.
- Poster, D.L., De Alda, M.J.L., Wise, S.A., Chuang, J.C., Mumford, J.L., 2000. Determination of PAHs in combustion-related samples and in SRM 1597, complex mixture of PAHs from coal tar. *Polycycl. Arom. Compd.* 20, 79e95.
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Kuster, M., Martínez, E., Guillamón, M., Domínguez, C., Serrano, T., Barbero, M.C., Alda, M.L.D., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P. An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Mar. Environ. Res.*, in press, doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.003.
- Raingear, D., Cancio, I., Cajaraville, M.P., 2006. Cloning and expression pattern of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*. *Mar. Environ. Res.* 62, S113eS117.
- Ruddock, P.J., Bird, D.J., McCalley, D.V., 2002. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in three species of fish from the Severn Estuary. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 97e105.
- Serdar, B., Waidyanatha, S., Zheng, Y.X., Rappaport, S.M., 2003. Simultaneous determination of urinary 1- and 2-naphthols, 3- and 9-phenanthrols, and 1-pyrenol in coke oven workers. *Biomarkers* 8, 93e109.
- Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T., 2000. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl Hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 779e782.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57e149.
- Varanasi, U., Reichert, W.L., Le Eberhart, B.T., Stein, J.E., 1989. Formation and persistence of benzo a pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of English sole (*Parophrys vetulus*). *Chem. Biol. Interact.* 69, 203e216.
- Villeneuve, D.L., Khim, J.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 2002. Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxinlike and estrogenic responses in three cell lines. *Environ. Toxicol.* 17, 128e137.
- Webster, L., Fryer, R.J., Dalgarno, E.J., Megginson, C., Moffat, C.F., 2001. The polycyclic aromatic hydrocarbon and geochemical biomarker composition of sediments from voes and coastal areas in the Shetland and Orkney Islands. *J. Environ. Monitor.* 3, 591e601.
- Willey, J.J., Stripp, B.R., Baggs, R.B., Gasiewicz, T.A., 1998. Aryl hydrocarbon receptor activation in genital tubercle, palate, and other embryonic tissues in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive lacZ mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 33e44.

Yang, M., Koga, M., Katoh, T., Kawamoto, T., 1999. A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 36, 99e108

Yu, Y., Wade, T.L., Fang, J., McDonald, S., Brooks, J.M., 1995. Gas chromatographic mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in Antarctic fish (*Notothenia gibberifrons*) injected with diesel fuel. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29, 241e246.

**IV.2 CAPÍTOL 2: Aplicació de l'Assaig de
llevats recombinant per a la determinació de
contaminació amb activitat tipus dioxina
associada al particulat de l'aire**

Article 4: Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assay

Alba Olivares, Barend L. van Drooge, Pascual Pérez Ballesta, Joan O. Grimalt, Benjamin Piña.

L'activació ectòpica del Receptor d'hidrocarburs Aril (AHR), també coneguda com l'activitat similar a dioxina, és un component important de la toxicitat associada als hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs). Per tal de caracteritzar aquest tipus d'activitat en l'aire ambient, es va filtrar el particulat de l'aire a través de filtres PM₁₀ i, seguidament, es va combinar la determinació química de la concentració de PAHs amb la mesura de la seva activitat biològica mitjançant un bioassaig basat en llevat (RYA). Les mostres van ser recollides en una zona semirural del nord d'Itàlia entre setembre de 2008 i febrer de 2009. El total del PAH que contenen oscil·len entre 0,3 ng/m³ i 34 ng/m³ i correlacionen tan amb les variacions estacionals de les condicions meteorològiques com amb els processos de combustió. Els valors d'activitat tipus dioxina en mostres d'aire van mostrar una excel·lent correlació ($0,71 < R^2 < 0,86$) amb les concentracions de PAHs observades i amb els equivalents de toxicitat prevists segons les concentracions de PAHs. El bioassaig RYA utilitzat en aquest estudi proporciona un mètode simple i de baix cost, com a control rutinari per a les emissions tòxiques de PAHs, fins i tot capaç de detectar les concentracions de PAHs que presenten les mostres amb menor quantitat.

Paraules clau: Hidrocarburs Aromàtics Policíclics, Contaminació Atmosfèrica, Receptor d'hidrocarburs d'Aril, Assaigs de Llevat Recombinant, Determinació combinada de PAHs, Composició i activitat AhR.

Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assay

Alba Olivares ^a, Barend L. van Drooge ^a, Pascual Pérez Ballesta ^b, Joan O. Grimalt ^a, Benjamin Piña ^a.

^a Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDÆA-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona. Catalonia. Spain

^b European Commission – Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability. TP-441, 21027 Ispra (VA) Italy

Ectopic activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), also known as dioxin-like activity, is a major component of the toxicity associated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Filtration of ambient air particulate matter through PM₁₀ filters followed by chemical determination of PAH concentrations and a yeast-based bioassay (RYA) were combined to evaluate and characterize dioxin-like activity in ambient air. Samples were collected in a semirural area of Northern Italy between September 2008 and February 2009. Total PAH contents ranged between 0.3 ng/m³ and 34 ng/m³ and were in correlation with seasonal variations of meteorological conditions and combustion processes. Dioxin-like activity values in air samples showed an excellent correlation ($0.71 < R^2 < 0.86$) with the observed PAH concentrations and the predicted toxicity equivalents for PAH. This RYA-bioassay reported in the present study provides a simple and low-cost routine control for toxic PAH emissions, even at background air concentration levels.

Article history: Received 9 June 2010. Received in revised form 31 August 2010. Accepted 17 September 2010.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Air pollution; Aryl hydrocarbon receptor; Recombinant yeast assays; Combined determination of PAH; composition and AhR activity

1. Introduction

Causal relationships between exposure to atmospheric particulate matter (PM) and human adverse health effects have been established (Pérez et al., 2009; Pope et al., 2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) constitute a substantial fraction of the toxicity associated to PM in ambient air, due to their characteristic carcinogenic and mutagenic properties (Boström et al., 2002). These compounds are permanently formed by all sorts of incomplete combustion processes, such as biomass (Oros and Simoneit, 2001) or fuel combustion in vehicles (Rogge et al., 1993). Air quality standards have been implemented to safeguard human health against the adverse effects of PAH and, specifically, benzo[a]pyrene (Council Directive, 2005; EPA, 1993).

Several studies have shown that a substantial proportion of PAH toxicity, including carcinogenesis, is mediated by their interaction with the mammalian AhR (Nebert et al., 2000; Shimizu et al., 2000a,b), a key regulator of phase I and II metabolic enzymes (Nebert et al., 1993; Hankinson, 1995; Gonzalez and Fernández-Salguero, 1998; Shimizu et al., 2000a,b). The ectopic activation of the AhR controlled genes is known as dioxin-like activity, because dioxins range among their most powerful known agonists having affinity constants at the pM range (Misaki et al., 2007).

Assays to identify AhR activation and subsequent signal transduction are useful to monitor pollution loads in environmental samples (Fent, 2003). Genetically modified yeast strains have become common tools to detect exogenous ligands for different receptors. These tools have been applied to detect and quantify the presence of receptor-binding activity in the environment and to screen for new putative receptor-binding substances among the ever-increasing number of new chemical compounds introduced into the market every year (Andersen et al., 1999; Bovee et al., 2004; Coldham et al., 1997; Garcia-Reyero et al., 2001). These systems, also known as recombinant yeast assays (RYA), do not provide a precise chemical characterization of the hormone-receptor ligands, but their low cost and handling easiness makes them a first choice when testing large numbers of ill-characterized samples or compounds (Brix et al., 2010).

In the present study, the total dioxin-like activity in PM₁₀ filter samples was measured and compared with compositional and chemical data on ambient air PAH concentrations from the same samples in order to evaluate the sensitivity of the RYA-bioassay. For this purpose, ambient air PM₁₀ filter samples were collected from September 2008 to February 2009 in a semirural area in northern Italy, south of the Alps. This area is characterized by a large seasonal gradient of PAH concentrations in ambient air PM₁₀ which are related to variations in combustion processes (traffic emissions and wood combustion; van Drooge et al., 2009) and meteorological conditions. Combustion related compounds, such as PAH, range therefore

among the most abundant atmospheric pollutants. Given the strong implication of dioxin-like compounds for human health, the RYA method may provide a comprehensive protocol for AhR load routinely testing in ambient air.

2. Method and materials

2.1. PAH in ambient air PM₁₀

A detailed description of the analytical method for PAH quantification by thermal-desorption gas chromatograph coupled to a mass spectrometry has been published elsewhere (van Drooge et al., 2009; van Drooge and Pérez Ballesta, 2009). For RYA analysis, a selection of available filter aliquots covering the entire PAH₁₄ concentration range from 0.3 ng/m³ to 34 ng/m³ was chosen (Table 1; van Drooge and Pérez Ballesta, 2009). Nineteen samples, with sample volumes ranging from 44 m³ to 55 m³, were extracted by sonication with a mixture of dichloromethane and methanol (Merck Darmstadt, Germany) (2:1 v/v; 2:20 mL; 20 min). The total extract was filtered on a filter syringe containing a 0.45 mm PTFE membrane (Puradisc, Whatman, USA). Then, the extract was concentrated on Rotovap to 0.5 mL and further concentrated to almost dryness by a gentle nitrogen gas stream and dissolved in 200 mL methanol.

2.2. RYA protocol

Strain YCM4 (by Dr. Charles A. Miller from the University of New Orleans) and a detailed protocol for different RYA systems has been published elsewhere (Miller, 1997; Noguerol et al., 2006). Transformed yeast clones were grown overnight in minimal medium (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids, DIFCO, Basel, Switzerland, supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required) plus 20 g/L galactose to express both AhR and ARNT. The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 50 mL aliquots (see below) in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC™, Roskilde, Denmark; ref. Garcia-Reyero et al., 2001) previously silylated by overnight exposure to an atmosphere of dimethylsilane. A serial dilution scheme was performed based on 1:3 dilution steps (Garcia-Reyero et al., 2001). Plates were incubated for 6 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 50 mL YPER® (PIERCE™, Rockford, IL, USA) were added to each well and further incubated at 30 °C for 30 min. Then, 50 mL of assay buffer supplemented with 0.1% 2-βmercaptoethanol and 0.5% of the 4-methylumbelliferone β-D-galactopyranoside (MuGal) solution (both from the FluorAce™ beta-galactosidase Reporter Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were added to the lysed cells. After brief centrifugation, plates were read in a Synergy 2 spectrofluorometer (BioTek, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths, respectively. Fluorescence was recorded for 15 min (about one measurement per min). β-Galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary

fluorescence units with time, using standard linear regression methods. Antagonistic (inhibitory) activities were tested by 6 h incubation of the yeast cultures together with 1 mM of β -naphthoflavone (BNF) and sample aliquots diluted at 1:90 and subsequent analysis following the method indicated above. Samples were tested in triplicate.

2.3. Calculation of BaP equivalents

BaP equivalents (BaP_{eq}) were defined as the BaP concentrations required to elicit the same response as the sample in the RYA assay. To translate results from serial dilutions to BaP_{eq}, it was assumed that the hormonal dose-response curves followed sigmoidal functions, as described (Noguerol et al., 2006) to calculate the dilution at which a given sample elicits 50% of the maximal response of the assay (EC₅₀ values). Apparent EC₅₀ values for each sample were calculated from a minimum of six replicates from two dilution factors corresponding to the pseudo-linear portion of the dose-response curve. These values were converted to BaP_{eq} by assuming that they corresponded to the EC₅₀ of BaP for YCM-RYA, 3.4 mg/L (Misaki et al., 2007). These values were expressed in ng BaP_{eq} per m³ of ambient air after adjusting for the concentration factor of the extraction procedure.

2.4. Statistics

All statistical calculations, including linear and non-linear regression methods, were performed using the SPSS v.17 package (SPSS Inc., Chicago, IL). Unless otherwise noted, significance levels were set at $p < 0.01$.

3. Results and discussion

3.1. Dioxin-like activity in PM₁₀ aerosols

Significant AhR agonistic (dioxin-like) activity was observed in all samples, with apparent concentrations ranging between 3 ng/m³ and 370 ng/m³ BaP_{eq} (Table 1). These values strongly correlated with PM₁₀ concentration (van Drooge and Pérez Ballesta, 2009, $R^2 > 0.60$; Table 2; see also Fig. 1 for double-log correlation) as well as with individual PAH concentrations ($0.71 < R^2 < 0.86$) and Σ PAH₁₄ ($R^2 > 0.83$ (Table 2; Fig. 1)). The potential biological activity of the samples was calculated as toxic equivalents (TEQ) from the chemical data, using both the EPA TEQ table (EPA, 1993) and the induction equivalent factors for strain YCM4 (IEF-RYA; Misaki et al., 2007). Predicted and observed AhR ligand activity values correlated with both models ($R^2 = 0.79$ and $R^2 = 0.84$, respectively; Table 2; Fig. 1). The total dioxin-like burden predicted from the chemical data using the IEF-RYA factors represented about 40% of the actual measured dioxin-like activity observed in the YCM-RYA assay (Table 1). This suggests that analyzed PAHs

represented a substantial fraction of the total dioxin-like activity present in the samples. The unexplained remaining 60% dioxin-like activity likely reflects the presence of other AhR agonists, such as different polycyclic aromatic ketones and quinones (Misaki et al., 2007), which were not analyzed in the present study.

BaP, Σ PAH₁₄, observed and predicted TEQ loads changed by more than two orders of magnitude during the analyzed period, following very similar patterns. In contrast, PM₁₀ values changed by only six-fold during the same period (Table 1). These data indicate that PM₁₀ mass variation can only reflect a portion of the total toxicity scattering of the samples, the importance of which may vary radically among of the chemical composition of the atmospheric particulate matter.

Table 1
Observed chemical concentrations and dioxin-like activity values of ambient air samples.

Chemical data				Calculated dioxin-like burden ^a		Observed dioxinlike activity ^b	% Activity explained ^e
	PM10 ^c (μg m ⁻³)	Sum PAH ^c (ng m ⁻³)	Ratio BB/TE ^d	EPAt _{eq}	IEF-RYA	BaP eq (ng m ⁻³)	
9–10/9/2008	na	0.3	0.00	0.0	0.6	2.7	20.6
16–17/9/2008	na	0.3	0.00	0.0	0.8	4.1	18.4
25–26/9/2008	na	1.4	0.00	0.2	3.6	3.8	89.3
29–30/9/2008	na	2.7	0.04	0.3	7.3	30.1	23.0
30–01/9/2008	na	2.5	0.00	0.3	6.7	51.2	12.4
01–02/10/2008	34	2.2	0.00	0.3	5.8	26.9	20.6
02–03/10/2008	22	1.6	0.00	0.2	4.4	9.7	42.7
21–22/10/2009	47	4.8	0.21	0.6	11.8	52.7	21.2
17–18/11/2008	35	9.1	0.53	1.5	22.7	114.1	18.8
20–21/11/2008	24	14.9	1.77	2.6	41.3	60.8	64.2
25–26/11/2008	61	34.2	1.04	5.4	104.2	369.9	26.6
26–27/11/2008	36	16.4	2.08	2.6	45.2	183.2	23.3
27–28/11/2008	47	18.6	0.68	2.7	58.7	181.2	30.6
16–17/12/2008	13	3.6	1.19	0.4	10.7	14.8	68.4
12–13/01/2009	55	16.0	0.89	2.1	49.6	283.8	16.5
22–23/1/2008	21	13.2	1.15	2.0	40.0	43.9	86.1
28–29/01/2009	74	20.2	0.72	3.0	65.4	210.6	29.3
05–06/02/2009	28	11.0	0.95	1.5	32.4	130.3	23.5
11–12/02/2009	na	1.8	0.15	0.2	4.3	7.2	57.3

na, Not available.

^a Calculated as B[a]Pyr equivalents following EPA, 1993 (EPA teq) or Misaki et al., 2007 (IEF-RYA) in ng m⁻³.

^b From YCM-RYA.

^c From van Drooge and Pérez Ballesta (2009).

^d Ratio of relative contribution (%) of biomass burning (BB) and traffic emissions (TE) to observed ambient air PAH concentrations (from van Drooge and Pérez Ballesta, 2009).

^e Percentage of the observed dioxin-like activity explained by the chemical data (IEF-RYA coefficients).

Traffic emissions and biomass burning are the major ambient air sources for PAH (van Drooge and Pérez Ballesta, 2009) in the semirural area of Northern Italy considered in the present study. An important shift in PAH emission source, from the absence of biomass burning (BB) (<1%) to significant BB contribution (>50%), occurred along the seasonal transition from summer to winter (van Drooge and Pérez Ballesta, 2009). However, this source change was not reflected in the dioxin-like activity of these samples, as evidenced by the strong linear correlation between dioxin-like activity and PAH concentration over the whole concentration range, irrespectively of the relative importance of both emission sources (Fig. 1).

Days with high BB contributions (and thus relative low traffic emission (TE) contributions) were found along the whole PAH concentration range (Fig. 1), but the resulting correlations of BB contribution with PAH and BaPeq values are weak ($R^2=0.23$) which indicate that the type of source has little influence on the dioxin-like activity. In this colder period there was a higher frequency of non-dispersive meteorological episodes, with a mixing layer that was generally located at low heights and contaminants emitted to the atmosphere that were concentrated in a thinner air layer. Consequently, this also increased the dioxin-like activity.

Table 2

Linear correlation coefficients (R^2) between observed dioxin-like activity values and chemical composition of ambient air samples.

PM10	0.60
Phenanthrene	0.86
Anthracene	0.73
Fluoranthene	0.83
Pyrene	0.83
Retene	0.71
Benz[a]anthracene	0.82
Chrysene + triphenylene	0.86
Benzo[b+j]fluoranthene	0.81
Benzo[k]fluoranthene	0.80
Benzo[e]pyrene	0.81
Benzo[a]pyrene	0.78
Perylene	0.78
Indeno[123-cd]pyrene	0.80
Benzo[ghi]perylene	0.79
Sum PAH	0.83
EPA TEQ ^a	0.79
IEF-RYA ^a	0.84

^a Predicted dioxin-like burdens from Table 1.

3.2. Implications for air quality measurements

The use of RYA for quantification of AhR ligand activity in ambient air PM₁₀ appears to be a simple, low-cost bioassay for toxic PAH emissions, even at background air concentration levels. Cell culture-based bioassays, as the CALUX system, can also be used to estimate the AhR ligand activity of particulate air samples (Ciganek et al., 2004; Hamers et al., 2000; Kennedy et al., 2010; Machala et al., 2001; Wenger et al., 2009). However, whereas CALUX is an excellent method to evaluate AhR ligand activity from organohalogenated compounds and other chemically stable pollutants, it is less efficient in the detection of toxic effects from PAH and, particularly, PAH derivatives (Misaki et al., 2007). Yeast-based systems do not require cell cultures specialized equipment and are typically more robust and resistant to toxic effects than mammalian cells. They may afford important reductions of costs and simplified experimental procedures which are crucial for monitoring programs (Brix et al., 2010).

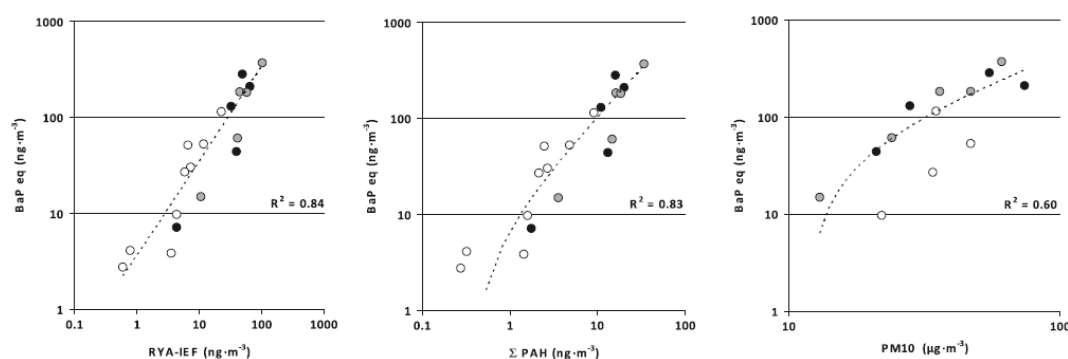


Fig. 1. Correlations between estimated RYA-IEF, Σ PAH₁₃ measured by TD-GC-MS ($\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$) and PM₁₀ concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$) vs BaPeq ($\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$) determined with the RYA bioassay. Samples with low (<30%; white dots), medium (30–50%; grey dots) and high (>50%; black dots) contributions of wood combustion to the total PAH contents are outlined (these classes were defined by K-means clustering).

Acknowledgements

J.P. Putaud is acknowledged for providing PM₁₀ data from the EMEP Ispra site. BLVD thanks CSIC for a JAEdoc fellowship. This work was supported by the Spanish Ministry for Science and Innovation. Projects CGL2008-01898/BOS, CSD2007-00067 and CTQ2009-14777-C02-01.

References

Andersen, H., Andersson, A., Arnold, S., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N., Bjerregaard, P., Christiansen, L., Gissel, B., Hummel, R., et al., 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives* 107, 89-108.

Boström, C.-E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., et al., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives* 110, 451-488.

Bovee, T.F., Helsdingen, R.J., Rietjens, I.M., Keijer, J., Hoogenboom, R.L., 2004. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors alpha and beta, and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 91, 99-109.

Brix, R., Noguerol, T.N., Piña, B., Balaam, J., Nilsen, A.J., Tollefsen, K.E., Levy, W., Schramm, K.W., Barceló, D., 2010. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environment International* 36, 361-367.

Ciganek, M., Neca, J., Adamec, V., Janosek, J., Machala, M., 2004. A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment* 334-335, 141-148.

Coldham, N.G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D.P., Connor, C., Sauer, M.J., 1997. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environmental Health Perspectives* 105, 734-742.

Council Directive 2004/107/EC relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air. *Official Journal L* 023, 26/01/ 2005, 3-6.

EPA, 1993. Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington. EPA/600/R-93/089.

Fent, K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140-141, 353-365.

Garcia-Reyero, N., Grau, E., Castillo, M., López de Alda, M.J., Barceló, D., Piña, B., 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1152-1158.

Gonzalez, F.J., Fernández-Salguero, P., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metabolism and Disposition* 26, 1194-1198.

Hankinson, O., 1995. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35, 307-340.

Hamers, T., van Schaardenburg, M.D., Felzel, E.C., Murk, A.J., Koeman, J.H., 2000. The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *Science of the Total Environment* 262, 159-174.

Kennedy, K., Macona, M., Bartkow, M.E., Hawker, D.W., Zhao, B., Denison, M.S., Mueller, J.F., 2010. Effect based monitoring of seasonal ambient air exposure in Australia sampled by PUF passive air samplers. *Atmospheric Pollution Research* 1, 50-58.

Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J.V., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutation Research* 497, 49-62.

Miller III, C.A., 1997. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *Journal of Biological Chemistry* 272, 32824-32829.

Misaki, K., Kawami, H., Tanaka, T., Handa, Y., Nakamura, M., Matsui, S., Matsuda, T., 2007. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1370-1379.

Nebert, D.W., Puga, A., Vasiliou, V., 1993. Role of the Ah receptor and the dioxininducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 685, 624-640.

Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y., Dalton, T.P., 2000. Role of aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response. *Biochemical Pharmacology* 59, 66-85.

Noguerol, T., Boronat, S., Jarque, S., Barceló, D., Piña, B., 2006. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 69, 358-359.

Oros, D.R., Simoneit, B.R.T., 2001. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning. Part 2. Deciduous trees. *Applied Geochemistry* 16, 1545-1565.

Pérez, L., Medina-Ramon, M., Künzli, N., Alastuey, A., Pey, J., et al., 2009. Size fractionate particulate matter, vehicle traffic, and case-specific daily mortality in Barcelona, Spain. *Environmental Science and Technology* 43, 4707-4714.

Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.L., Calle, E.E., Krewski, D., et al., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of the American Medical Association* 287, 1132-1141.

Rogge, W.F., Hildemann, L.M., Mazurek, M.A., Cass, G.R., 1993. Sources in fine organic aerosol 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy duty diesel trucks. *Environmental Science and Technology* 27, 636-651.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose M, Takahashi, Y., Kume, H., et al., 2000a. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 779-782.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinose, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., Ishikawa, T., 2000b. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 779-782.

van Drooge, B.L., Nikolova, I., Pérez-Ballesta, P., 2009. Thermal desorption gaschromatography-mass spectrometry as an enhanced method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons from ambient air particulate matter. *Journal of Chromatography A* 1216, 4030-4039.

van Drooge, B.L., Pérez Ballesta, P., 2009. Seasonal and daily source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in PM10 in a semirural European area. *Environmental Science and Technology* 43, 7310-7316.

Wenger, D., Gerecke, A.C., Heeb, N.V., Hueglin, C., Seiler, C., Haag, R., Hanspeter, N., Zenobi, R., 2009. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of atmospheric particulate matter from an urban and a rural site in Switzerland. *Atmospheric Environment* 43, 3556-3562.

IV.3 CAPÍTOL 3: Disseny, validació i aplicació del bioassaig en embrions de Peix zebra

CAPÍTOL 3. Disseny, validació i aplicació del bioassaig en embrions de Peix zebra

IV.3.1 Disseny del bioassaig basat en embrions de Peix zebra

La utilització d'un organisme vertebrat per a realitzar assaigs de toxicitat permet tenir en compte el conjunt de vies metabòliques així com els efectes de compartimentació (òrgans i teixits) a l'hora de respondre davant dels xenobiòtics. La combinació de tècniques moleculars com la qRT-PCR amb els avantatges que presenten els embrions de peix Zebra ha premès desenvolupar assaigs com el MolDarT (Voelker et al., 2006 i Liedtke et al., 2007) que utilitza els canvis en l'expressió de gens diana com a biomarcadors de substàncies tòxiques.

En aquesta tesis, es proposa anar més enllà i establir els paràmetres bàsics per dissenyar un bioassaig en un organisme de vertebrat que sigui ràpid, eficient i aporti la informació necessària per detectar lligands de l'AhR a més de preveure els seus possibles efectes tòxics a més llarg termini, però sense augmentar l'ús d'animals d'experimentació.

Els paràmetres que cal determinar per a dissenyar aquest assaig són el gen o gens que s'utilitzaran com a biomarcadors relacionats amb el sistema de detoxificació de l'AhR, el gen o gens de referència, la seqüència de les sondes d'oligonucleòtids i la seva eficiència, el número d'embrions necessari per a obtenir suficient RNA i, finalment, el temps d'incubació així com el grau de desenvolupament del embrions per definir la finestra de tractament.

Elecció del gen biomarcador

A diferència dels mamífers, el peix zebra conté tres Receptors d'hidrocarburs d'Aril (AhR), encara que el receptor l'AhR2 és el que produeix una major inducció del sistema de detoxificació. A més, aquest gen és el més relacionat filogenèticament amb l'AhR de la resta de vertebrats (Jönson et al., 2007).

Els gens que s'indueixen a partir de l'activació de l'AhR2 són principalment de la superfamília del Citocrom P45, família 1 i subfamílies A, B, C i D (CYP1A, CYP1B i CYP1C). Tot i així, al igual que a la resta de vertebrats, la inducció més forta la presenta el gen CYP1A (Jönson et al., 2007).

Les sondes l'oligonucleòtids dissenyades per mesurar l'expressió dels gens AhR2 i CYP1A es troben descrites a la Taula IV.1 Pel que fa als gens de referència utilitzats per a aquest bioassaig, PPIA2 i EF1 α , van ser seleccionats a partir d'estudis anteriors per la seva estabilitat d'expressió en els embrions de peix zebra. A la Taula IV.1, es troben les sondes utilitzades per

aquests bioassaigs (Morais et al., 2007) i, la seva descripció es pot trobar a l'apartat I.3.3.3 de la Introducció.

Taula IV.1. Seqüència de les sondes d'oligonucleòtids testades per formar part de l'assaig amb embrions de peix zebra per a la detecció de lligands de l'AhR.

Gen	GeneBank	Sonda <i>Forward</i> (5'-3')	Sonda <i>Reverse</i> (5'-3')
AhR2	AF063446	CTACTTGGGCTTCCATCAGTCG	GTCACTTGAGGGATTGAGAGCG
CYP1A	AB078927	GGTTAAAGTTCACCGGGATGC	CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG
PPIA2	AY391452	GGGTGGTAATGGAGCTGAGA	AATGGACTTGCCACCAGTTC
EF1 α	L47669	CGTCTGCCACTTCAGGATGTG	ACTTGCGAGGCGATGTGAGCAG

Per tal d'estudiar l'eficiència de les sondes seleccionades així com la resposta d'aquests dos gens davant de lligands de l'AhR, es van tractar embrions de peix zebra amb β -Naftoflabona i amb DMSO, com a control del solvent. A partir del cDNA obtingut, es van realitzar dilucions seriadades d'una mostra tractada i una mostra sense tractar per obtenir les corbes estàndards per cada gen.

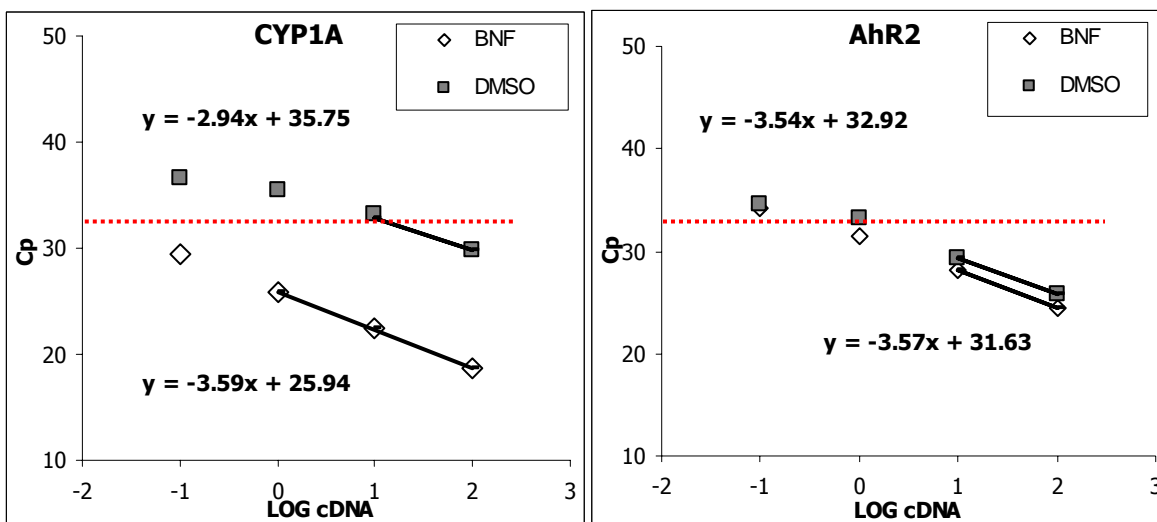


Figura IV.1. Valors de Cp d'una mostra tractada amb BNF i una sense tractar respecte el logaritme de la concentració de cDNA per les sondes de CYP1A (esquerre) i AhR2 (dreta). La línia (.....) indica el límit a partir del qual el nombre de Cp deixa de ser representatiu del nombre de molècules inicial.

A la Figura IV.1, es troben representades les quantitats de cDNA (100; 10; 1; 0.1 ng) en logaritmes respecte la mitjana dels valors de Cp obtinguts mitjançant la qRT-PCR per cada gen.

A partir d'aquestes dades, es pot veure com a les concentracions més baixes de cDNA es perd la linealitat de manera que, a l'hora de fer els assaigs s'hauran d'utilitzar concentracions de més de 10 ng. A més, en el cas del CYP1A, s'observa una diferència de 10 Cps entre la mostra tractada i sense tractar mentre que, a l'Ahr2, els Cps dels dos tractament són molt semblants. A partir de la pendent obtinguda de la corba estàndard, es va calcular l'eficiència per ambdós parells de sondes. A la Taula IV.2 es pot veure com el gen CYP1A és el que presenta una eficiència més elevada (propera a 1).

Taula IV.2. Eficiència dels gens estudiats com a possibles biomarcadors per l'assaig en embrions de peix zebra

Gen	Eficiència (E)	
	CYP1A	Ahr2
BNF	1.01	0.91
DMSO	1.13	0.90

Finalment, a la Figura IV.2, es poden veure els resultats d'aquest assaig representats com a valors d'expressió relativa pels gens CYP1A i AhR2 respecte als dos tractaments amb β NF (50 i 100 μ g/L) i DMSO. En el cas de l'Ahr2, s'observa una lleu inhibició del gen respecte al control negatiu (1 a 2,5 vegades) mentre que l'expressió del gen CYP1A augmenta de 5 a 7 vegades. A partir d'aquestes dades, es va escollir el gen CYP1A com a biomarcador del bioassaig.

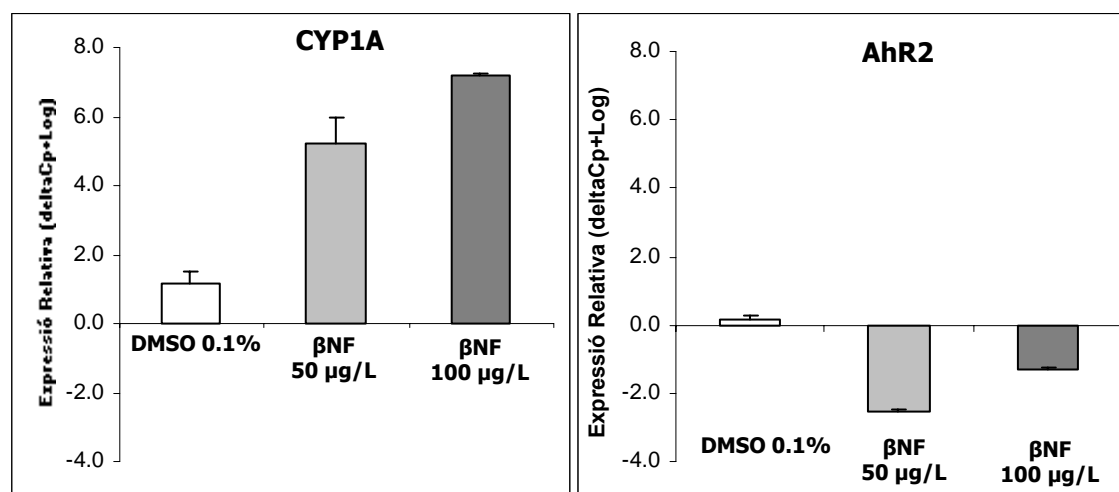


Figura IV.2. Expressió relativa dels gens AhR2 (esquerra) i CYP1A (dreta) a diferents concentracions de β -NF en embrions de peix zebra.

Elecció de la Finestra de l'Assaig

La finestra de l'assaig ve determinada pel temps d'incubació amb els contaminants i l'estadi de desenvolupament dels embrions. En el cas dels peixos zebra, els embrions es troben en fase d'eleuteroembrions (sense alimentació autònoma) des de les 0 hpf fins aproximadament les 120-144 hpf de manera que en aquest període no se'ls considera com a animals d'experimentació. Així mateix, el fet de no tenir alimentació externa elimina una de les variables a considerar dels bioassaigs amb animals.

En estudis previs, s'ha observat que la resposta del gen CYP1A sol ser de tipus aguda i, per tant, es important considerar temps d'incubació curts (Quirós et al., 2007). Altres estudis, mostren el patró d'activitat dels gens CYP (EROD) i de la seva expressió (qRT-PCR-CYP1A) des de les 0 hpf fins les 120 hpf (Otte et al., 2010 i Liedtke et al., 2007). En aquests estudis, s'observa que els embrions hereten proteïnes amb activitat CYP1A materns (pic activitat EROD a les 8 hpf) i que, progressivament, es van degradant fins a les 32 hpf, on s'obté un mínim d'activitat. Pel que fa a l'expressió del gen CYP1A, es pot veure com aquesta és mínima fins aproximadament les 72 hpf, moment en el qual comença a augmentar el nivell de CYP1A i continua incrementant de forma exponencial fins al final de l'estudi a les 120 hpf. D'aquesta manera, es pot calcular que entre les 20 i les 72 hpf, els embrions tenen la mínima influència de repressors i cofactor activats per la presència de CYP1A ja sigui propi o matern.

La Figura IV.3 mostra les finestres de tractament utilitzades per seleccionar els temps d'incubació i l'estadi dels embrions per tenir una assaig ràpid i senzill però amb la màxima resposta possible.

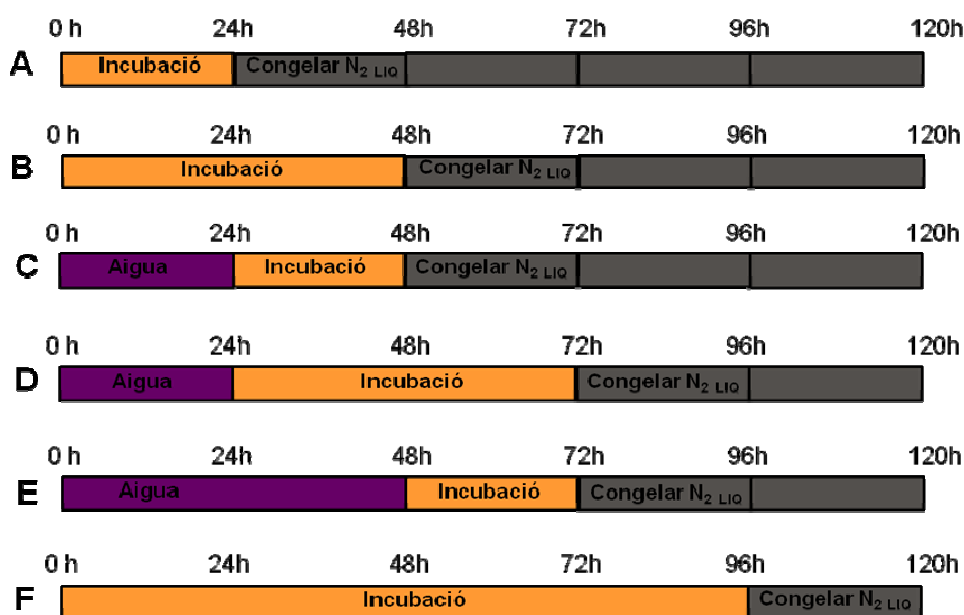


Figura IV.3. (A-E) Possibles finestres del bioassaig amb embrions amb CYP1A entre les 0 hpf i les 72 hpf. (F) Finestra d'assaig utilitzada habitualment pels diferents assaigs amb embrions de peix zebra tan d'anàlisi de l'expressió gènica com morfològica i de teratogènesis.

Els temps d'incubació varien entre 24 i 48 hores i l'estadi de desenvolupament entre les 2-3 hpf fins les 72 hpf. L'última finestra de tractament (F), que cobreix de les 2-3 hpf fins les 96 hpf, s'ha utilitzat com a control dels bioassaigs en embrions de peix zebra utilitzats habitualment (MolDarT, DarT o zFET). Per tal de simplificar l'assaig, només es va utilitzar una concentració de β -NF (100 μ g/L) i el control negatiu amb el 0.02% de DMSO com a solvent.

A la Figura IV.4, es representa l'expressió del gen CYP1A en individus tractats amb β -NF i DMSO per les diferents finestres d'assaig. Tots els períodes d'incubació mostren diferències significatives en l'expressió del CYP1A entre els individus tractats i sense tractar. No obstant, la finestra entre les 24 i 48 hpf (Finestra C) és la que mostra una menor expressió basal del gen biomarcador i, a més, la que presenta una inducció molt més elevada en presència de β -NF. Pel que fa al període d'incubació entre les 2-3 hpf fins les 96 hpf, es pot veure que la inducció no és tan forta i que l'expressió basal és més elevada. Tenint en compte aquests resultats, es va optar per la finestra de tractament entre les 24 i les 48 hpf.

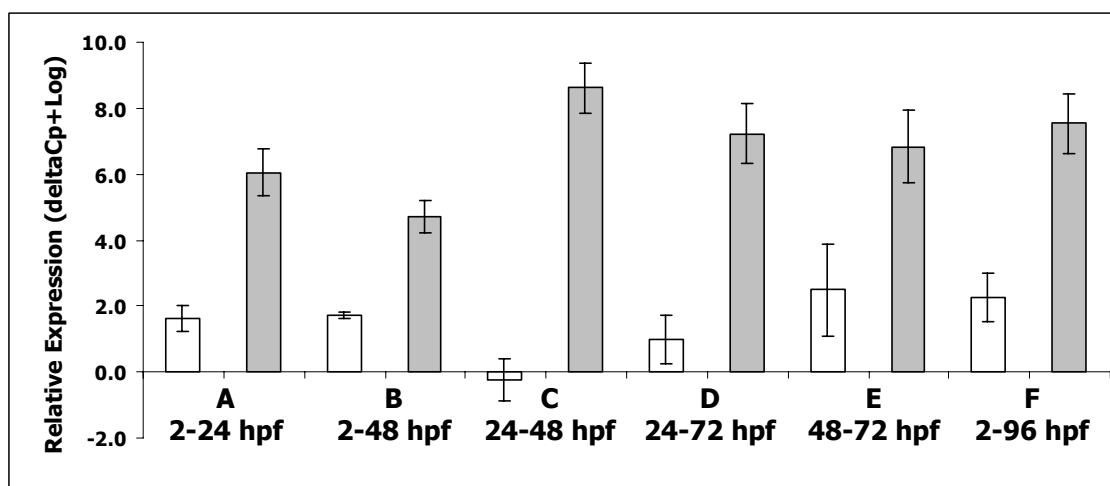


Figura IV.4. Expressió relativa del gen CYP1A en mostres tractades durant les finestres d'assaig (A-F) descrites a la figura IV.3 amb β -NF a 100 μ g/L (Gris) i el solvent, DMSO al 0,02% (blanc). Totes les mostres tractades amb β -NF són estadísticament diferents dels controls amb DMSO ($p < 0.05$)

Nombre d'embrions per mostra i número de rèpliques

Per determinar el número d'embrions necessaris per rèplica per a obtenir una quantitat d'RNA missatger adequada per a realitzar els anàlisis de l'expressió gènica, es van realitzar incubacions de 24 hpf a 48 hpf a una única concentració de β -NF (100 μ g/L) amb diferent número d'embrions per rèplica.

A la Taula IV.3, es pot veure les quantitats de RNA obtingut segons el nombre d'embrions (entre 1 i 30 embrions) per cada mostra. En tots els casos, la quantitat d'mRNA és suficient per obtenir la quantitat de cDNA necessària per analitzar les mostres mitjançant qRT-PCR (> 600 ng) però, fins als 10 embrions la quantitat d'mRNA obtinguda varia molt entre les diferents rèpliques degut a que és troba al límit del protocol d'extracció. Als 20 embrions per mostra, s'obté una quantitat d'mRNA molt semblant a l'utilitzada amb 15 i, amb 30 embrions la quantitat obtinguda supera les necessitats de l'assaig. D'aquesta manera la quantitat d'embrions adequada per l'assaig es troba entre els 10 i 15 embrions per rèplica aproximadament.

Taula IV.3. Eficiència de l'extracció de RNA total a partir de mostres amb diferent número d'embrions de peix zebra.

Número d'Embrions per mostra	[RNA] ng/L	Total ng RNA
1	29.99	899.7
5	128.4	3852
10	264.6	7938
15	391.2	11736
20	388.9	11667
30	729.3	21879

En quant al nombre de rèpliques per tractament, s'ha definit en 5 com a mínim per tal de donar més consistència i representativitat a les dades obtingudes. D'aquesta manera, al utilitzar 5 rèpliques per concentració amb 10 embrions per cada rèplica, aquest bioassaig ens permet observar la resposta de 50 individus en front a una concentració d'un compost o mostra ambiental determinada.

Efectes del còrion

Al establir la finestra del bioassaig entre les 24 i les 48 hpf, es necessari tenir en compte els possibles efectes del còrion (embolcall de l'embrió) com a suposada barrera pels compostos que es volen testar, degut a què la major part dels embrions encara no ha eclosionat. En aquest sentit, es van incubar els embrions amb β -NF com a compost estàndard de l'assaig i amb dos PAHs coneguts pels seus efectes adversos (Benzo[a]pirè i Benzo[k]fluorantè). Tots tres compostos s'han utilitzat a la mateixa concentració (250 μ g/L) i com a control de l'assaig s'ha utilitzat el solvent (DMSO). La meitat dels embrions utilitzats per cada tractament, se'ls va

extreure el còrion mitjançant fòrceps (extracció mecànica i manual) per tal d'evitar els efectes de la decorionació per tractaments químics.

Taula IV.4. Expressió relativa del gen CYP1A en embrions amb i sense còrion tractats amb diferents compostos estàndards entre les 24 hpf i les 48 hpf.

		Expressió Relativa CYP1A [Cp+Log(1000;2)]	
Compost	Concentració	Amb Còrion	Sense Còrion
DMSO	0,02%	0,56 ± 0,73	0,43 ± 0,94
β-NF	240 µg/L	6,8 ± 0,82	7,2 ± 1,05
B[a]Pyr	250 µg/L	5,7 ± 1,27	5,3 ± 1,57
B[k]Flu	265 µg/L	4,7 ± 1,13	4,9 ± 2,01

A la Taula IV.4, es pot observar que no hi ha una variació significativa per cap dels tres compostos entre els embrions amb o sense còrion així com tampoc per al control negatiu. Per tal d'evitar possibles danys als embrions a l'hora de decoriononar-los així com per reduir el temps de preparació de l'assaig, s'ha establert un protocol d'incubació amb compostos i mostres sense retirar el còrion.

IV.3.2 Validació del bioassaig basat en embrions de Peix zebra (MolDarT-Short)

Una vegada definits els nous paràmetres del bioassaig, es va procedir a la seva validació mitjançant l'estudi de la seva resposta davant de lligands clàssics de l'AhR. Com a compostos tipus es van escollir un representant dels compostos organoclorats (PCB126) i dos congèneres dels PAHs (Benzo[a]pirè i Benzo[k]fluorantè).

A les Figures IV.5, IV.6 i IV.7, es poden veure les corbes dosi-resposta per l'assaig de llevat i pel nou assaig en embrions de peix zebra amb els tres compostos escollits: PCB126, B[a]pyr i B[k]flu, respectivament. En tots tres casos, l'assaig MolDarT-Short (cyp1a) és més sensible que l'assaig en llevat amb una diferència d'un ordre de magnitud pels congèneres dels PAHs i de més de dos ordres de magnitud pel compost organoclorat.

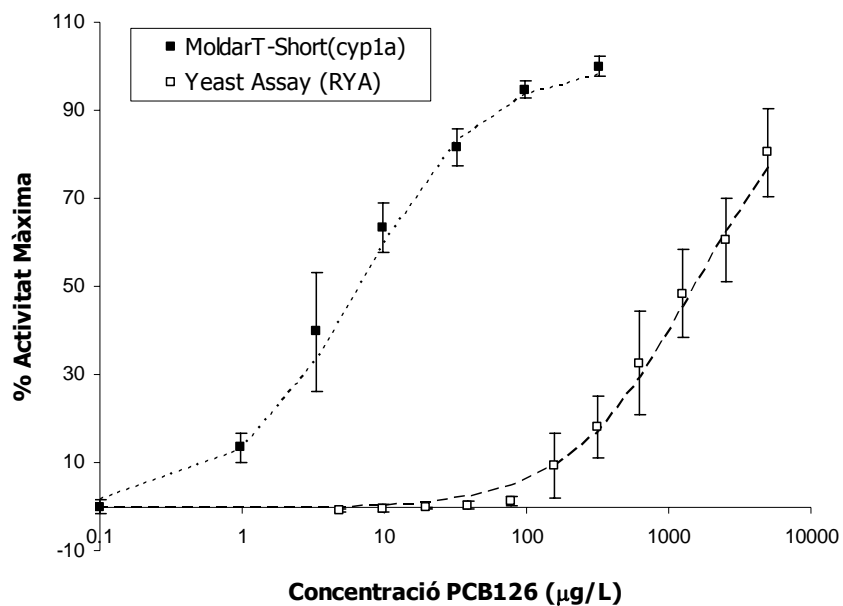


Figura IV.5. Comparació de les corbes dosi-resposta obtingudes a partir del bioassaig en embrions de peix zebra (MoldarT-Short) i l'assaig de llevat (AhR-RYA) amb el compost organoclorat PCB126. Els valors d'activitat es representen com a % de l'activitat màxima per cada assaig i la concentració del PCB126 en µg/L.

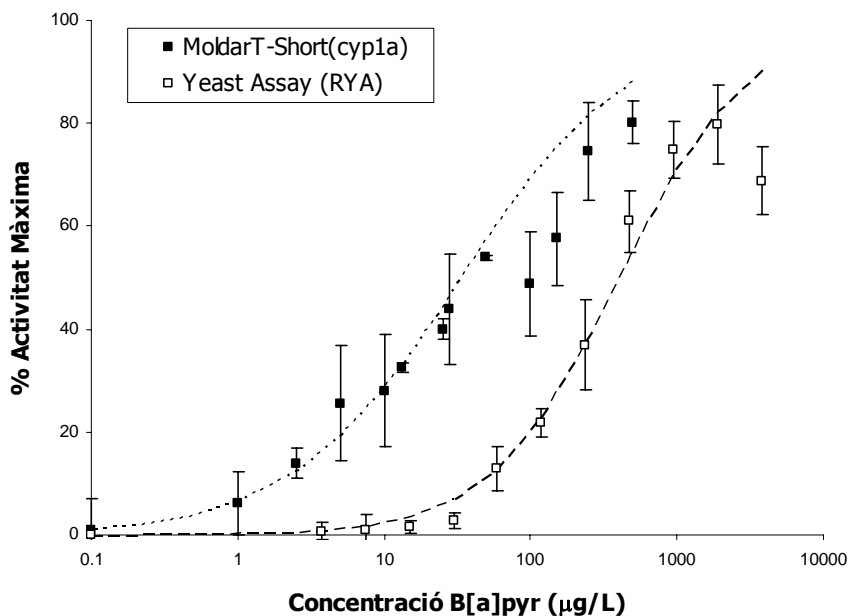


Figura IV.6. Comparació de les corbes dosi-resposta obtingudes a partir del bioassaig en embrions de peix zebra (MoldarT-Short) i l'assaig de llevat (AhR-RYA) amb el compost organoclorat B[a]pyr. Els valors d'activitat es representen com a % de l'activitat màxima per cada assaig i la concentració del B[a]pyr en µg/L.

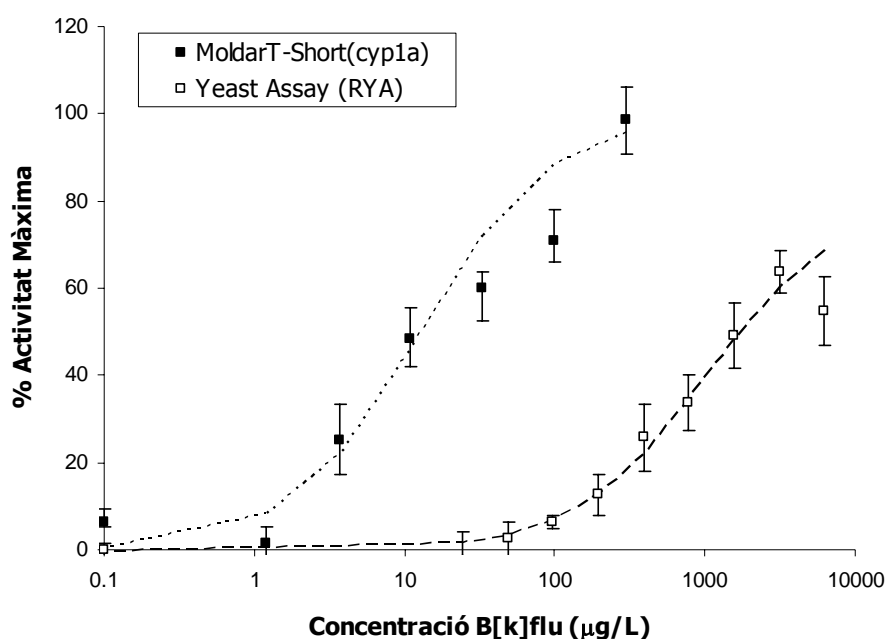


Figura IV.7. Comparació de les corbes dosi-resposta obtingudes a partir del bioassaig en embrions de peix zebra (MoldarT-Short) i l'assaig de llevat (AhR-RYA) amb el compost organoclorat B[k]flu. Els valors d'activitat es representen com a % de l'activitat màxima per cada assaig i la concentració del B[k]flu en µg/L.

A la Taula IV.5, es mostren els valors d'EC₅₀ calculats a partir de les corbes dosi-resposta pels diferents assaigs i compostos. Així mateix, aquests valors es poden comparar amb l'assaig en cèl·lules murines (DR-LUC) a partir de dades bibliogràfiques. Segons aquestes dades, tots tres assaigs mostren una resposta similar davant de la β-NF mentre que per a la resta de compostos, l'assaig DR-LUC és el que mostra major sensibilitat seguit del MoldarT-Short i, finalment, de l'assaig de llevat. Aquest és el cas, sobretot, davant del compost organoclorat (PCB126), on l'afinitat en el DR-LUC és molt elevada mentre que pel llevat és la menor de totes, tal i com s'havia observat en estudis anteriors (Noguerol et al., 2006a). Per aquesta raó, es va escollir la β-NF com a compost estàndard tan per cada assaig com per comparar entre els diferents bioassaigs.

Taula IV.5. Valors d'EC₅₀ obtinguts pels diferents bioassaigs amb lligands coneguts de l'AhR. [a] Benisch et al., 2002; [b] Hamers et al., 2000; [c] Booij et al., 2010.

	EC50 (µg/L)				
	CAS N°	MW	MoldarT-Short (cyp1a)	AhR-RYA	DR-LUC
β-NF	6051-87-2	272.3	38.5 (±5.97)	23.69 (±5.93)	42.8 (±5.8)
PCB126	57465-28-8	326.4	6.68 (±1.48)	1475.3 (±877.5)	0.023 ^[a]
B[a]pyr	50-32-8	252.3	33.2 (±24.2)	282.9 (±80.6)	0.66 ^[b]
B[k]flu	207-08-9	252.3	12.7 (±3.6)	552.9 (±98.1)	1.53 ^[c]

A partir de les EC_{50} pel diferents assaigs, es van calcular els valors de potència relativa (Taula IV.6) pels lligands de l'AhR utilitzant la β -NF com a compost de referència.

Taula IV.6. Valors de toxicitat expressats com a potència relativa respecte l'estandard de β -Naftoflavona.

	REP- β NF values		
	MolDarT(CYP1a)	AhR-RYA	DR-LUC
βNF	1.00	1.00	1.00
PCB126	5.76	0.02	1861
B[a]pyr	1.16	0.08	64.85
B[k]flu	3.03	0.04	21.19

Si es comparen els valors de potència relativa, es pot veure com el PCB126 és el compost que activa una major resposta tan per l'assaig en embrions de peix zebra com el de cèl·lules murines. Pel que fa als PAHs - B[a]pyr i B[k]flu – també presenten major activació per l'assaig MolDarT-Short i DR-LUC però en menor mesura que el PCB126. En canvi, la β -NF és el compost amb més activitat a l'assaig en cèl·lules de llevat recombinant.

Finalment, a la Figura IV.8 es comparen la resposta dels bioassaigs utilitzats (MolDarT-Short, AhR-RYA i DR-LUC) juntament amb l'assaig de valoració del desenvolupament en embrions de peix zebra (zFET) a diferents concentracions de β -NF. Per l'assaig zFET, s'han tingut en compte el número d'embrions amb un o més efectes teratogènics respecte al total d'embrions presents per cada concentració.

Si es comparen les corbes dosi-resposta, es pot veure els tres bioassaigs es comporten de forma similar davant del compost estàndard tal i com es veu a partir dels valors d' EC_{50} a la Taula IV.5. Pel que fa a l'assaig zFET, on es valoren els efectes nocius en el desenvolupament, es pot observar que presenta una EC_{50} d'un ordre de magnitud més elevada que la resta de bioassaigs. Aquest resultat permet obtenir una aproximació de la relació entre l'activació d'una resposta primària com és l'AhR i els enzim directament relacionats (*cyp1a*) i l'aparició de danys visibles en un individu. Així mateix, ens aporta una relació causa-efecte entre l'activació del *cyp1a* en embrions de peix zebra i els danys relacionats amb malformacions específiques com l'edema de pericardi i la malformació de la cua que apareixen de forma constant amb els diferents lligands de l'AhR (β -NF, PCB126, B[a]pyr) i amb el B[k]flu en menor mesura (mirar apartat IV.3.3; pàg. 144).

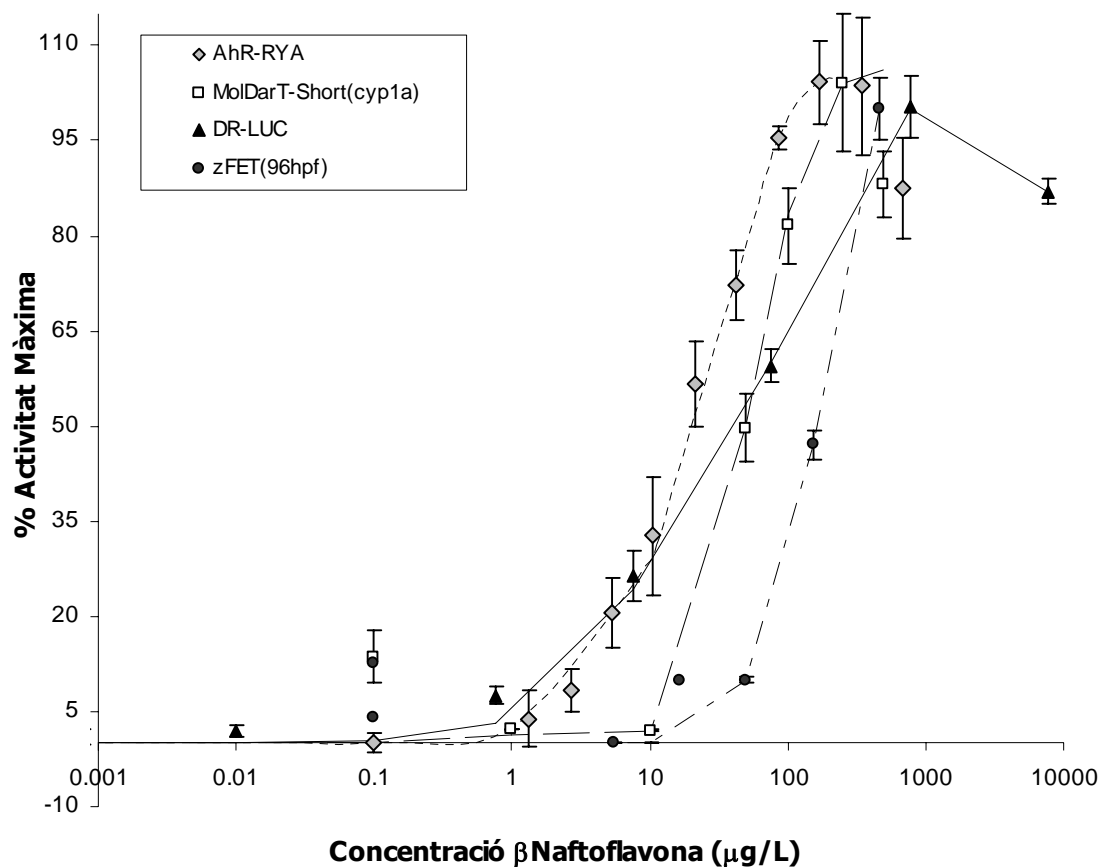


Figura IV.8. Comparació de la resposta biològica davant del compost de referència β-Naftoflavona dels diferents assaig (MolDarT-Short; AhR-RYA; DR-LUC i zFET). L'activitat biològica es troba expressada com a % de l'activitat màxima per cada bioassaig i el compost de referència en µg/L.

A partir dels resultats obtinguts amb els diferents lligands de l'AhR, es pot concloure que el nou assaig en embrions de peix zebra es capaç d'activar-se de forma gradual davant de la seva presència, que presenta una sensibilitat major que l'assaig de llevat, sobretot davant de compostos organoclorat, tot i que l'afinitat del receptor AhR de *D. rerio* no arriba a l'obtinguda pel receptor murí en l'assaig DR-LUC.

IV.3.3 Comparació i Aplicació del bioassaig en peix zebra en mostres de contaminació atmosfèrica

Article 5: Toxicitat dels aerosols i les partícules de la crema de carbó als embrions de peix zebra en desenvolupament: estudi comparatiu entre bioassaigs basats en l'embrió sencer o en cultius cel·lulars.

Alba Olivares, Barend L. van Drooge, Leo T. van der Ven, Jorke H. Kamstra, Timo Hamers, , Joan O. Grimalt and Benjamin Piña.

Els lligands del Receptor d'hidrocarbur d'Aril (AhR, també anomenats compostos tipus dioxina), incloent els Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAH), constitueixen una fracció significativa de la toxicitat total associada a les partícules de l'aire de l'atmosfera com a resultat dels processos de combustió, incloent la combustió de la fusta i el carbó. L'activitat biològica tipus dioxina dels extractes obtinguts a partir d'aquestes partícules van ser analitzats per tres bioassaigs específics: un assaig basat en cèl·lules murines (DR-luc), un assaig basat en llevats recombinats per l'AhR (AhR-RYA), i l'anàlisi de l'expressió de *cyp1a* en embrions de peix zebra per qRT-PCR. La resposta dels tres bioassaigs és comparable entre si, tot i que l'assaig de zebrafish és més sensible que els altres dos. Aquests resultats suggereixen que l'assaig basat en llevat reflecteix de forma molt acurada la composició de PAHs present a les mostres, mentre que el peix zebra i, parcialment l'assaig DR-luc, detecten una fracció d'activitat tipus dioxina no lligada directament amb els PAHs, només de forma significativa a les mostres de carbó cremat, i especialment elevada en una d'elles. L'anàlisi dels efectes en el desenvolupament dels embrions de peix zebra davant dels diferents extractes confirma l'elevada toxicitat de la mateixa mostra, la qual provoca tota una gama d'alteracions anatòmiques, com l'edema de pericardi, la deformació de la boca i, una lleugera desviació de l'espina dorsal. Degut a què aquestes alteracions també s'indueixen en embrions exposats a diferents lligands de l'AhR, es pot concloure que l'assaig en peix zebra pot detectar activitats biològiques que representen un risc potencial pels organismes exposats als PAHs i altres contaminants tipus dioxina. A més, donada la similitud entre el desenvolupament dels peixos i els mamífers, aquest risc també pot aplicar-se al desenvolupament dels humans en atmosferes molt contaminades.

keywords: embrions de peix zebra, assaig de llevat recombinant (AHR-RYA), Receptor de la Dioxina, PAH, malformacions, *cyp1a*.

Aerosol and coal burning particle toxicity to the developing zebrafish: Comparative study between whole embryo- and cell-based bioassays.

Alba Olivares^a, Barend L. van Drooge^a, Leo T. van der Ven^b, Jorke H. Kamstra^c, Timo Hamers^c, , Joan O. Grimalt^a and Benjamin Piña^a

^aInstitute of Environmental Assessment and Water Research (ID/EA-CSIC), Jordi Girona 18, 08034 Barcelona. Catalonia. Spain

^bLaboratory for Health Protection Research, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands

^cInstitute for Environmental Studies (IVM), VU University Amsterdam, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

Ligands of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR, also called dioxin-like compounds), including Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), constitute a significant fraction of the total toxicity associated to atmospheric air particles as a result of combustion processes, including wood and coal combustion. The dioxin-like biological activity of extracts from these particles was analysed in three specific bioassays: a murine cell-based DR-luc assay, a AhR-based Recombinant Yeast Assay, and the analysis of *cyp1a* expression in zebrafish embryos by qRT-PCR. The response of all three bioassays was comparable, although the zebrafish assay was more sensitive than the other two. Ours results suggest that the yeast-based assay reflected very closely the PAHs composition of the samples, whereas the zebrafish and, partially, the DR-luc assay, detected a fraction of dioxine-like activity not directly linked to PAHs, only significant in the coal burnt samples, and especially elevated in one of them. Analysis of the effects of the different samples on zebrafish embryo development confirmed the elevated toxicity of the same sample, which elicited a panoply of anatomical alterations, like pericardial edema, mouth deformity, and a light spinal deviation. As these alterations are also induced in zebrafish embryos by exposure to different AhR ligands, we conclude that the zebrafish assay can detect biological activities which represent a potential concern for organisms exposed to PAHs and other dioxin-like pollutants. In addition, given the similitude between fish and mammalian development, this concern may also apply to humans developing in heavily contaminated atmospheres.

keywords: zebrafish embryos, Recombinant Yeast Assay (AhR-RYA), Dioxin Receptor, PAH, malformation, CYP1A.

Article History: in preparation

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a substantial fraction of the toxicity associated to particles in ambient air, due to their characteristic carcinogenic and mutagenic properties (Bostrom and others 2002; Wenger and others 2009). They are permanently formed by all sorts of incomplete combustion processes, such as fossil fuel combustion in vehicles, coal combustion or biomass combustion (Schauer and others 2001; Schauer and others 2002). Air quality standards have been implemented to safeguard human health against the adverse effects of PAH and, specifically, benzo[a]pyrene (EC 2004; EPA 1993).

The carcinogenic effect of different PAHs is mediated by the binding of the pollutant to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a key regulator of phase I and II metabolic enzymes (Gonzalez and Fernández-Salguero 1998; Hankinson 1995; Nebert and others 1993; Shimizu and others 2000). The ectopic activation of the AhR controlled genes is also known as dioxin-like activity, for dioxins are among their most powerful known agonists, with affinity constants for the AhR at the pM range (Misaki and others 2007). Therefore, assays to detect AhR activation and subsequent signal transduction are useful to monitor pollution loads in environmental samples (Fent 2003). A variety of aryl hydrocarbon-responsive reporter assays based on mammalian cell lines (Garrison and others 1996; Hamers and others 2000; Schoeters and others 2004) or genetically modified yeast strains (Misaki and others 2007; Murahashi and others 2007; Noguerol and others 2006b; Olivares and others 2011) have become common tools to detect AhR-binding activities in a variety of samples and matrices. Single cell (either vertebrate or yeast) bioassays do not provide a chemical characterisation of the hormone-receptor ligands, but their low cost and easiness of handling makes them a first choice when testing large numbers of ill-characterised samples or compounds.

Zebrafish (*Danio rerio*) is becoming a preferred model for the analysis of sublethal effects of toxicants in vertebrates (Scholz and Mayer 2008; Stegeman and others 2010). Zebrafish are easy to maintain, have a short life cycle, and readily produce relatively large quantities of transparent embryos, the development of which has been extensively studied and can be observed using a variety of optical methods. Whereas the use of the acute embryo toxicity test DarT (Nagel 2002) is becoming increasingly implemented, many efforts are devoted to use zebrafish embryos as model to understand toxic mechanisms at sublethal levels and to predict possible adverse and long-term effects. This would require the development of suitable molecular markers as indicators of the mode of action and the establishment of links between short-term effects in embryos and long-term toxicity in adults (Scholz and others 2008). Cytochrome P450 1A is an established marker of exposure to toxicants in many vertebrate species, including fish (Goksoyr and Forlin 1992; McClain and others 2003; Whyte and others 2000). The zebrafish corresponding gene, *cyp1a*, is known to increase its expression in zebrafish

Table 1. Chemical data and biological activity values for air and coal samples

Sample code	Date of sampling (Air samples)	AhR ligand activity (mg/L BNFeg)			Parental PAHs in mother extracts (µg/L)	Parental PAHs in air samples (ng/ m ³)	Parental PAHs in coal samples (µg/ g)
		MolDarT (CYP1a)	AhR-RYA	DR-LUC			
A1	02-03/10/2008	90±15	21±3	25±1	400	1.6	
A2	21-22/10/2008	560±90	160±10	100±3	1300	4.8	
A3	17-18/11/2008	1800±1100	220±10	170±10	2400	19.0	
A4	27-28/11/2008	530±90	340±30	250±10	4600	19.0	
DT2		15000±6000	270±70	260±20	1800		23000
DT3		130±50	19±2	22±1	2700		18000

embryos upon exposure to AhR ligands, which can be monitored by qRT-PCR methods (Voelker and others 2007). Finally, exposure to dioxins, PAHs and naphthoflavone results in cardiac toxicity in zebrafish larvae, a phenotype linked to the binding of these compounds to the AhR (Antkiewicz and others 2006; Scott and others 2011).

In this paper we used these four bioassays (Vertebrate and yeast cell lines, cyp1a expression and cardiac toxicity in zebrafish embryos) to evaluate the AhR-associated toxicity of samples from air particles and coal-mining residue samples. The analysis includes four PM₁₀ filter samples from the Po valley in northern Italy, south of the Alps. This area shows large seasonal gradients of PAH concentrations in ambient air and wood combustion and emissions from traffic as predominant PAHs sources (van Drooge and others 2010). A second set of PAH-rich samples were condensates of spontaneous coal fires in two coal mining waste gobs in the Datong district (Shanxi Province, China). These samples have been characterized as very rich in PAHs and n-alkanes (Querol and others 2011), although they show very different profiles of PAHs. Our goal is to compare toxicity results from the different bioassays and to correlate these values with the chemical composition of the samples.

2. Material and methods.

2.1 Compound and Sample description

Compounds. Benzo[a]pyrene (B[a]Pyr; ≥96%), Benzo[k]fluoranthene (B[k]Flu; 98%) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB126) (99.1%, Promochem, Wesel, Germany) dissolved in DMSO (99.5% GC, Sigma-aldrich) which was also used as control in zebrafish and DR-LUC experiments. Meanwhile, MeOH (≥99.9%, Carlo-Erba, Quimitiva, Spain) was used as solvent in the yeast assay.

Field samples. Four 24-hour air particulate matter (PM₁₀) filter samples were collected in 2008 in a semi-rural area from the Po valley, northern Italy. These samples correspond to 02-03/10/2008 (A1), 21-22/10/2009 (A2), 17-18/11/2008 (A3) and 27-28/11/2008 (A4)) and represent a gradient of PAH concentration related to biomass combustion (van Droog and Perez-Ballesta, 2009) as well as different dioxin-like activity determined by AhR-RYA (Olivares and others, 2011). Coal tar condensates were sampled from spontaneous combustions in two coal waste gobs in the Datong district (Shanxi Province, China). These combustions in deeper layers cause volatilization of organics from the coal gangue. Due to the sharp fall in temperature towards the surface, these compounds may condense or chemically interact with the overlying material (regardless of whether or not it is fired) and give rise to condensates. These two collected samples, DT2 and DT3, are characteristic by of their elevated content PAHs, however both with different individual compound composition (Querol and others, 2011).

Sample Analysis. Collection and extraction of samples for chemical and biological analyses were performed as described (Olivares and others 2011; Querol and others 2008; van Drooge and others 2010). All the extractions were made by organic solvents and for biological assays samples were concentrated and resuspended in MeOH. For zebrafish embryos and DR-LUC assays, part of the volume for each sample was evaporated to dryness and resuspended in DMSO.

2.2 Biological Assays

Aryl hydrocarbon receptor system (AhR-RYA)

AhR-Yeast Cells. Strain YCM4 was provided by Dr. Charles A. Miller from the University of New Orleans. This strain is a derivative of W303a (MATa, ade2-1, can1-100, his3-11, 15, leu2-3, 112, trp1-1, ura3-1), which harbor a chromosomally integrated construct that co-expresses human aryl hydrocarbon receptor and ARNT genes under the Gal1-10 promoter. A second construct is the pDRE23-Z reporter, encompassing three XRE5 sequence and the CYC1-LacZ fusion (Miller 1997).

AhR-RYA Protocol. A detailed protocol for different RYA systems has been published elsewhere (Noguerol and others 2006a). Transformed yeast clones were grown overnight in minimal medium (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids, DIFCO, Basel, Switzerland, supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required) plus 20 g/L galactose to express both AhR and ARNT. The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 50 μ L aliquots in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC™, Roskilde, Denmark; ref. 40) previously silylated by overnight exposure to an atmosphere of dimethylsilane. A serial dilution scheme was performed based on 1:3 dilution steps for environmental samples and 1:2 for standard compounds. Plates were incubated for 6 hours at 30°C under mild shaking. After incubation, 50 μ L YPER™ (PIERCE™, Rockford, IL, USA) were added to each well and further incubated at 30°C for 30 min. Afterwards, 50 μ L of assay buffer supplemented with 0.1% 2-mercaptoethanol and 0.5% of the 4-methylumbelliferone β -D-galactopyranoside (MuGal) solution (both from the FluorAce™ beta-galactosidase Reporter Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were added to the lysed cells. After brief centrifugation, plates were read in a Synergy 2 spectrofluorometer (BioTek, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 15 min (about one measurement per min); β -galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary fluorescence units with time, using standard linear regression methods. To test antagonistic (inhibitory) activities, yeast cultures were incubated for 6 h with 1 μ M of β -naphthoflavone (BNF)) added to a 1:90 dilution of each sample and processed as before. Samples were tested in triplicate.

Zebrafish Embryo Assays

Maintenance of fish and embryos. Wildtype zebrafish purchased from a local dealer were maintained at $27 \pm 1.5^\circ\text{C}$ in a 12 h light and 12 h dark cycle and reconstitute water (Instant Ocean 90 mg/L; 0.58 M $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and reverse osmosis purified water). Zebrafish embryos were collected following adult mating and maintained at the same conditions than adults during the whole process.

Zebrafish Embryo Test (zFET). Fifty non-coagulated zebrafish embryos for each treatment and control were selected from 2 to 3 hours post-fertilization (hpf) and distributed in glass pots. Each glass pot contains 20 mL of reconstituted water plus the sample or compound at a given concentration. Controls were made with BNF at 200 $\mu\text{g/L}$ as positive control, DMSO at 0.2 % as vehicle control and reconstitute water as negative control. Between 4 and 6 hpf, 8 zebrafish embryos were placed per well in a 6 well plates with 4 mL of treatment solution using one plate for each treatment so there is not cross contamination. Solutions were freshly prepared and renewed everyday. If using environmental samples or new compounds, embryos were placed in glass plates of 3 cm diameter in order to avoid plastic interference during the exposition. Scoring of zebrafish embryos was performed at 24, 48, 72 and 96 hpf with a magnifier (Olympus) taking into account the endpoints already described (Hermsen and others 2011) and averaging the damage by the number of embryos per well.

Zebrafish Gene Expression Assay (MolDarT-Short cyp1a). Ten to fifteen well-developed embryos at 24 hpf were selected with a magnifier (Olympus) and distributed in each glass plate of 3 cm diameter. Afterwards, medium was replaced by new reconstitute water, control solutions (0.2% DMSO or 200 $\mu\text{g/L}$ Naphthophlavone) as well as the treatments (compounds or environmental samples at different concentrations). Each treatment or control has at least 5 replicates. At 48 hpf, medium was almost removed and embryos were immediately frozen and kept at -80°C since they were processed.

Total RNA isolation from zebrafish embryos frozen samples was performed using Trizol[®] protocol (Invitrogen, Eugene). RNA concentration was measured by spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). RNA was treated with DNaseI (Quiagen), to remove genomic DNA contamination. Quantities from 1 μg to 100 ng of DNaseI-treated RNA were reverse transcribed to cDNA using First Strand cDNA Synthesis Kit from Roche (F Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) and stored at -20°C . Aliquots of 100 ng of total RNA were used to quantify specific transcripts in LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (F. Hoffmann-La Roche) using SYBR[®] Green Mix (Roche, Germany). Primer pair for *cyp1a* gene *D. rerio* (GeneBank accession number AB078927) were (Fw- GGTAAAGTTCACCGGGATGC, Rv-CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG)

and primer pairs for *ppia2* (GeneBank accession number AY391452) has been published elsewhere (Morais and others, 2007). Amplification of all sequences was tested by conventional and qRT-PCR (Lightcycler, Roche). Relative mRNA abundances of different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves (Cp, calculated by triplicates). To minimize errors on RNA quantification among different samples, Cp values for CYP1A (*Cpcyp1a*) were normalized to the Cp values for the reference gene for each sample, $\text{corrCpcyp1a} = \text{Cpcyp1a} - \text{Cpppia2}$. Changes in mRNA abundance in samples from different treatments were calculated by the $\Delta\Delta$ Cp method, (Pfaffl, 2001), using corrected Cp values from treated and non-treated samples ($\Delta\Delta\text{Cpcyp1a} = \text{corrCpcyp1a}_{\text{untreated}} - \text{corrCpcyp1a}_{\text{treated}}$). In some graphs, mRNA abundance values are represented as mRNA copies of target gene per 1000 copies of the reference gene *ppia2* mRNA (% of reference gene, $1000 \times 2^{(\text{Cpppia2} - \text{Cpcyp1a})}$).

DR-LUC Assay

DR-LUC Cells. Rat hepatoma cells (H4IIE) were stably transformed with pGudluc1.1 plasmid as previously described in (Hamers and others 2000; Murk and others 1996)

DR-LUC Assay. DR-LUC cells were grown in minimal essential medium (a-MEM, Gibco) with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco) and 500 mg of G418 (Geneticin, Gibco) per ml of medium, at a temperature of 37°C and 5% CO₂. DR-LUC experiments were performed in 96-well cell culture plates (Packard) in a-MEM without G418. H4IIE.Luc cells were seeded in 100 ml growth medium, after 24 h incubation the cell layer was 80–90% confluent (about 20000 cells per well), and 100 ml of fresh medium containing the test compound in maximal 1% DMSO was added to each well. After additional 24 h incubation, plates were rinsed twice with 0.5x PBS. To each well 30 ml lysis buffer (10 mM Tris, 2 mM dithiothreitol (DTT) and 2 mM 1,2,-diaminocyclohexane-N,N,N%, Ntetra-acetic acid, pH 7.8) was added, and after 10 min incubation on ice, the plates were placed at - 80°C for at least 30 min. For Luciferase measurement, the microtiter plate was inserted in a Luminometer (Luminometer, Labsystems) and 100 ml of luciferin assay mix (Promega) was added. The light output was measured using flash kinetics. Extracts were tested in triplicate, and to be able to correct for differences in quantification due to assay to assay variation, three TCDD calibration standards were measured with each assay. For calculation of DR-lucTEQs a standard curve of TCDD was fitted, and the DR-LucTEQ value for the unknown sample was interpolated on this curve in the area between the EC₅ and EC₅₀.

2.3 Calculation of BNF equivalents

BNF equivalents (BNF_{eq}) were defined as the concentration of BNF required to elicit the same response as the sample in a determined bioassay. To translate results from serial dilutions to BNF_{eq}, two methodologies were used. For AhR-RYA, a complete dose-response curve (including saturation and NOEC concentrations) was used to calculate assuming following a sigmoidal function,

$$R / R_{max} = 1 / (1 + Kd / [L])$$

in which R represents the observed biological response at a given ligand concentration (L) and R_{max} indicate the response at saturating concentrations of ligand. The parameter K_d represents the dissociation constant of the ligand-receptor complex; its value coincides with EC₅₀, which is equivalent to the ligand concentration giving 50% of the maximal response. When saturating response was not attainable with a given sample (either because it was too diluted or too toxic), the activity of positive control (BNF or TCDD) was used as asymptotic value. EC₅₀ values were converted to BNF_{eq} by comparing their response with the BNF EC₅₀ for each bioassay: AhR-RYA (23.7 µg/L), DR-LUC (42.8 µg/L), MolDarT-*cyp1a* (38.5 µg/L, data not shown).

Toxicity equivalents (TEQs) were calculated from the content of different samples in the parental PAHs phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, retene, benz[a]anthracene, chrysene+triphylene, benzo[b+j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[e]pyrene, benzo[a]pyrene, perylene, indeno[123-cd]pyrene, and benzo[ghi]perylene, (Querol and others 2011; van Drooge and others 2010), using the toxicity equivalence factors (TEF) from (Nisbet and LaGoy 1992).

2.4 Statistics

All statistical calculations, including linear and non-linear regression methods, were performed using the SPSS v. 17 package (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Unless otherwise noted, significance levels were set at P<0.01.

3. Results

3.1 Analysis of AhR-ligand activity in aerosol and coal burning particle extracts.

Extracts from four aerosol samples (A1-A4) and two coal combustion samples (DT2 and DT3) showed measurable dioxin-like response in all three quantitative assays: AhR-RYA, DR-Luc and MolDarT-cyp1a (Figure 1). Dose-response curves were very similar for AhR-RYA and DR-Luc,

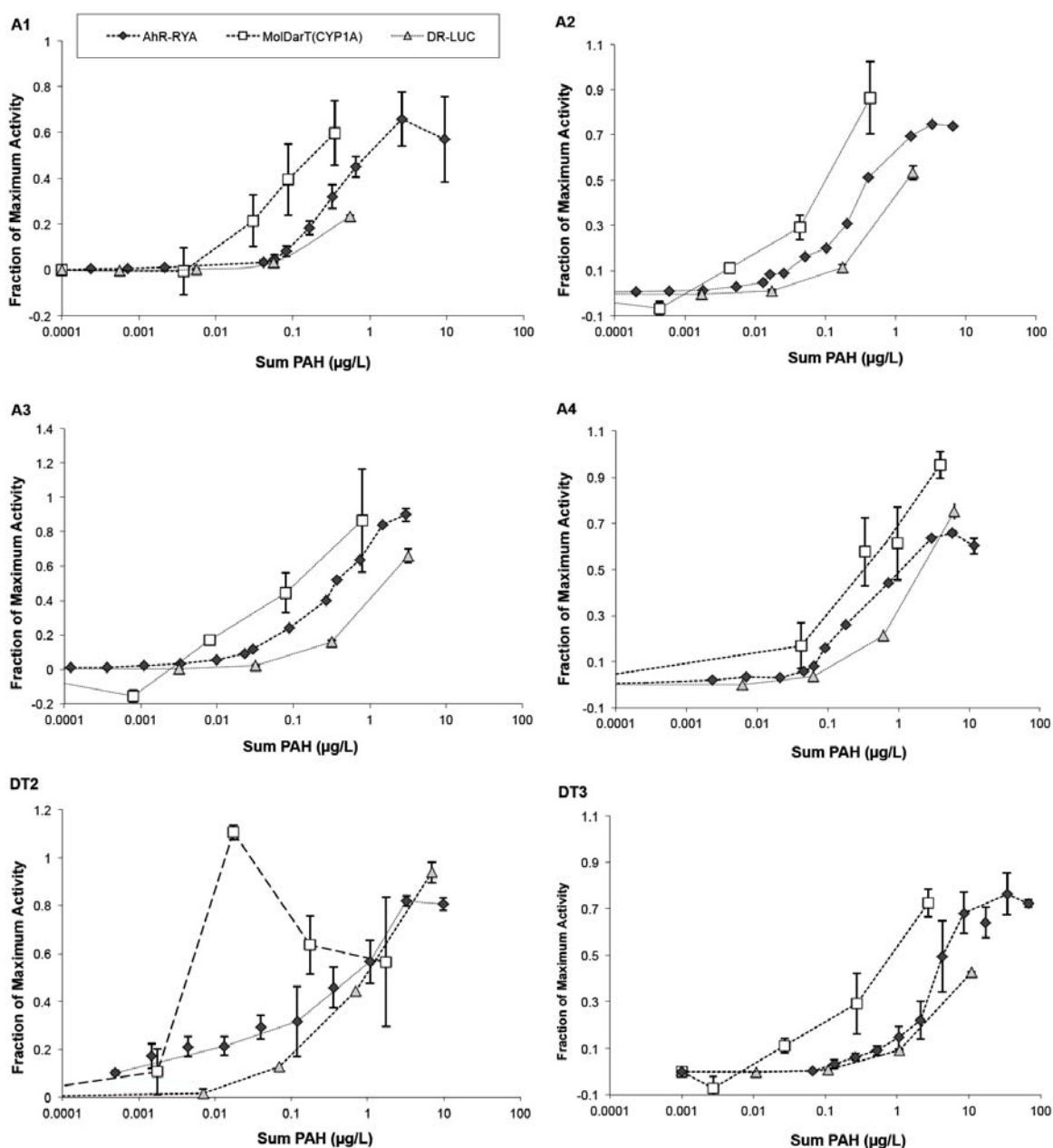


Figure 1. Dose-response graphs for the different air and burnt coal samples. The graph combines data from the three bioassays, the yeast based one (AhR-RYA, solid diamonds), expression of cyp1a in zebra fish embryos (MolDarT, empty squares) and the mouse cell-derived bioassay (DR-Luc, grey triangles). Data are expressed as fraction of the maximal activity of the positive control (BNF), bars indicate standard deviations. X-axis correspond to the calculated parental PAHs content for each sample and dilution.

whereas expression of *cyp1a* in zebrafish embryos appeared systematically more sensitive than the other two. Biological activity values, expressed as BNFeq, varied by more than one order of magnitude among samples in each method. The lowest activity corresponded to samples A1 and DT3, whereas samples A3, A4 (air) and DT2 (burnt coal, Table 1) showed the highest values. Biological activity correlated with parental PAHs content in the mother extracts for air samples (Table 1, see also (Olivares and others 2011)), but this correlation is completely lost in coal burnt samples: DT2 has lower PAH content than DT3, although its activity was at least 15 times higher for all assays. This difference was extreme in the case of the MolDarT-*cyp1a* assay, in which DT2 showed a dioxin-like activity much higher (10 fold or more) than any other sample, despite the relatively moderate PAH content of the corresponding extract (Table 1).

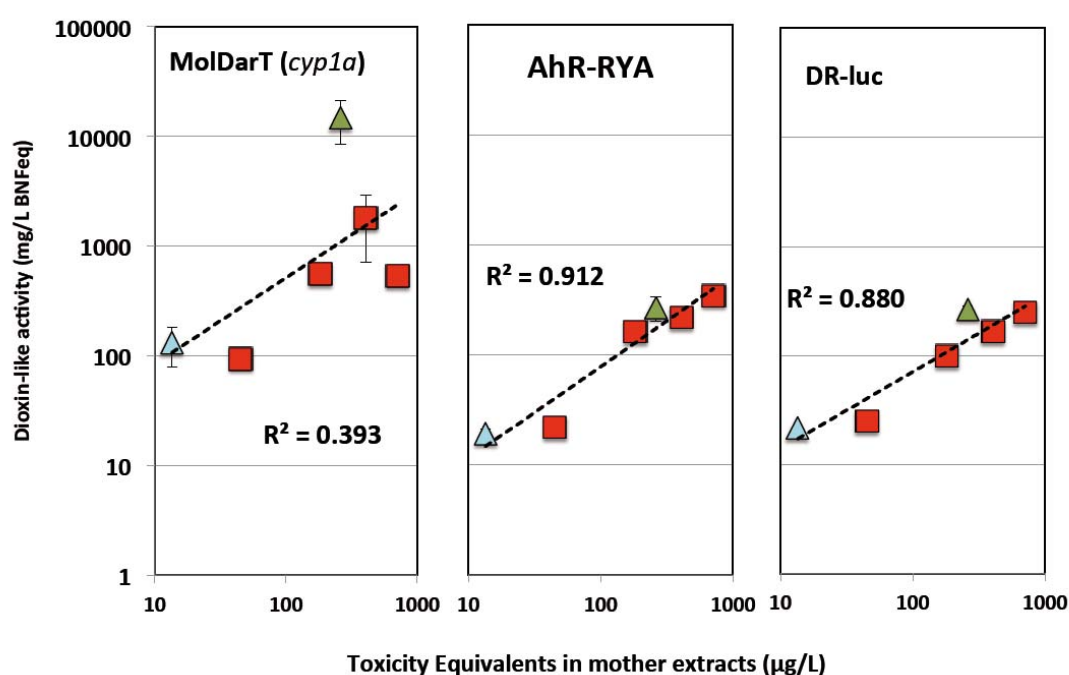


Figure 2. Correlation between the observed dioxin-like activity (in BNFeq, mg/L) of air and burnt coal samples and their predicted toxicity in TEQs ($\mu\text{g/L}$), calculated from their content in parental PAHs. The three panels show results from the different bioassays tested in this work. Red squares correspond to air samples from the Alps, triangles indicate burnt coal samples from China (DT2, dark green, DT3 light green). Bars indicate SD values for each BNFeq determination.

The correlation between the observed dioxin-like activity and the predicted one using TEF values for the different parental PAHs (Nisbet and LaGoy 1992) was excellent for the AhR-RYA, with a correlation coefficient above 0.90 (Figure 2, central panel). This is in agreement with the previous observation with air samples (Olivares and others 2011), but in this case the analysis included the burnt coal samples from China. This correlation was weaker, but still significant for the DR-luc assay, in which DT2 showed a dioxin-like activity slightly above the expected value attending its PAH composition (Figure 2, right panel). This tendency was exaggerated in the

zebrafish-based MolDarT-cyp1a assay, in which DT2 and DT3 values deviated completely from the air alpine samples (Figure 2, left panel). We concluded that a fraction of DT2 and, probably, DT3 dioxin-like activity was not directly linked to PAHs (or, at least, to the parental PAHs), undetected by the yeast assay and to which the zebrafish response system is particularly sensitive.

3.2 Induction of developmental malformations by aerosol and coal burning particle extracts.

Treatment of early zebrafish embryos with AhR ligands (either PAHs or organochlorine compounds) induced cardiac malfunctions (including a pericardial edema) and malformations on the mouth and the spinal cord (Figure 3 B-D), a phenomenon previously described (Alexeyenko and others 2010; Antkiewicz and others 2006; Scott and others 2011). A very similar, albeit mild, effects were observed when zebrafish embryos were exposed to DT2 extract (Figure 3E), but not to the rest of samples (data not shown). Table 1 shows NOAEL and LOAEL values for four known AhR ligand, PCB126, BNF, B[a]Pyr and B[k]Flu (expressed as µg/L), and the corresponding figures for all extracts (expressed as dilution factors). The higher activity of DT2 on promoting embryo malformations is consistent with its dioxin-like activity calculated by the different bioassays (Table 1). The highest dilution at which DT2 extract elicited embryo malformations (1:1500) corresponded to a dioxin-like activity of approximately 10 mg/L BNFeq in the MolDarT-*cyp1a* assay (Table 1), a value 70 times higher than the LOAEL for β-naphthoflavone (Table 2). This suggests that the combination of compounds putatively responsible for the embryonic effect were substantially less efficient than pure compounds.

Table2. Quantitative estimation of embryo toxicity

Substance	Unit	NOAEL	LOAEL
PCB126	µg/L	3.3	10
β-Naphthoflavone	µg/L	50	150
B[a]Pyr	µg/L	50	500
B[k]Flu	µg/L	50	500
A1	Dilution factor	1:500	n.d.
A2	Dilution factor	1:500	n.d.
A3	Dilution factor	1:500	n.d.
A4	Dilution factor	1:500	n.d.
DT2	Dilution factor	1:5000	1:1500
DT3	Dilution factor	1:500	n.d.

n.d., no effect detected

4. Discussion

Continuous exposure to airborne pollution represents a risk of cardiovascular and respiratory diseases and lung cancer (Perez and others 2009). Mortality in cities with high pollution load exceeds that observed in relatively clean cities, and improvements in urban air quality results in reduction of mortality by respiratory and cardiovascular illnesses (Clancy and others 2002; WHO 2004). Subchronic and chronic exposure to ambient air pollutants has been adversely associated to birth outcomes and infant health and development (Brauer and others 2008; Edwards and others 2010; Karr and others 2009). These effects have been linked traditionally to air levels of particulate matter, ozone and nitrogen dioxide (WHO 2004); however, there is an increasing amount of evidence that the presence of PAHs in the particulate matter component may be also relevant on evaluating health risks of poor air quality (Bostrom and others 2002; Edwards and others 2010; Pope and others 2002).

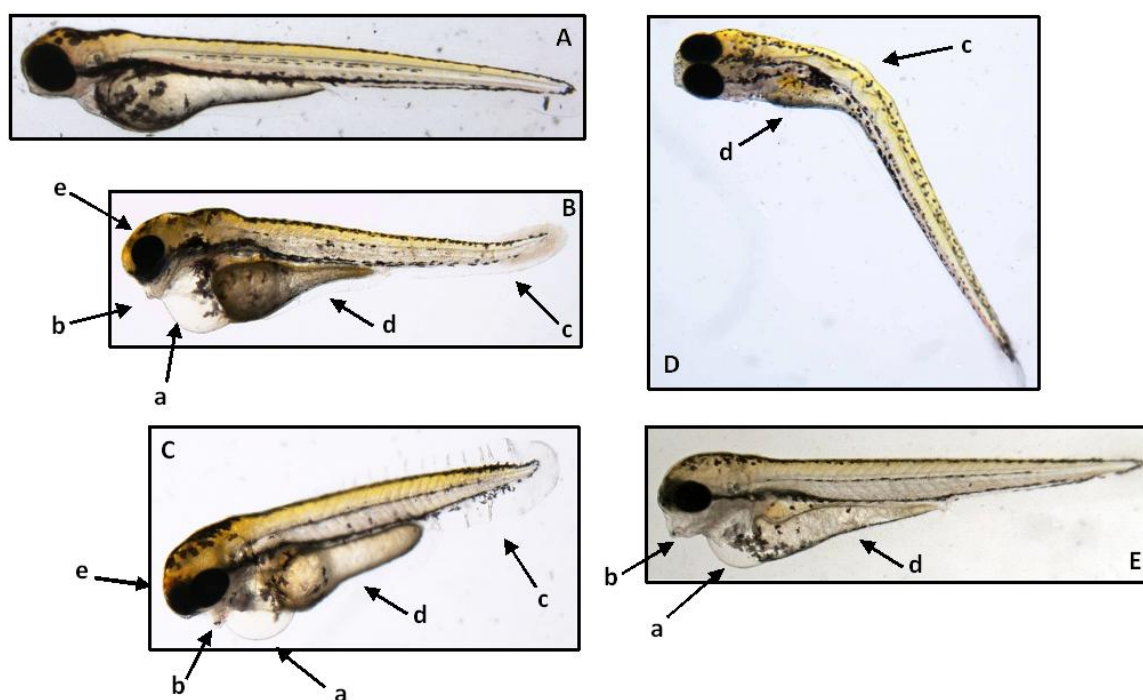


Figure 3. Typical deformation of 96 hpf zebrafish embryos exposed at the indicated concentrations of BaP (B), BkF (C), BNF (D) or the tar sample DT2 (E). A non-exposed, normal specimen is shown in (A). Arrows indicate (a) pericardial edema, (b) malformation of the lower jaw, (c) malformation of the tail, (d) colour of the yolk and (e) coagulation.

PAH in air particulate matter are not routinely quantified in air quality surveys, because its chemical determination is much more expensive and time consuming than calculating PM₁₀ indexes or ozone and nitrogen dioxide measurements. The implementation of high efficiency methods, like thermal desorption gas chromatography–mass spectrometry facilitates the analytical part, but they are still too expensive for routine analyses (van Drooge and others 2010). Bioassays based on the interaction of PAHs with the AhR are suitable alternatives, given the good correlation between the biological activity and the content of carcinogenic and mutagenic PAHs in air particles (Ciganek and others 2004; Clemons and others 1998; Hamers and others 2000; Machala and others 2001; Olivares and others 2011). In this study, the similar results obtained with mammalian cell- and yeast-based bioassays, indicate that both types of assays are equally suitable to evaluate AhR ligand activity in PAHs mixtures. Yeast assays are considerably cheaper and more scalable than cell assays; however, they are consistently less sensitive to dioxins and dioxin-like organochlorine compounds (unpublished observations).

Whereas single-cell bioassays provide a good estimate of the potential biological activity of samples, the assessment of actual toxicity requires more complex approaches. Mice are favourite laboratory animals, which can be exposed by inhalation, instillation or aerosolization (Costa and others 2006; Farina and others 2011). These methodologies mimic the natural ways of exposure, although the necessary setup prevents high-throughput approaches. Our approach of using zebrafish embryos to evaluate toxicity in aerosols and coal combustion residues has several advantages. Zebrafish embryos are becoming an important tool in ecotoxicology, as the easiness of their handling allows producing battery of tests at routine basis. They provide the unique opportunity to analyse survival, morphological alterations and specific gene expression in a single assay. Finally, and under the current legislation, assays performed before day 5 post-fertilization (dpf) are according with 3Rs principles (relative replacement of animal tests), a target for many international regulatory bodies (EC 2010; Embry and others 2010). Although the use of aquatic models precludes the analysis of lung toxicity, they are very adequate to evaluate the systemic effects of (air) pollution, like cardiovascular illnesses or adverse effects on the developing fetus (Jedrychowski and others 2004; WHO 2004). In this regard, is important to note that the two endpoints analyzed in zebrafish embryos, pericardion edema and spinal deformation, are related to two known major effects in humans.

Induction of CYP1A genes and/or associated enzymatic activities (particularly EROD activity) is a standard biomarker of exposure to organic pollution in general and to dioxine-like pollutants in many animal species, including fish (Whyte and others 2000) (Nebert and others 1993; Piña and others 2007), but it is not considered an adverse effect by itself. In fact, the deleterious effects associated to dioxin and dioxin-like compounds are attributed to their oxidation to mutagenic and carcinogenic chemical species (mainly radicals), a process facilitated by the

excess of oxidative enzymes (like CYP1A) brought upon by the ectopic activation of AhR. However, definite adverse effects (cardiac and skeletal deformation and edema) occur in zebrafish embryos as a consequence of the activation of the AhR per se, independently from the nature of the ligand (Carney and others 2006; Scott and others 2011), this study). In this regard, our finding that coal combustion samples also induced a similar edema in zebrafish embryos suggests that the simple presence of AhR ligands (either mutagenic or supposedly harmless) in the environment may be detrimental for fish reproduction. Given the increasing amounts of potential AhR ligands (PAHs, dioxins, coplanar and new generation substances) introduced in ecosystems, this may be a currently underestimated factor of the decline of fish populations world wide. Moreover, and given the similarities between fish and mammalian development, this finding may have implications on the evaluation of risk of organic compounds for human health.

Acknowledgement

This work has been funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2008-01898, CTM2011-30471-C02-01, CGL2011-29621) and the Generalitat de Catalunya (grant number 2009 SGR 924).

References

- Alexeyenko, A.; Wassenberg, D.M.; Lobenhofer, E.K.; Yen, J.; Linney, E.; Sonnhammer, E.L.L., et al. Dynamic Zebrafish Interactome Reveals Transcriptional Mechanisms of Dioxin Toxicity. *Plos One*. 5; 2010
- Antkiewicz, D.S.; Peterson, R.E.; Heideman, W. Blocking expression of AHR2 and ARNT1 in zebrafish larvae protects against cardiac toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicological Sciences*. 94:175-182; 2006
- Bostrom, C.E.; Gerde, P.; Hanberg, A.; Jernstrom, B.; Johansson, C.; Kyrklund, T., et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect*. 110 Suppl 3:451-488; 2002
- Brauer, M.; Lencar, C.; Tamburic, L.; Koehoorn, M.; Demers, P.; Karr, C. A cohort study of traffic-related air pollution impacts on birth outcomes. *Environ Health Perspect*. 116:680-686; 2008
- Carney, S.A.; Prasch, A.L.; Heideman, W.; Peterson, R.E. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology*. 76:7-18; 2006
- Ciganek, M.; Neca, J.; Adamec, V.; Janosek, J.; Machala, M. A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci Total Environ*. 334:141-148; 2004
- Clancy, L.; Goodman, P.; Sinclair, H.; Dockery, D.W. Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *Lancet*. 360:1210-1214; 2002

- Clemons, J.H.; Allan, L.M.; Marvin, C.H.; Wu, Z.; McCarry, B.E.; Bryant, D.W., et al. Evidence of estrogen- and TCDD-like activities in crude and fractionated extracts of PM10 air particulate material using in vitro gene expression assays. *Environmental Science & Technology*. 32:1853-1860; 1998
- Costa, D.L.; Lehmann, J.R.; Winsett, D.; Richards, J.; Ledbetter, A.D.; Dreher, K.L. Comparative pulmonary toxicological assessment of oil combustion particles following inhalation or instillation exposure. *Toxicological Sciences*. 91:237-246; 2006
- EC. Council Directive 2004/107/EC relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air. . In: Council E, ed. *Official Journal*, L 023, 26/01/2005, pp 3-6; 2004
- EC. Directive on the protection of animals used for scientific purposes. In: *Communities CotE*, ed. Directive 2010/63/EU. Brussels, Belgium; 2010
- Edwards, S.C.; Jedrychowski, W.; Butscher, M.; Camann, D.; Kieltyka, A.; Mroz, E., et al. Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Children's Intelligence at 5 Years of Age in a Prospective Cohort Study in Poland. *Environmental Health Perspectives*. 118:1326-1331; 2010
- Embry, M.R.; Belanger, S.E.; Braunbeck, T.A.; Galay-Burgos, M.; Halder, M.; Hinton, D.E., et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology*. 97:79-87; 2010
- EPA, U. Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In: *Development OoRa*, ed. <http://www.epa.gov>. Washington, DC: EPA; 1993
- Farina, F.; Sancini, G.; Mantecca, P.; Gallinotti, D.; Camatini, M.; Palestini, P. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection. *Toxicology Letters*. 202:209-217; 2011
- Fent, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*. 140-141:353-365; 2003
- Garrison, P.M.; Tullis, K.; Aarts, J.M.; Brouwer, A.; Giesy, J.P.; Denison, M.S. Species-specific recombinant cell lines as bioassay systems for the detection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like chemicals. *Fundam Appl Toxicol*. 30:194-203; 1996
- Goksoyr, A.; Forlin, L. The cytochrome -P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat Toxicol*. 22:287-311; 1992
- Gonzalez, F.J.; Fernández-Salguero, P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos*. 26:1194-1198; 1998
- Hamers, T.; van Schaardenburg, M.D.; Felzel, E.C.; Murk, A.J.; Koeman, J.H. The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution. *Sci Total Environ*. 262:159-174; 2000
- Hankinson, O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 35:307-340; 1995
- Hermesen, S.A.B.; van den Brandhof, E.J.; van der Ven, L.T.M.; Piersma, A.H. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*. 25:745-753; 2011
- Jedrychowski, W.; Bendkowska, I.; Flak, E.; Penar, A.; Jacek, R.; Kaim, I., et al. Estimated risk for altered fetal growth resulting from exposure to fine particles during pregnancy: An epidemiologic prospective cohort study in Poland. *Environmental Health Perspectives*. 112:1398-1402; 2004
- Karr, C.J.; Demers, P.A.; Koehoorn, M.W.; Lencar, C.C.; Tamburic, L.; Brauer, M. Influence of ambient air pollutant sources on clinical encounters for infant bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 180:995-1001; 2009
- Machala, M.; Vondracek, J.; Blaha, L.; Ciganek, M.; Neca, J.V. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res*. 497:49-62; 2001

- McClain, J.S.; Oris, J.T.; Burton, G.A., Jr.; Lattier, D. Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem.* 22:361-370; 2003
- Miller, C.A., 3rd. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem.* 272:32824-32829; 1997
- Misaki, K.; Kawami, H.; Tanaka, T.; Handa, Y.; Nakamura, M.; Matsui, S., et al. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 26:1370-1379; 2007
- Murahashi, T.; Watanabe, T.; Kanayama, M.; Kubo, T.; Hirayama, T. Human aryl hydrocarbon receptor ligand activity of 31 non-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons as soil contaminants. *Journal of Health Science.* 53:715-721; 2007
- Nagel, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex.* 19:38 - 48; 2002
- Nebert, D.W.; Puga, A.; Vasiliou, V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci.* 685:624-640; 1993
- Nisbet, I.C.; LaGoy, P.K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP.* 16:290-300; 1992
- Noguerol, T.; Boronat, S.; Jarque, S.; Barceló, D.; Piña, B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *TALANTA.* 69:359-358; 2006a
- Noguerol, T.N.; Boronat, S.; Casado, M.; Raldua, D.; Barcelo, D.; Pina, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal Bioanal Chem.* 385:1012-1019; 2006b
- Olivares, A.; Van Drooge, B.L.; Pérez Ballesta, P.; Grimalt, J.O.; Piña, B. Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assays. *Atmospheric Environment.* 45:271-274; 2011
- Perez, L.; Medina-Ramon, M.; Kunzli, N.; Alastuey, A.; Pey, J.; Perez, N., et al. Size fractionate particulate matter, vehicle traffic, and case-specific daily mortality in Barcelona, Spain. *Environ Sci Technol.* 43:4707-4714; 2009
- Piña, B.; Casado, M.; Quirós, L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *Trac-Trends in Analytical Chemistry.* 26:1145-1154; 2007
- Pope, C.A., 3rd; Burnett, R.T.; Thun, M.J.; Calle, E.E.; Krewski, D.; Ito, K., et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 287:1132-1141; 2002
- Querol, X.; Izquierdo, M.; Monfort, E.; Alvarez, E.; Font, O.; Moreno, T., et al. Environmental characterization of burnt coal gangue banks at Yangquan, Shanxi Province, China. *International Journal of Coal Geology.* 75:93-104; 2008
- Querol, X.; Zhuang, X.; Font, O.; Izquierdo, M.; Alastuey, A.; Castro, I., et al. Influence of soil cover on reducing the environmental impact of spontaneous coal combustion in coal waste gobs: A review and new experimental data. *International Journal of Coal Geology.* 85:2-22; 2011
- Schauer, J.J.; Kleeman, M.J.; Cass, G.R.; Simoneit, B.R. Measurement of emissions from air pollution sources. 3. C1-C29 organic compounds from fireplace combustion of wood. *Environ Sci Technol.* 35:1716-1728; 2001
- Schauer, J.J.; Kleeman, M.J.; Cass, G.R.; Simoneit, B.R. Measurement of emissions from air pollution sources. 5. C1-C32 organic compounds from gasoline-powered motor vehicles. *Environ Sci Technol.* 36:1169-1180; 2002

- Schoeters, G.; Goyvaerts, M.P.; Ooms, D.; Van Cleuvenbergen, R. The evaluation of dioxin and dioxin-like contaminants in selected food samples obtained from the Belgian market: comparison of TEQ measurements obtained through the CALUX bioassay with congener specific chemical analyses. *Chemosphere*. 54:1289-1297; 2004
- Scholz, S.; Fischer, S.; Gundel, U.; Kuster, E.; Luckenbach, T.; Voelker, D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int*. 15:394-404; 2008
- Scholz, S.; Mayer, I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol Cell Endocrinol*. 293:57-70; 2008
- Scott, J.A.; Incardona, J.P.; Pelkki, K.; Shepardson, S.; Hodson, P.V. AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. *Aquatic Toxicology*. 101:165-174; 2011
- Shimizu, Y.; Nakatsuru, Y.; Ichinose, M.; Takahashi, Y.; Kume, H.; Mimura, J., et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:779-782; 2000
- Stegeman, J.J.; Goldstone, J.V.; Hahn, E. Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology. In: StF. Perry ME, AP Farrell, Colin JB, eds. *Fish Physiology*: Academic Press; 2010
- van Drooge, B.; Nikolova, I.; Ballesta, P. Thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry as an enhanced method for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons from ambient air particulate matter *J Chromatogr A*. 1216:4030-4039; 2010
- Voelker, D.; Vess, C.; Tillmann, M.; Nagel, R.; Otto, G.; Geisler, R., et al. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquat Toxicol*. 81:355 - 364; 2007
- Wenger, D.; Gerecke, A.C.; Heeb, N.V.; Hueglin, C.; Seiler, C.; Haag, R., et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of atmospheric particulate matter from an urban and a rural site in Switzerland. *Atmospheric Environment*. 43:3556-3562; 2009
- WHO. Health aspects of air pollution. Copenhagen, Denmark; 2004
- Whyte, J.J.; Jung, R.E.; Schmitt, C.J.; Tillitt, D.E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol*. 30:347-570; 2000

V. RESUM DELS RESULTATS I DISCUSSIÓ

V. Resum dels resultats i discussió

Els contaminants ambientals capaços d'unir-se al Receptor d'hidrocarburs d'Arl i induir la seva activació ectòpica són molt diversos i es troben àmpliament distribuïts per tota la biosfera. L'exposició continuada a aquest tipus de compostos s'ha vist relacionada amb l'augment de malalties cardiovasculars i càncer. Així mateix, també hi ha indicis de que siguin capaços d'afectar el sistema immune i tiroideu, així com causar problemes de desenvolupament.

Els mètodes d'anàlisi estàndards per a la monitorització ambiental són, principalment, anàlisis químiques, l'observació d'efectes directes i bioassaigs de toxicitat general (supervivència) en animals. No obstant, aquests mètodes o tenen un cost elevat, o el processament de mostres és lent i/o costós. A més, solen infravalorar els efectes dels compostos amb activitat tipus dioxina degut a que els assaigs utilitzats solen ser clorofícies (algues unicel·lulars) o *Dafnia* (crustaci), que no tenen el mecanisme d'activació de l'Ahr propi dels vertebrats i que és una part essencial del mecanisme de toxicitat d'aquests compostos als vertebrats.

L'objectiu d'aquesta tesi és presentar bioassaigs basats en l'activació de l'Ahr per detectar la presència de contaminants amb activitat tipus dioxina com una eina que permeti una detecció ràpida, amb elevat processament de mostres i a baix cost que, a més, inclogui informació sobre la seva implicació d'efectes biològics.

V.1. Estandardització, validació i aplicació dels bioassaigs basats en llevat i embrions de peix Zebra per a la monitorització de l'impacte ambiental per activitat tipus dioxina.

Les zones escollides per a l'estudi de l'impacte ambiental de contaminants amb activitat tipus dioxina es caracteritzen per ser llocs d'interès degut a la seva importància ecològica i socio-econòmica així com per haver-hi detectat focus de contaminació importants i/o constants d'aquest tipus de substàncies. Aquest és el cas de l'embassament de Flix a la part baixa del riu Ebre, de l'estuari d'Urdaibai (declarat reserva de la biosfera per la UNESCO al 1984), de la vall del Po, al sud dels Alps a Itàlia i de la zona minera al districte de Datong a Xina.

Una altra característica decisòria per a utilitzar aquests estudis com a sistemes d'estandardització dels biassaigs en llevat i embrions de peix Zebra, és el fet que representen les principals matrius per on solen transportar-se els contaminants tipus dioxina i interaccionar amb els organismes vertebrats: sediments als medis aquàtics (fluvial i marí), el partículat de l'aire i el sòl.

La biota també representa un compartiment molt important per compostos tipus dioxina que no s'eliminen fàcilment pel sistema de detoxificació cel·lular com és el cas dels compostos orgànics halogenats. En aquests casos, es recomana utilitzar biomarcadors directament sobre els animals d'interès d'estudi (activitat enzimàtica (ex. EROD) o nivells d'expressió de gens diana (ex. cyp1a) així com l'anàlisi d'efectes directes (pes, mida, malformacions i danys, proporcions de sexe, etc.).

V.1.1 Estudi de l'Impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'embassament de Flix i la part baixa del riu Ebre.

L'Ebre és el riu amb major cabal d'Espanya i amb un elevat interès per ser una de les principals fonts d'aigua potable i de regadiu així com una reserva ecològica important. Al llarg del riu, es situen diversos nuclis urbans i industrials a més de grans zones de conreu que utilitzen els seus recursos hídrics.

El centre d'aquest estudi es situa a l'embassament de Flix on, des de principis del segle XX, opera una indústria química de producció de compostos clorats. Al llarg dels anys, aquesta fàbrica ha abocat els residus directament al riu (dintre dels marges legals de cada època) i, amb la construcció de la presa de Flix als anys 60, aquests residus han anat sedimentant a la llera dreta del riu formant un delta. Actualment, aquest delta artificial compta entre 20.000-36.000 tones de sediments dels quals de 1-10 tones corresponen a compostos organoclorats principals i de 10-70 tones als metalls més abundants (Grimalt, 2003).

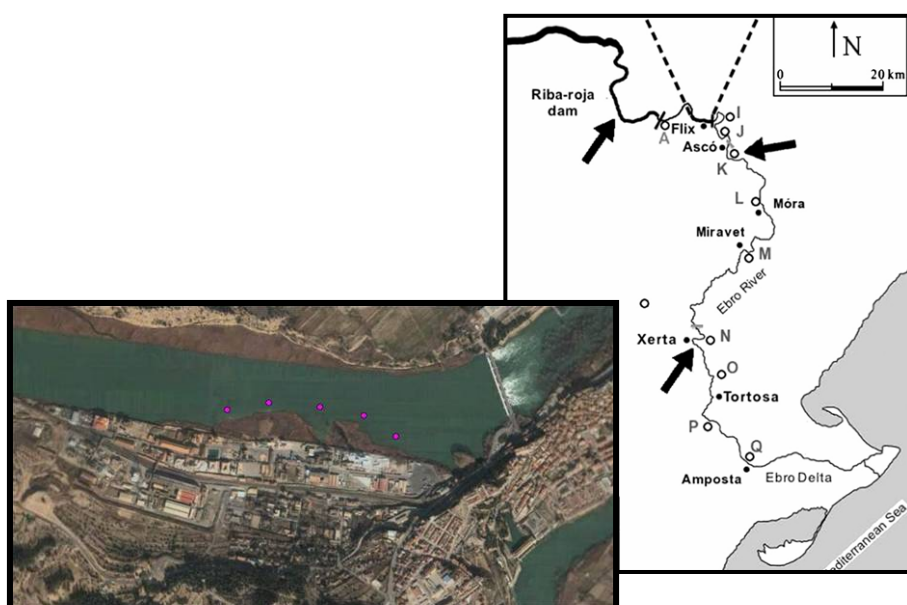


Figura V.1. Llocs de mostreig a la part baixa del riu Ebre i foto a vista d'ocell de l'embassament de Flix.

Per tal d'estudiar l'activitat tipus dioxina d'aquests residus així com el seu transport aigües avall, es van agafar mostres de sediments superficials des d'aigües amunt, al pantà de Riba-Roja [A], que compta amb un ecosistema saludable, i fins a prop de la desembocadura a Amposta [I-Q] (Article 1 i 2). A Flix, s'han recollit mostres de sediments superficials a l'entrada [B] i sortida [H] de l'embassament així com directament dels residus sedimentats d'on es van obtenir 5 testimonis cilíndrics des de la part més propera a l'entrada del pantà fins a la part de la sortida [C-G]. Aquests testimonis, de 1,2 a 3,5 metres de profunditat, es van estratificar per estudiar les diferències d'acumulacions de compostos en els diferents períodes de producció. Els anàlisis químics i d'activitat tipus dioxina per AhR-RYA es van realitzar tan per les mostres estratificades (dades no mostrades) com per cada testimoni en conjunt (Article 1). Així mateix, com a espècie sentinella, es van utilitzar tres poblacions de Carpes comuns, separades per les presses de Riba-Roja i Xerta i l'assut d'Ascó. Per altra banda, en aquest estudi no es van recollir mostres d'aigua perquè aquestes s'analitzen setmanalment per la Confederació Hidrogràfica de l'Ebre i, es necessari destacar, que no es sol trobar contaminació ni per compostos organoclorats, ni per metalls.

La caracterització dels sediments recollits al llarg de la part final del riu Ebre (90 km fins a la desembocadura) per activitat tipus dioxina mitjançant l'anàlisi químic (Organoclorats) i diferents bioassaigs (AhR-RYA i RTG2-EROD) així com, l'anàlisi de les poblacions de Carpes tan per determinar efectes biològics directes (micronuclis (danys a DNA), Factor de Condició i Índex Hepatosomàtic) com indirectes (activitat i expressió del gen *cyp1a* mitjançant EROD i RT-qPCR), mostren que els residus sedimentats a Flix representen un important focus de contaminació de compostos organoclorats que afecten negativament a la salut de les poblacions dels peixos que viuen a la zona de l'embassament i el meandre d'Ascó. En aquesta zona és on també s'observa una major activitat tipus dioxina per part dels dos bioassaig (AhR-RYA i RTG2-EROD) als sediments. Per altra banda, a prop de Mora d'Ebre (L) i Xerta (N) sembla que hi ha algun focus de contaminants tipus dioxina que no està relacionat amb els sediments de Flix (no s'observa la presència d'OCs) de manera que es recomana revisar els sistemes de depuració d'aigües urbanes o industrials per detectar el focus d'aquesta contaminació (Figura V.2).

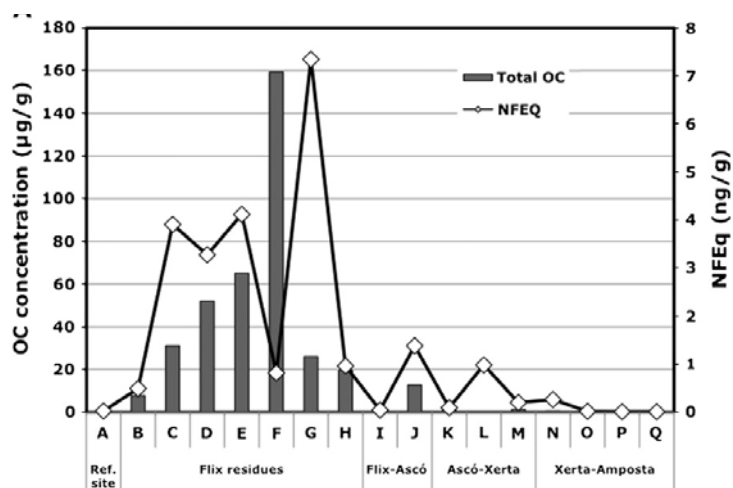


Figura V.2. Concentració d'organoclorats ($\mu\text{g/g}$) i activitat tipus dioxina (NFEQ; ng/g) respecte als llocs de mostreig dels sediments

Pel que fa a la zona del Delta de l'Ebre, es pot veure com els nivells d'activitat són semblants als obtinguts al pantà de Riba-Roja, el que indica que aquesta zona que combina activitat agrària amb un Parc Natural, no sembla afectada per aquest tipus de contaminants. No obstant, es necessari tenir molt present que la gran acumulació de contaminants aigües amunt del delta (Pantà de Flix) representa un elevat risc si es té en compte que el riu Ebre pateix variacions de cabal al llarg de l'any. També s'ha de valorar el risc que representa un hipotètic trencament de la pressa de Riba-Roja que arrossegaria grans quantitats de contaminants per tot el tram final de riu Ebre fins al Delta i el Mar Mediterrani. La retirada dels residus, actualment en curs, es va definir com l'única solució definitiva contra aquestes amenaces.

V.1.2 Estudi de l'Impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'Estuari d'Urdaibai (País Basc)

L'estuari d'Urdaibai es situa a la badia de Biscaia, al País Basc. Aquesta zona - declarada reserva de la biosfera al 1984 - conviu amb el nucli urbà i industrial de Gernika-Lumo (metal·lúrgiques i drassanes, entre altres) així com zones de cultiu i d'oci. A partir d'estudis anteriors i tenint en compte les principals fonts de contaminants d'aquesta zona, es coneix que la contaminació per PAHs és una de les principals problemàtiques i que la seva monitorització és necessària per tal de mantenir un equilibri entre l'activitat humana i un ecosistema saludable.

Es van recollir mostres de sediments de superfície al llarg de l'estuari: tres punts interiors (Gernika (**A**), Artega (**B**) i Murueta (**C**)) i tres punts exteriors (Txatxarramendi (**D**), Mundaka (**F**) i Laida (**E**)), amb especial interès per Gernika com a població gran, Murueta per l'indústria de

drassanes i Mundaka per la pesca, agricultura i turisme (tràfic marítim). Per altra banda, es va agafar una mostra de sediments al port d'Arriluze (**G**, l'estuari de d'Abra) conegut per ser una zona amb elevada contaminació per PAHs i així poder comparar els valors obtinguts a Urdaibai.

A més, es van mostrejar dos poblacions de Llissa vera (peix bentònic que viu en aquestes zones) prop de Gernika-Lumo i al port d'Arriluze, com a espècie sentinella. La recollida de les mostres es va repetir als mateixos punts en 3 campanyes dutes a terme durant un any per tal d'observar l'evolució dels PAHs i veure similituds i diferències segons l'època de l'any (Abril 2007, Octubre 2007 i Abril 2008). Els sediments es van analitzar químicament per determinar PAHs i, mitjançant l'assaig d'AhR-RYA, per l'activitat tipus dioxina. Les mostres de bilis de Llissa vera es van analitzar químicament per determinar les concentracions de PAHs metabolitzats.

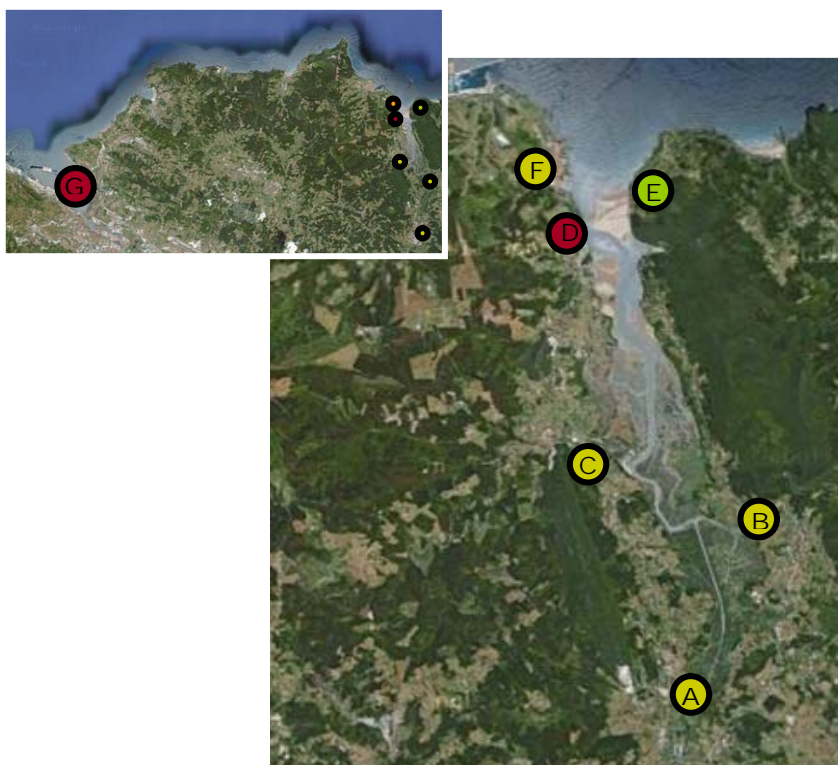


Figura V.3. Estuari d'Urdaibai i d'Abra amb els punts de mostreig senyalats.

A partir d'aquest estudi a l'Estuari d'Urdaibai, es va poder determinar que la zona amb major contaminació es troba a l'illa de Txatxarramendi (**D**) on s'observen una composició química i uns valors d'activitat tipus dioxina similars o superiors als obtinguts al port d'Arriluze (**G**) (Figura VI.3). En canvi, la regió interior de l'estuari (**A-C**), amb més pressió tan pel nucli urbà com industrial, presenta uns valors de PAHs relativament baixos i una activitat tipus dioxina moderada. Les diferències entre l'activitat tipus dioxina determinada per l'assaig AhR-RYA (NFQs) i la calculada a partir de la composició química (TEQ) indiquen que els PAHs presents a

la zona no representen tots els contaminants amb activitat tipus dioxina que es troben a les mostres. Aquestes dades també es veuen reflectides a les proporcions de metabòlits presents a la bilis de la població de Lissa vera a Gernika-Lumo. En aquesta població, el 2-naftol és troba com a metabòlit predominant en detriment de l'1-naftol. Aquest desequilibri sembla indicar que una part important del 2-naftol present a la bilis dels peixos no prové del metabolisme dels PAHs i, per tant, suggereix que hi ha un segon origen de contaminació significativa en aquesta zona.

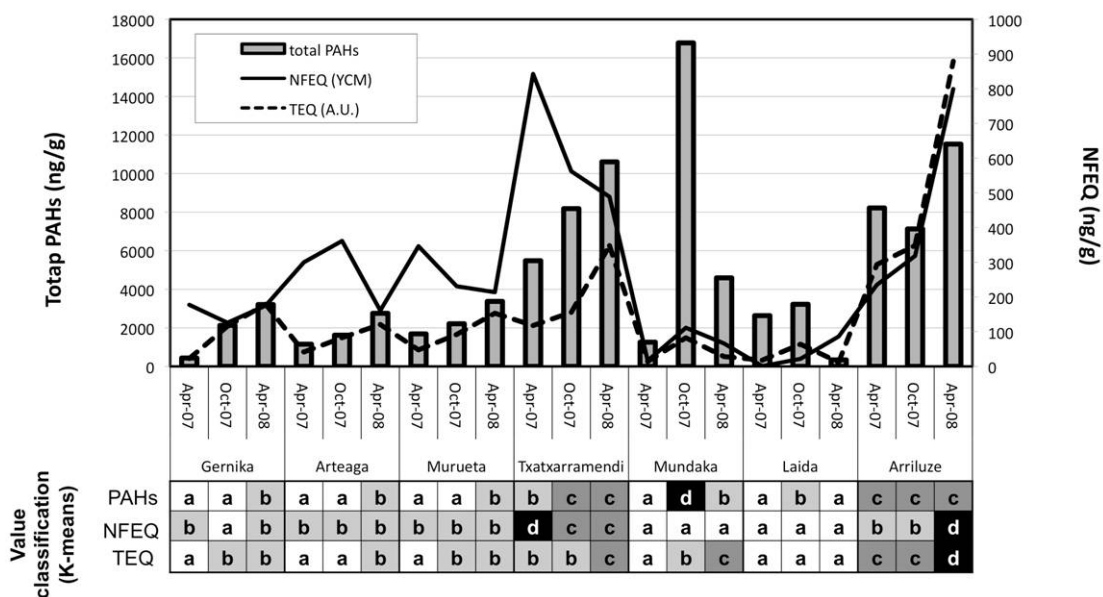


Figura V.4. Concentració de PAHs total (ng/g) i activitat tipus dioxina observada (NFQs; ng/g) i estimada (TEQ; ng/g) respecte les zones de mostreig i les tres campanyes de recollida de sediments. A la part inferior, estudi estadístic de les diferències significatives entre els tres anàlisis.

Pel que fa a la part exterior de l'estuari, la quantitat de PAHs és força semblant a l'observada a la part interna però la seva activitat biològica, determinada per l'assaig de llevat o per la conversió de les concentracions químiques, presenta uns valors molt baixos. Aquest resultat indica que els PAHs presents en aquesta zona segurament provenen de vessaments locals amb menor activitat tipus dioxina, sobretot, en cas del pic de PAHs observat a l'octubre de 2007.

A partir d'aquestes dades, es recomana un estudi més ampli de la zona de Txatxarramendi així com la monitorització continuada d'aquesta zona ja que la presència constant de metabòlits de PAHs presents a la bilis de la Lissa vera indica que existeixen fonts de contaminació constants de PAHs.

V.1.3 Estudi de l'Impacte ambiental per activitat tipus dioxina en mostres atmosfèriques i la seva comparació amb residus miners dipositats al sòl.

La vall del Po situada al sud dels Alps (Nord d'Itàlia) es caracteritza per ser una zona semi-rural amb una ampla variació i gradient de contaminació atmosfèrica segons l'època de l'any. Aquesta contaminació prové, principalment, per processos de combustió incompleta (tràfic rodat i crema de fusta a les llars de foc) i s'accentua per les condicions climatològiques a l'hivern (inversions tèrmiques) que impedeixen la dispersió dels contaminants emesos a les capes superiors de l'atmosfera.

Per tal d'estudiar la variació d'activitat biològica segons els nivells de PAHs mesurats (associat al particulat de l'aire) així com per veure si existeixen diferències entre l'activitat tipus dioxina per part dels PAHs que provenen del tràfic rodat o de la crema de fusta, es van analitzar mostres del particulat d'aire recollides entre setembre de 2008 i febrer de 2009 (mesos que presenten la major quantitat de PAHs; van Drooge i Pérez-Ballesta, 2009) mitjançant anàlisis químic per PAHs i levoglucosan (sucre emès per la crema de fusta) així com per AhR-RYA (Article 4).

Per altra banda, es van escollir quatre mostres amb activitat tipus dioxina (AhR-RYA) diferents i dos mostres provinents dels residus miners al districte de Datong a la província de Shanxi (Xina) que es van analitzar pels bioassaig en cèl·lules de llevat (AhR-RYA) i de vertebrat (DR-LUC) i pels assaigs amb embrions de peix zebra (MolDarT-Short *cyp1a* i efectes adversos directes) (Article 5).

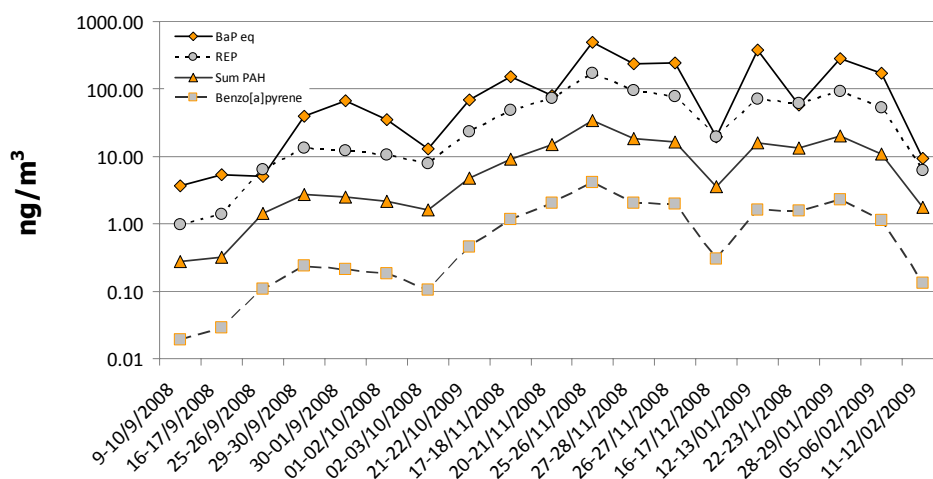


Figure V.5. Concentració en (ng/m³) dels perfils de BaP eq (bioassaig AhR-RYA), suma de PAHs, Benzo[a]piré i Equivalents Tòxics calculats a partir dels coeficients de REP (REP) durant el període de mostreig de setembre de 2008 fins a febrer de 2009.

A partir dels resultats obtinguts, es va poder observar una bona correlació entre l'activitat dioxina determinada per AhR-RYA i la quantitat de PAHs però, sobretot, per l'activitat estimada com a equivalents de B[a]pyr. La correlació amb el partícultat de l'aire (PM₁₀), tot i ser elevada, és força menor ja que part del partícultat és inert o té altre tipus d'activitat biològica (Figura V.6). Pel que fa a les dues fonts d'emissió, es pot observar a la mateixa Figura que no hi ha diferències significatives entre l'activitat tipus dioxina, tan si les emissions provenen de la crema de fusta o de derivats del petroli. Això indicaria que ambdós tipus d'emissions tenen una toxicitat similar i per tant, representen un risc semblant per la salut.

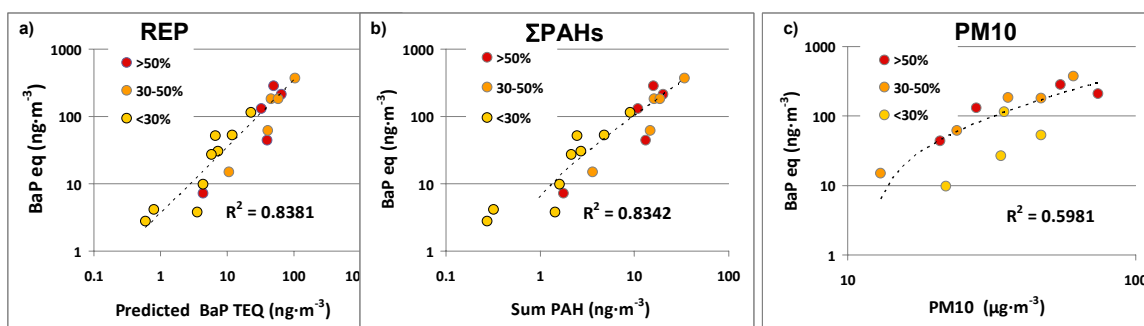


Figure V.6. Correlacions linears entre: a) REP predits (ng/m^3) segons dels nivells de PAHs i utilitzant coeficients de REP, b) ΣPAH_{13} mesurats per TD-GC-MS (ng/m^3) i c) concentració de PM₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) versus els BaPeq (ng/m^3) determinats pel bioassaig AhR-RYA bioassaig. (●, ●, ●) Contribució de la combustió de fusta per cada mostra estimada respecte el contingut total de PAH en %.

Pel que fa a la determinació d'activitat biològica mitjançant les cèl·lules de llevat (AhR-RYA), de vertebrat (DR-LUC) i la inducció de *cyp1a* en embrions de peix Zebra (MolDarT-Short (*cyp1a*)), es pot observar com els tres bioassaigs presenten un perfil d'activitat similar per totes les mostres tot i que, l'assaig MolDarT (*cyp1a*) mostra una major sensibilitat que l'AhR-RYA i el DR-LUC (Figura V.7). Pel que fa a l'anàlisi concret de les mostres, es pot observar com la mostra amb una major concentració de PAHs (27-28/11/2008) és la que presenta menor activitat tipus dioxina per tots tres bioassaig.

En aquesta mateixa direcció, les dos mostres incorporades a l'estudi, que provenen dels residus miners del carbó, amb una elevada concentració de PAHs però en proporcions heterogèniques dels congèneres, presenten activitats biològiques molt diferents (Figura V.7).

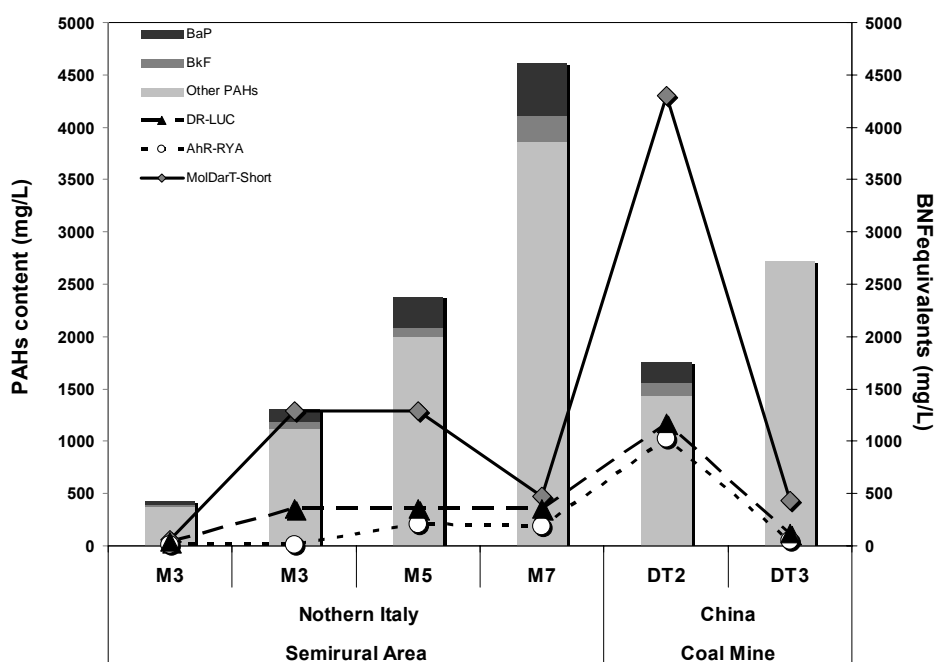


Figure V.7. Comparació del contingut en PAHs (mg/L) fraccionat en Benzo[a]pirè (BaP), Benzo[k]fluorantè i resta de PAHs amb l'activitat tipus dioxina mesurada en equivalent de (β -Naftoflavona (BNFequivalents; mg/L) pels bioassaigs DR-LUC, AhR-RYA i MolDarT-S (cyp1a).

La mostra amb una concentració major de PAHs total (DT3) té una activitat baixa similar a la mostra 27-28/11/2008. En canvi, la mostra amb menor quantitat de PAHs (DT2) és la mostra amb major activitat de tots els bioassaigs amb diferència. Aquests resultats mostren clarament la necessitat d'incloure bioassaigs a l'hora d'estudiar l'impacte ambiental, ja que no sempre es pot predir els contaminants presents a les mostres.

Finalment, si es comparen els resultats obtinguts mitjançant els tres bioassaigs d'efectes indirectes amb l'assaig en embrions de peix zebra on s'avaluen el desenvolupament i les malformacions, es pot veure com només la mostra DT2 que presenta una activitat tipus dioxina clarament més elevada que la resta té efectes als embrions, a la màxima concentració possible (1:500 de la mostra original; Figura V.8). També cal destacar que aquests efectes són molt similar als observats per β -NF i B[a]pyr: malformacions associades amb el sistema circulatori (edema de pericardi i coagulacions) i deformació de la mandíbula inferior, tot i que encara no presenta deformacions vertebrals greus com en el cas del compostos estàndards.

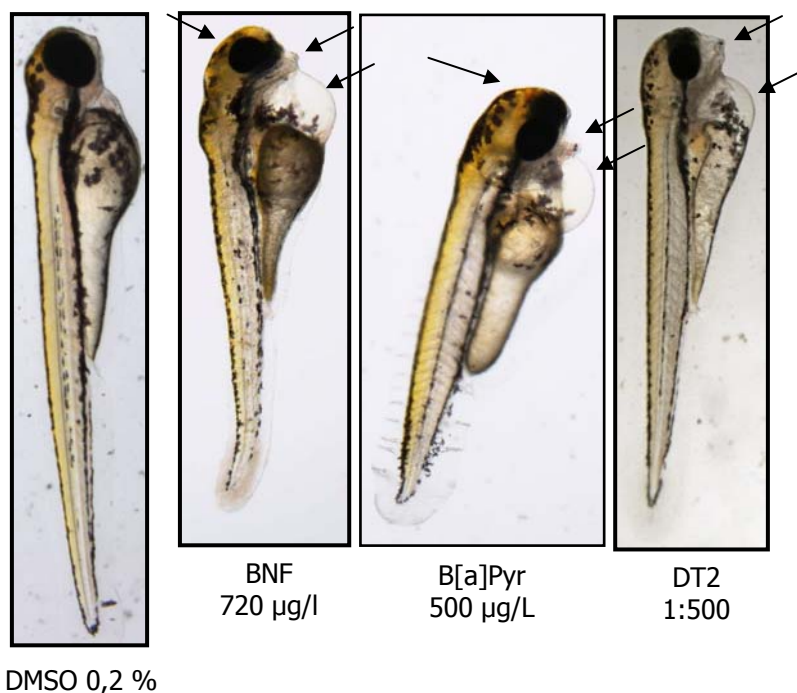


Figure V.8. Observació d'efectes adversos directes a 96 hpf d'incubació amb DMSO (0,2%), com a control negatiu, β Naftoflavona (750 μ g/L), Benzo[a]pirè (500 μ g/L) i l'extracte de la mostra de Xina (DT2) a una dilució 1:500 de l'extracte original. Les fletxes indiquen l'edema de pericardi, malformació de la mandíbula inferior i coagulacions.

V. 1.4 Estandardització de l'assaig basat en llevat per activitat tipus dioxina.

Els estudis de l'impacte ambiental requereixen d'anàlisis complementaris que tinguin en compte des de la determinació química fins a l'activitat biològica mitjançant assaigs que incloguin els diferents nivells tròfics. Tot i així, els recursos econòmics i de temps per monitoritzar la contaminació a zones d'interès, ja sigui per salut humana o conservació d'espais naturals, són escassos i, per tant, es necessari establir l'aplicació de mètodes econòmics i ràpids que permetin realitzar controls de forma rutinaria.

Aquest és el cas del sistema basat en llevat que es presenta en aquesta tesi (AhR-RYA). Als tres estudis ambientals realitzats, on es troben representades les matrius més comuns per a contaminants ambientals del tipus dioxina, el sistema AhR-RYA ha sigut capaç de determinar l'activitat biològica depenent dels nivells de contaminants presents a la mostra (determinats químicament) així com ampliar el seu espectre de detecció a contaminants que no s'han tingut en compte en l'anàlisi. Així mateix, la resposta obtinguda per l'AhR-RYA és molt semblant a l'obtinguda pels altres bioassaigs presentats als estudis com els assaigs basats en cèl·lules de vertebrat (RTG2-EROD i DR-LUC), el nou bioassaig en embrions de peix zebra (expressió *cyp1a*) o els bioindicadors i biomarcadors utilitzats a les espècie sentinelles (Carpa comú i Lissa vera;

EROD, expressió de *cyp1a*, metabòlits dels PAHs, nivells de micronuclis, el Factor de Condició i l'Índex Hepatosomàtic).

Pel que fa al tipus de contaminant, els bioassaig AhR-RYA és molt més sensible als PAHs, (sobretot els que provenen dels processos de combustió) que als compostos organoclorats, al contrari que altres bioassaigs ja siguin basats en cèl·lules (RTG2-EROD i DR-LUC) o en animals (MolDarT-Short (*cyp1a*)). Tot i així, a l'estudi de l'Ebre i l'embassament de Flix, la resposta a organoclorats és molt semblant a l'obtinguda per l'RTG2-EROD i concorda, en gran mesura, amb la concentració d'OCs mesurada químicament. No obstant, el seu comportament davant de mostres molt complexes (elevat número de contaminants en quantitat i variabilitat) com és el cas dels residus sedimentats de l'embassament de Flix (sobretot la mostra F), es pot observar una disminució significativa de l'activitat tipus dioxina que sembla associada directament a la toxicitat general de la mostra (dades no mostrades). Tot i així, tenint en compte que el llevat és un organisme força robust, és molt possible que aquestes mostres siguin encara més tòxiques per assaigs en cèl·lules de vertebrats o en embrions de peix zebra.

Pel que fa a la comparació de les matrius d'on provenen les mostres ambientals, s'ha vist que - a excepció de les mostres d'aigua - es recomana l'extracció per solvents orgànics perquè permeten obtenir una major quantitat de compostos amb activitat tipus dioxina, majoritàriament compostos orgànics. En el cas de l'aigua, s'ha de tenir en compte que els contaminants que es volen detectar solen ser apolars de manera que es recomana la filtració del particulat dissolt en l'aigua per extreure-ho mitjançant solvents orgànics, mentre que la fase d'aigua filtrada es pot concentrar amb cartutxos de carbó actiu (dades no mostrades). Tot i així, quan es treballa amb mostres ambientals, cal tenir molt present que les quantitats de mostra són petites de manera que els volums i concentracions d'assaig són limitats. Per aquesta raó, els bioassaigs en cèl·lules solen ser molt útils ja que es treballa amb volums petits.

El fet que l'AhR-RYA presenti una resposta similar a la resta de bioassaigs en espècies molt diverses i tenint en compte que permet processar un elevat número de mostres amb un cost baix, així com la seva simplicitat per interpretar els resultats obtinguts, el senyalen com a un

bioassaig rutinari adient per estudiar zones on les fonts de contaminació tenen un clar component de compostos tipus dioxina.

V.1.5 Disseny, validació i aplicació del bioassaig en embrions de peix zebra (MolDarT-Short (*cyp1a*))

Els embrions de peixos zebra són un model molt útil per als estudis de toxicitat degut a la seva fàcil manipulació (creixement i tractament) així com observació dels efectes directes i indirectes. Tot i que en els últims anys s'han anat desenvolupant nous bioassaigs basats en la utilització d'embrions, aquests utilitzen grans quantitats de medi així com períodes d'incubació relativament llargs que dificulten o impossibiliten la seva utilització per aplicar-los a mostres ambientals on el volum recollit és limitat. També cal tenir en compte que l'aplicació de la tècnica qRT-PCR als embrions de peix zebra per mesurar l'expressió del Receptor d'hidrocarburs d'Aril i els gens relacionats amb la seva via d'acció (sistema de detoxificació de Fase I i II) no és una novetat (Liedke et al., 2007).

No obstant, en aquest treball és presenta l'adaptació d'aquests assaigs amb una reducció del temps considerable (de 5 dies a 24 hores d'incubació més el temps de processament de les mostres) així com del volum de medi utilitzat (de 50-100 mL a 15-20 mL). Aquestes modificacions han permès convertir el nou assaig, MolDarT-Short(*cyp1a*), en un bioassaig capaç d'equiparar-se als assaigs basats en cultius cel·lulars per tal de realitzar estudis amb compostos d'interés així com mostres ambientals (article 5). Això es demostra a partir dels resultats obtinguts davant de lligands clàssics de l'AhR amb major sensibilitat que l'assaig de llevat i, amb les mostres ambientals, on s'obtenen perfils d'activitat biològica similars als assaigs en cèl·lules en cultiu, tan de llevat com murines, però també amb major sensibilitat (Figura V.7).

Per altra banda, la utilització dels embrions de peix zebra permet combinar i comparar assaigs d'efectes indirectes (MolDarT-Short) amb assaigs d'efectes directes (zFET) per tal d'establir una primera relació entre la resposta primària (via mediada per l'AhR) i els efectes adversos (edema de pericardi i malformació de la mandíbula inferior i la cua, principalment) tan per compostos purs com per mostres d'origen ambiental. Així mateix, la versatilitat de la tècnica de qRT-PCR permet, amb relativa facilitat, l'ampliació dels biomarcadors analitzats per tal d'abastar un conjunt de vies i efectes molt més ample que amb altres tècniques.

VI. CONCLUSIONS

VI. CONCLUSIONS

1. L'assaig basat en llevat (AhR-RYA) és una tècnica que permet analitzar un ampli nombre de mostres en poc temps i a baix cost amb una resposta equivalent a l'obtinguda per la resta de bioassaigs utilitzats en aquest treball així com als efectes directes observats a l'espècie sentinella en l'estudi del riu Ebre i als embrions de peix zebra.

2. El perfil d'activitat biològica per l'AhR-RYA es pot correlacionar directament amb la presència de contaminants determinats mitjançant l'anàlisi química als tres estudis de camp presentats (Part baixa del riu Ebre, Estuari d'Urdaibai i Vall del Po).

3. A partir dels embrions de peix zebra, s'ha desenvolupat un nou bioassaig utilitzant l'expressió relativa del gen *cyp1a* que detecta quantitativament la presència de lligands de l'AhR al medi (MolDarT-Short(*cyp1a*)) a la vegada que es disminueix el temps d'incubació i el volum d'assaig.

4. El bioassaig MolDarT-Short(*cyp1a*) presenta una resposta davant de mostres ambientals equivalent a l'obtinguda amb els altres bioassaigs utilitzats, cultius cel·lulars (AhR-RYA i DR-LUC) i als efectes adversos directes en embrions de peix zebra (zFET).

5. L'estudi de l'impacte a Flix i la part final del riu Ebre mostra una clara contaminació per compostos de tipus dioxina provinents dels residus sedimentats tan a l'embassament com a la zona de meandre però sembla que aquesta contaminació no viatge més enllà.

6. Els sediments al tram final del Delta de l'Ebre no mostren contaminació per compostos tipus dioxina amb valors molt semblants als obtinguts a la zona de referència (Riba-Roja). No obstant, prop de les poblacions de Mora d'Ebre i Xerta s'ha detectat pics d'activitat no lligada a la presència d'OCs de manera que es recomana estudiar la zona en més profunditat.

7. L'estudi de l'impacte a l'estuari d'Urdaibai mostra una clara contaminació prop de l'illa de Txatxarramendi amb valors de PAHs i activitat tipus dioxina comparables a les observades al punt de control contaminat (Port d'Arriluze).

8. Les proporcions de metabòlits de PAHs així com una major activitat tipus dioxina determinada per AhR-RYA que l'estimada a partir de les anàlisis químiques suggereixen que hi ha un segon origen de contaminació significativa a la zona interior de l'Estuari d'Urdaibai.

9. L'estudi dels PAHs presents al partículat de l'aire (Vall del Po) per AhR-RYA mostren uns valors d'activitat tipus dioxina força elevats, sobretot, als mesos de més fred. Els valors mostren una bona correlació amb la toxicitat teòrica calculada a partir de les dades químiques però més aviat pobre amb els valors de PM₁₀, el que suggereix que els valors de PM₁₀ no són bons indicadors de la toxicitat de les partícules d'aire.

10. La comparació dels diferents bioassaigs en les mostres de partículat d'aire i precipitats de la mina de carbó mostren la necessitat de determinar l'activitat biològica de les mostres ambientals a més de tenir en compte la seva composició química.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abalos, M., E. Abad, et al. (2008). "Effects on growth and biochemical responses in juvenile gilthead seabream 'Sparus aurata' after long-term dietary exposure to low levels of dioxins." Chemosphere **73**(1 Suppl): S303-10.
- Aoki, Y. (2001). "Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzop-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans as Endocrine Disrupters & What We Have Learned from Yusho Disease". Environmental Research. Section A. **86**, 2-11.
- Akahoshi, E., S. Yoshimura, et al. (2006). "Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study." Environ Health **5**: 24.
- Andreasen E.A., J.M. Spitsbergen, et al. (2002a). "Tissue-specific expression of AHR2, ARNT2, and CYP1A in zebrafish embryos and larvae: effects of developmental stage and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure". Toxicol Sci. **68**(2):403-19
- Andreasen E.A., M.E.Hahn ME, et al. (2002b). "The zebrafish (Danio rerio) aryl hydrocarbon receptor type 1 is a novel vertebrate receptor". Mol Pharmacol. **62**(2):234-49.
- Amacher, D. E. "The effects of cytochrome P450 induction by xenobiotics on endobiotic metabolism in pre-clinical safety studies." Toxicology Mechanisms and Methods **20**(4): 159-166.
- Apetoh, L., F. J. Quintana, et al. (2010) "The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27." Nat Immunol.
- Àrea Calidad Aire, (2009). Informe de la Evaluación de la Calidad del Aire en España 2009. MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO.
- Armstrong B., H. E., Unwin J., Fletcher T (2004). "Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis." Environmental Health Perspectives.
- Baitaluk, M. and J. Ponomarenko (2010) "Semantic integration of data on transcriptional regulation." Bioinformatics **26**(13): 1651-1661.
- Barata, C., M. C. Fabregat, et al. (2009) "Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain)." Environ Pollut **158**(3): 704-10.
- Behnisch, P. A., K. Hosoe, et al. (2003). "Brominated dioxin-like compounds: in vitro assessment in comparison to classical dioxin-like compounds and other polyaromatic compounds." Environ Int **29**(6): 861-77.
- Behrendt, L., M. E. Jönsson, et al. (2010) "Induction of cytochrome P450 1 genes and stress response genes in developing zebrafish exposed to ultraviolet radiation." Aquat Toxicol **98**(1): 74-82.

- Beyer, A. and M. Biziuk (2009). "Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls." Rev Environ Contam Toxicol **201**: 137-58.
- Billiard, S. M., M. E. Hahn, et al. (2002). "Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs)." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **133**(1): 55-68.
- Billiard, S. M., A. R. Timme-Laragy, et al. (2006). "The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish." Toxicol Sci **92**(2): 526-36.
- Bock, K. W. and C. Kohle (2006). "Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions." Biochem Pharmacol **72**(4): 393-404.
- Bock, K. W. and C. Kohle (2009). "The mammalian aryl hydrocarbon (Ah) receptor: from mediator of dioxin toxicity toward physiological functions in skin and liver." Biological Chemistry **390**(12): 1225-1235.
- Boronat, S., S. Casado, et al. (2007). "Modulation of aryl hydrocarbon receptor transactivation by carbaryl, a nonconventional ligand." FEBS J **274**(13): 3327-39.
- Boronat, S., N. Garcia-Reyero, et al. (2009) "Biological activity of aryl hydrocarbon receptor ligands in sediments from remote European Lakes". Freshwater Biology **54**: 2543-2554.
- Boronat, S. and B. Pina (2006). "Development of RNR3- and RAD54-GUS reporters for testing genotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae*." Anal Bioanal Chem **386**(6): 1625-32.
- Boronat, S., H. Richard-Foy, et al. (1997). "Specific deactivation of the mouse mammary tumor virus long terminal repeat promoter upon continuous hormone treatment." J Biol Chem **272**(35): 21803-10.
- Bosch, C., A. Olivares, et al. (2009). "Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chlor-alkali industry." Aquat Toxicol **94**(1): 16-27.
- Bourdon, J. A., T. M. Bazinet, et al. (2010) "Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Contamination and Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Agonist Activity of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplements: Implications for Daily Intake of Dioxins and PCBs." Food Chem Toxicol.
- Bourguet, W., M. Ruff, et al. (1995). "Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor." Protein Expr Purif **6**(5): 604-8.
- Brannen, K. C., J. M. Panzica-Kelly, et al. (2010). "Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol **89**(1): 66-77.
- Brook, R.D., S. Rajagopalan, et al. (2010). "Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease: An Update to the Scientific Statement From the American Heart Association" Circulation. **121**: 2331-2378.

-
- Bugiak, B. J. and L. P. Weber (2010) "Phenotypic anchoring of gene expression after developmental exposure to aryl hydrocarbon receptor ligands in zebrafish." Aquat Toxicol **99**(3): 423-37.
- Butler, G. C. (1984). Developments in Ecotoxicology. Ecological Bulletins. Copenhagen, Denmark Oikos Editorial Office **36**: 9-12.
- Calo, M., D. Alberghina, et al. (2010) "Estrogenic followed by anti-estrogenic effects of PCBs exposure in juvenil fish (*Spaurus aurata*)." Food Chem Toxicol **48**(8-9): 2458-63.
- Casado S., M. Alonso, et al. (2006). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by carbaryl: Computational evidence of the ability of carbaryl to assume a planar conformation". Environ Toxicol Chem. **25**(12):3141-7.
- Carroll, J. S. and M. Brown (2006). "Estrogen receptor target gene: an evolving concept." Mol Endocrinol **20**(8): 1707-14.
- Carroll, J. S., C. A. Meyer, et al. (2006). "Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites." Nat Genet **38**(11): 1289-97.
- CE. Directiva 98/83/CE, " calidad de las aguas destinadas al consumo humano." Pàgina Web:
http://europa.eu/legislation_summaries/environment/water_protection_management/l28079_es.htm
- CE. Directiva 2001/81/CE (2001). Directiva Sobre techos nacionales de emisión de determinados contaminantes atmosféricos.
- Celius, T., A. Pansoy, et al. (2010) "Flavin-containing monooxygenase-3: induction by 3-methylcholanthrene and complex regulation by xenobiotic chemicals in hepatoma cells and mouse liver." Toxicol Appl Pharmacol **247**(1): 60-9.
- Clark, B. W., C. W. Matson, et al. (2010) "AHR2 mediates cardiac teratogenesis of polycyclic aromatic hydrocarbons and PCB-126 in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*)." Aquat Toxicol **99**(2): 232-40.
- Chauhan, K.R., P.R.S. Kodavanti, et al. (2000). "Assessing the Role of ortho-Substitution on Polychlorinated Biphenyl Binding to Transthyretin, a Thyroxine Transport Protein". Toxicology and Applied Pharmacology **162**: 10–21.
- Costa, C., S. Catania, et al. (2010) "Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: Role of CYP1A1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation." Toxicology **271**(3): 83-86.
- Crinnion, W.J. (2011) "Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences". Altern Med Rev. **16**(1):5-13. Review.
- Dahl, J. (Fukunaga BN, Probst MR, Reisz-Porszasz S, Hankinson). (1995) "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor". J. Biol. Chem. **270** (49): 29270-8.

- Denison, M. S. and S. R. Nagy (2003). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals." Ann Rev Pharmacol Toxicol **43**: 309-34.
- Dipple, A., C. J. Michejda, et al. (1985). "Metabolism of chemical carcinogens." Pharmacol Ther **27**(3): 265-96.
- Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental, M. d. M. A. (2007). "Guía Técnica de aplicación del RD 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados." Gobierno de España.
- Donato, M.T., J.V. Castell (2002). "¿Qué es el citocromo P450?" capítulo 3. Universidad de Valencia.
- EC. Environment, "Air Quality Standards." Pàgina Web:
<http://ec.europa.eu/environment/air/quality/standards.htm>.
- EC. Environment, (2008). "Priority Substances and Certain Other Pollutants (According to Annex II of the Directive 2008/105/EC)".
- EFSA (European Food Safety Administration). (2005). "Aspects of the biology and welfare of animals used for experimental and other scientific purposes" EFSA J **292**: 1-46.
- Eisler, R. and A. A. Belisle (1996). "Planar PCB Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review". Contaminant Hazard Reviews.
- Eljarrat, E., M. A. Martinez, et al. (2008). "Distribution and biological impact of dioxin-like compounds in risk zones along the Ebro River basin (Spain)." Chemosphere **71**(6): 1156-61.
- Environmental Agency, "Benzo-[a]-pyrene." Pàgina Web:
<http://www.environment-agency.gov.uk/business/topics/pollution/39407.aspx>.
- EPA, (2010). "The European environment. State and outlook 2010. Air pollution".
- Erickson, M.D., R.G. Kaley (2010) "Applications of polychlorinated biphenyls". Environ Sci Pollut Res Int. **18**(2):135-51.
- EUSEP Agency. (1991). "Evaluación de Riesgo para Contaminantes Tóxicos del Aire: Guía de un Ciudadano (EPA 450/3-90-024)". Technology Transfer Network Air Toxics Web Site.
- EUSEP Agency. (2009). "National Primary Drinking Water Regulations". EPA.
- Faria, M., A. Navarro, et al. (2011) "Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants." Aquat Toxicol **101**(1): 78-87.
- Fleming, C. R., S. M. Billiard, et al. (2009). "Hypoxia inhibits induction of aryl hydrocarbon receptor activity in topminnow hepatocarcinoma cells in an ARNT-dependent manner." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **150**(3): 383-9.

- Fox, J. E., M. E. Burow, et al. (2008). "Detecting ligands and dissecting nuclear receptor-signaling pathways using recombinant strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Nat Protoc* **3**(4): 637-45.
- Franco, S. S., A. C. Nardocci, et al. (2008). "PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art." *Cad Saude Publica* **24 Suppl 4**: 569-80.
- Fuji-Kuriyama, Y. and K. Kawajiri (2009) "Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli." *Proceedings of the Japan Academy Series a-Mathematical Sciences* **86**(1): 40-53.
- Fukunaga, B. N., M. R. Probst, et al. (1995). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor." *J Biol Chem* **270**(49): 29270-8.
- Furness, S. G., M. J. Lees, et al. (2007). "The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors." *FEBS Lett* **581**(19): 3616-25.
- Furness, S. G. B. and F. Whelan (2009). "The pleiotropy of dioxin toxicity - Xenobiotic misappropriation of the aryl hydrocarbon receptor's alternative physiological roles." *Pharmacology & Therapeutics* **124**(3): 336-353.
- Gandhi, R., D. Kumar, et al. (2010) "Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells." *Nat Immunol.* **11**, 846–853.
- Garabedian, M. J. (1993). "Genetic Approaches to Mammalian Nuclear Receptor Function in Yeast" *Methods* **5**(2): 138-146.
- Garcia-Reyero, N., D. Raldua, et al. (2004). "Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish." *Anal Bioanal Chem* **378**(3): 670-5.
- Gauderman W.J., E. Avol, et al. (2004). "The Effect of Air Pollution on Lung Development from 10 to 18 Years of Age". *The new england journal of medicine* **351** (11).
- Gold, L. S. "The Carcinogenic Potency Database (CPDB)." Pàgina Web:
<http://potency.berkeley.edu/chempages/HEXACHLOROBENZENE.html>.
- Goldstone, J. V., A. G. McArthur, et al. (2010) "Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish." *BMC Genomics* **11**: 643.
- Grandien, K., A. Berkenstam, et al. (1997). "The estrogen receptor gene: promoter organization and expression." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(12): 1343-69.

- Grimalt, J.O. "CAPÍTOL 5. MOSTRATGE I ANÀLISI DELS SEDIMENTS A L'EMBASSAMENT DE FLIX" Pàg. WEB (última entrada Juliol 2011) :
http://www20.gencat.cat/docs/dmah/Home/EI%20Departament/Politiques%20i%20actuacions/Actuacions%20singulars/Flix/Estudi%20de%20la%20dinamica%20dels%20compostos%20organoclorats%20i%20altres%20contaminants/43_42038.pdf
- Guengerich, F. P. and D. C. Liebler (1985). "Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites." Crit Rev Toxicol **14**(3): 259-307.
- Guideline, DPFAN. (2006 (1st Version)). "Fish Embryo Toxicity (FET) Test". OECD guideline for the testing of chemicals.
- Haarmann-Stemmann, T., J. Sendker, et al. (2010) "Regulation of dioxin receptor function by different beta-carboline alkaloids." Archives of Toxicology **84**(8): 619-629.
- Hahn, M. E. (1998). "The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol **121**(1-3): 23-53.
- Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." Chem Biol Interact **141**(1-2): 131-60.
- Halwachs, S., C. Lakoma, et al. (2010) "Dioxin mediates downregulation of the reduced folate carrier transport activity via the arylhydrocarbon receptor signalling pathway." Toxicology and Applied Pharmacology **246**(1-2): 100-106.
- Hamers, T., S. van, et al. (2000). "The application of reporter gene assays for the determination of the toxic potency of diffuse air pollution." Sci Total Environ **262**(1-2): 159-74.
- Handley, H. M. (2003). "Zebrafish cardiovascular cDNA microarrays: expression profiling and gene discovery in embryos exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin". Tesis. Pàgina web: <http://hdl.handle.net/1912/2461>
- Hawkins, S. A., S. M. Billiard, et al. (2002). "Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Environ Toxicol Chem **21**(9): 1845-53.
- Hernandez-Ochoa, I., K. R. Barnett-Ringgold, et al. (2010) "The Ability of the Aryl Hydrocarbon Receptor to Regulate Ovarian Follicle Growth and Estradiol Biosynthesis in Mice Depends on Stage of Sexual Maturity." Biol Reprod. **83**(5): 698-706.
- IARC, Supplement 7 (1998). "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs". WHO. Volumes 1 to 42.
- Ikuta, T., H. Eguchi, et al. (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor." J Biol Chem **273**(5): 2895-904.
- INIA, Ministerio de Medio Ambiente, (2007). "Guía Técnica de aplicación del RD 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados."

-
- Inserm, (2000). "Dioxins in the Environment What are the health risks? Synthesis and recommendations".
Llibre. Referència NCBI: NBK7128.
- ITES-Paraninfo. (2001). "Contaminación Ambiental. Análisis de contaminantes ambientales. Instrumentos de gestión medioambiental en la industria". ITES-Paraninfo.
- Ito, Y., Y. Matsuda, et al. (2010) "Effects of 3,4-dichloroaniline on expression of ahr2 and cyp1a1 in zebrafish adults and embryos." Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology **152**(2): 189-194.
- Jacobs, M. N., M. Dickens, et al. (2003). "Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptorbeta (hERbeta), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor alpha (hERalpha) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) ligand binding domain from the human PPARgamma crystal structure." J Steroid Biochem Mol Biol **84**(2-3): 117-32.
- Jakoby, W. B. and D. M. Ziegler (1990). "The enzymes of detoxication." J Biol Chem **265**(34): 20715-8.
- Johnson, J. L. and E. A. Craig (2000). "A role for the Hsp40 Ydj1 in repression of basal steroid receptor activity in yeast." Mol Cell Biol **20**(9): 3027-36.
- Jones, H. S., G. H. Panter, et al. (2010) "Oxidative and conjugative xenobiotic metabolism in zebrafish larvae in vivo." Zebrafish **7**(1): 23-30.
- Jonsson, M. E., B. Brunstrom, et al. (2009). "The zebrafish gill model: induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation." Aquat Toxicol **91**(1): 62-70.
- Jonsson, M. E., D. G. Franks, et al. (2009). "The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) binds multiple AHRs and induces multiple CYP1 genes via AHR2 in zebrafish." Chem Biol Interact **181**(3): 447-54.
- Jonsson, M. E., K. Gao, et al. "Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout." Aquatic Toxicology **98**(4): 311-321.
- Jonsson, M. E., M. J. Jenny, et al. (2007). "Role of AHR2 in the expression of novel cytochrome P450 1 family genes, cell cycle genes, and morphological defects in developing zebra fish exposed to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Toxicol Sci **100**(1): 180-93.
- Jonsson, M. E., R. Orrego, et al. (2007). "Basal and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in zebrafish." Toxicol Appl Pharmacol **221**(1): 29-41.
- Jorge-Nebert, L. F., Z. Jiang, et al. (2009). "Analysis of human CYP1A1 and CYP1A2 genes and their shared bidirectional promoter in eight world populations." Hum Mutat **31**(1): 27-40.

- Kerkvliet, N. I. "Immunoregulation by the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)." Journal of Neuroimmune Pharmacology **5**: S14-S14.
- Kewley, R. J., M. L. Whitelaw, et al. (2004). "The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators." Int J Biochem Cell Biol **36**(2): 189-204.
- Kohle, C. and K. W. Bock (2006). "Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention." Biochem Pharmacol **72**(7): 795-805.
- Karchner S.I., D.G. Franks, et al. (2005). "AHR1B, a new functional aryl hydrocarbonreceptor in zebrafish: tandem arrangement of ahr1b and ahr2 genes". Biochem J. **392**(Pt 1):153-61.
- Kretzschmar, G., A. Papke, et al. (2010) "Estradiol regulates aryl hydrocarbon receptor expression in the rat uterus." Molecular and Cellular Endocrinology **321**(2): 253-257.
- Kusik, B.W., M.J. Carvan Iii, et al. (2008). "Detection of Mercury in Aquatic Environments Using EPRE Reporter Zebrafish". Mar. Biotechnol. **10**(6): 750-757.
- Lammer, E., G. J. Carr, et al. (2009). "Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?" Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **149**(2): 196-209.
- Lammer, E., H. G. Kamp, et al. (2009). "Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*)." Toxicol In Vitro **23**(7): 1436-42.
- Li, H. S. and H. B. Wang "Activation of xenobiotic receptors: driving into the nucleus." Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology **6**(4): 409-426.
- Li, Y., T. Zhang, et al. (2010) "The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-interacting protein 2 suppresses the estrogen receptor signaling via an Arnt-dependent mechanism." Arch Biochem Biophys.
- Liedtke, A., J. Muncke, et al. (2008). "Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT." Environ Toxicol **23**(1): 59-67.
- Linden, J., S. Lensu, et al. (2010) "Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance." Front Neuroendocrinol.
- Mandal, P. K. (2005). "Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology." J Comp Physiol B **175**(4): 221-30.
- Mantovani, A. (2006). "Risk assessment of endocrine disrupters: the role of toxicological studies." Ann N Y Acad Sci **1076**: 239-52.
- Mantovani, A., C. Frazzoli, et al. (2009). "Risk assessment of endocrine-active compounds in feeds." Veterinary Journal **182**(3): 392-401.

-
- Mattingly, C.J., J.A. McLachlan, et al. (2001). "Green Fluorescent Protein (GFP) as a marker of aryl hydrocarbon receptor (AhR) function in developing zebrafish (*Danio rerio*)". Environ. Health Perspect. **109**(8):845-849.
- McDanell, R. E. and A. E. McLean (1984). "Differences between small and large intestine and liver in the inducibility of microsomal enzymes in response to stimulation by phenobarbitone and betanaphthoflavone in the diet." Biochem Pharmacol **33**(12): 1977-80.
- McIntosh, B. E., J. B. Hogenesch, et al. (2010) "Mammalian Per-Arnt-Sim Proteins in Environmental Adaptation." Annual Review of Physiology **72**: 625-645.
- Meunier, B., S. P. de Visser, et al. (2004). "Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes." Chem Rev **104**(9): 3947-80.
- Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, et al. (2000). "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer." Pharmacol Rev **52**(4): 673-751.
- Miller, E. C. (1978). "Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address." Cancer Res **38**(6): 1479-96.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Pàgina Web: www.marm.gob.es.
- Mimura, J., M. Ema, et al. (1999). "Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function." Genes Dev **13**(1): 20-5.
- Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama (2003). "Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD." Biochim Biophys Acta **1619**(3): 263-8.
- Monostory, K., J. M. Pascussi, et al. (2009). "Hormonal regulation of CYP1A expression." Drug Metabolism Reviews **41**(4): 547-572.
- Morais, S., A. Knoll-Gellida, et al. (2007). "Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish." Physiol Genomics **28**(3): 239-52.
- Mueller, S. O. (2004). "Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods." Anal Bioanal Chem **378**(3): 582-7.
- Mueller, S. O. and K. S. Korach (2001). "Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice." Curr Opin Pharmacol **1**(6): 613-9.
- NIH/PHS (National Institutes of Health Public Health Service), (2006). "NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of a Binary Mixture of 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB126) (cas n^o.57465-28-8) and 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153) (CAS NO. 35065-27-1) in female Harlan Sprague-Dawley rats". Nacional Toxicology Program. NTP TR 530. NIH Publication No. 06-4466.

- Navarro, A., M. Faria, et al. (2011). "Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults." Environ Pollut **159**(1): 100-7.
- Navarro, A., L. Quiros, et al. (2009). "Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site." Aquat Toxicol **93**(2-3): 150-7.
- Niemira, M., A. Wisniewska, et al. (2009). "[Polymorphism and the level of P450 gene expression in xenobiotic metabolism]." Postepy Biochem **55**(3): 279-89.
- Niwa, T., N. Murayama, et al. (2009). "Oxidation of Endobiotics Mediated by Xenobiotic-Metabolizing Forms of Human Cytochrome P450." Current Drug Metabolism **10**(7): 700-712.
- Noguerol, T. N., S. Boronat, et al. (2006). "Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays." Anal Bioanal Chem **385**(6): 1012-9.
- Noguerol, T. N., S. Boronat, et al. (2006). "Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods." Talanta **69**(2): 351-8.
- OEHHA, Proposition of 65 List by Office of Environmental Health Hazard Assessment. EPA.
- Olivares, A., L. Quiros, et al. (2010) "Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point." Sci Total Environ **408**(22): 5592-9.
- Olivares, A., B. van Drooge, et al. (2011). "Assessment of dioxin-like activity in ambient air particulate matter using recombinant yeast assays". Atmospheric Environment **45**: 271-274.
- Otte, J. C., A. D. Schmidt, et al. (2010) "Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*)." Aquat Toxicol. **100**(1): 38-50.
- Partch, C. L. and K. H. Gardner (2010). "Coactivator Recruitment: A New Role for PAS Domains in Transcriptional Regulation by the bHLH-PAS Family." Journal of Cellular Physiology **223**(3): 553-557.
- Peña, C., D.E. Carter et al. (2001). "Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración ambiental" Southwest Hazardous Waste Program. University of Arizona. Distribuit via internet: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
- Piña, B., D. Raldúa, et al. (2011). "Biological Effects of Chemical Pollution in Feral Fish and Shellfish Populations from Ebro River: From Molecular to Individual Level Responses". The Ebro River Basin. T. H. o. E. Chemistry. **13**: 275-293.
- Prasch A.L., H. Teraoka, et al. (2003). "Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish". Toxicol Sci. **76**(1): 138-50.

- Puy-Azurmendi, E., A. Navarro, et al. (2010) "Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in sediment and fish from the biosphere reserve of Urdaibai (Bay of Biscay, Basque country, Spain)." Mar Environ Res **70**(2): 142-9.
- Quintana, F. J., A. S. Basso, et al. (2008). "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor." Nature **453**(7191): 65-71.
- Quiros, L., R. Cespedes, et al. (2005). "Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from Portuguese rivers." Environ Toxicol Chem **24**(2): 389-95.
- Quiros, L., S. Jarque, et al. (2007). "Physiological response to persistent organic pollutants in fish from mountain lakes: analysis of CYP1A gene expression in natural populations of *Salmo trutta*." Environ Sci Technol **41**(14): 5154-60.
- Quiros, L., B. Pina, et al. (2007). "Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies." Chemosphere **67**(6): 1144-54.
- Quiros, L., D. Raldua, et al. (2007). "A noninvasive test of exposition to toxicants: quantitative analysis of cytochrome P4501A expression in fish scales." Environ Toxicol Chem **26**(10): 2179-86.
- Quiros, L., X. Ruiz, et al. (2008). "Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain)." Environ Pollut **155**(1): 81-7.
- Ratola, N., A. Alves, et al. (2011). "Distribution and sources of PAHs using three pine species along the Ebro River." Environ Monit Assess. En premsa.
- Reisz-Porszasz, S., M. R. Probst, et al. (1994). "Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT)." Mol Cell Biol **14**(9): 6075-86.
- Reyes-Hernandez, O. D., A. Mejia-Garcia, et al. "Ube2l3 gene expression is modulated by activation of the aryl hydrocarbon receptor: Implications for p53 ubiquitination." Biochem Pharmacol **80**(6):932-40.
- Richter J., (1984) "Ecotoxicology: Proceedings of the Third Oikos Conference Held 30 November". Ecological Bulletins, **170**. Oikos Editorial Office.
- Robert, D. (2010). "Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease An Update to the Scientific Statement." American Heart Association Journal **121**: 2331-2378.
- Robertson, L. W. and L. G. Hansen (2001). "PCBs: recent advances in environmental toxicology and health effects". Premsa de la Universitat de Kentucky. Llibre.
- Ruff, M., M. Gangloff, et al. (2000). "Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors." Breast Cancer Res **2**(5): 353-9.
- Saccharomyces Genome Database (SGD). Pàgina Web: www.yeastgenome.org

- Safe, S. and M. Wormke (2003). "Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action." Chem Res Toxicol **16**(7): 807-16.
- Safe, S., M. Wormke, et al. (2000). "Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(3): 295-306.
- Sagredo, C., S. Mollerup, et al. (2009). "Biotransformation of benzo[a]pyrene in Ahr knockout mice is dependent on time and route of exposure." Chem Res Toxicol **22**(3): 584-91.
- Sanderson, J. T., J. M. Aarts, et al. (1996). "Comparison of Ah receptor-mediated luciferase and ethoxyresorufin-O-deethylase induction in H4IIE cells: implications for their use as bioanalytical tools for the detection of polyhalogenated aromatic hydrocarbons." Toxicol Appl Pharmacol **137**(2): 316-25.
- Sanseverino, J., R. K. Gupta, et al. (2005). "Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds." Appl Environ Microbiol **71**(8): 4455-60.
- Scholz, S., S. Fischer, et al. (2008). "The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing." Environ Sci Pollut Res Int **15**(5): 394-404.
- Services, U.S.D.o.H.a.H. (2005). "Toxicological Profile for alfa, beta, gamma and delta Hexachlorocyclohexane " Public Health Service - Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Shiau, A. K., D. Barstad, et al. (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." Cell **95**(7): 927-37.
- Simon, T., J.k. Brito, et al. (2007). "Development of a neurotoxic equivalence scheme of relative potency for assessing the risk of PCB mixtures". Regulatory Toxicology and Pharmacology **48** 148–170.
- Stegeman, J.J., J.V.. Goldstone, et al. (2010). Perspectives on Zebrafish as a model in environmental toxicology. Zebrafish **29**: 367-439
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). Pàgina Web: <http://chm.pops.int>.
- Tan, K. P., B. Wang, et al. (2010) "Aryl Hydrocarbon Receptor Is a Transcriptional Activator of the Human Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2)." Molecular Pharmacology **78**(2): 175-185.
- Tanguay R.L., C.C. Abnet CC, et al. (1999). "Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor". Biochim Biophys. **1444**(1):35-48.
- Teraoka, H., A. Ogawa, et al. (2010) "Malformation of certain brain blood vessels caused by TCDD activation of Ahr2/Arnt1 signaling in developing zebrafish." Aquat Toxicol **99**(2): 241-7.
- Thurmond, T. S., A. E. Silverstone, et al. (1999). "A chimeric aryl hydrocarbon receptor knockout mouse model indicates that aryl hydrocarbon receptor activation in hematopoietic cells contributes to the

- hepatic lesions induced by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Toxicol Appl Pharmacol **158**(1): 33-40.
- Tian, Y. (2009). "Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome." Biochem Pharmacol **77**(4): 670-80.
- Timme-Laragy, A. R., C. J. Cockman, et al. (2007). "Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish." Aquat Toxicol **85**(4): 241-50.
- Truhaut, R. (1977). "Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives." Ecotoxicol Environ Saf **1**(2): 151-73.
- USEPA, Office of Air Quality Planning and Standards. (1998). "Handbook for air toxics emissions inventory development". Research Triangle Park: U.S. Environmental Protection Agency.
- van Boxtel, A. L., J. H. Kamstra, et al. (2008). "Microarray analysis reveals a mechanism of phenolic polybrominated diphenylether toxicity in zebrafish." Environ Sci Technol **42**(5): 1773-9.
- Vrabie, C. M., A. Candido, et al. (2011) "specific in vitro toxicity of crude and refined petroleum products: ii. estrogen (alpha and beta) and androgen receptor-mediated responses in yeast assays." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(7): 1529-1536.
- Walisser, J. A., E. Glover, et al. (2005). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(49): 17858-63.
- Waller, C. L. and J. D. McKinney (1995). "Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization." Chem Res Toxicol **8**(6): 847-58.
- Waring, R. H. and R. M. Harris (2005). "Endocrine disruptors: a human risk?" Mol Cell Endocrinol **244**(1-2): 2-9.
- Weigt, S., N. Huebler, et al. (2010) "Zebrafish teratogenicity test with metabolic activation (mDarT): effects of phase I activation of acetaminophen on zebrafish Danio rerio embryos." Toxicology **275**(1-3): 36-49.
- Weil, M., S. Scholz, et al. (2009). "Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test." Environ Toxicol Chem **28**(9):1970-8.
- Wells, P. G., C. J. J. Lee, et al. (2010) "Receptor- and reactive intermediate-mediated mechanisms of teratogenesis." Handb Exp Pharmacol(196): 131-62.
- White, S. S. and L. S. Birnbaum (2009). "An Overview of the Effects of Dioxins and Dioxin-Like Compounds on Vertebrates, as Documented in Human and Ecological Epidemiology." Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews **27**(4): 197-211.

- Wolz, J., W. Brack, et al. (2010) "Effect-directed analysis of Ah receptor-mediated activities caused by PAHs in suspended particulate matter sampled in flood events." Science of the Total Environment **408**(16): 3327-3333.
- Woodall, G. M. and R. L. Smith (2008). "The Air Toxics Health Effects Database (ATHED)." Toxicol Appl Pharmacol **233**(1): 20-4.
- Wormke, M., M. Stoner, et al. (2000). "Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes." FEBS Lett **478**(1-2): 109-12.
- Wu, Y. D., L. Jiang, et al. (2008). "CYP1A/regucalcin gene expression and edema formation in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Bull Environ Contam Toxicol **80**(6): 482-6.
- Yang, F., Q. Zhang, et al. (2010) "Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using in vitro fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test." Toxicol In Vitro. **24**(7): 2003-11.
- Yoshikawa, E., S. Miyagi, et al. (2010) "Specific interactions between aryl hydrocarbon receptor and dioxin congeners: Ab initio fragment molecular orbital calculations." J Mol Graph Model. **29**(2): 197-205.
- Zhang, N., L. N. Agbor, et al. (2010) "An activated renin-angiotensin system maintains normal blood pressure in aryl hydrocarbon receptor heterozygous mice but not in null mice." Biochemical Pharmacology **80**(2).
- Zhao, B., D. S. Baston, et al. (2010) "Enhancing the response of CALUX and CAFLUX cell bioassays for quantitative detection of dioxin-like compounds." Science China-Chemistry **53**(5): 1010-1016.
- Zhao, B., D. Degroot, et al. (2010) "CH223191 is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor." Toxicol Sci.
- Zhou, H., H. Wu, et al. (2010) "Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway." Toxicol Mech Methods **20**(6): 279-86.
- Zhou, H. L., Y. Qu, et al. (2010) "Molecular phylogenies and evolutionary behavior of AhR (aryl hydrocarbon receptor) pathway genes in aquatic animals: Implications for the toxicology mechanism of some persistent organic pollutants (POPs)." Chemosphere **78**(2): 193-205.
- Zhou, S., Q. Dong, et al. (2009). "Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos." Aquat Toxicol **95**(4): 339-46.
- Zhou, S. F., B. Wang, et al. (2010) "Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2." Drug Metabolism Reviews **42**(2): 268-354.
- Zollner, G., M. Wagner, et al. (2010) "Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity." Pharmacology & Therapeutics **126**(3): 228-243.

