

Primer paso en la evaluación de los efectos del fuel del *Prestige* sobre el medio ambiente marino: Disponibilidad, bioacumulación y daño en el ADN

First step in the evaluation of the effects of *Prestige* oil on the shore environment: Availability, bioaccumulation and DNA damage

B Laffon^{1,2*}, I Aldao¹, B Pérez-Cadahía^{1,2}, E Pásaro¹, J Méndez²

¹ Unidad de Toxicología, Universidade da Coruña, Edificio de Servicios Centrales de Investigación, Campus Elviña s/n, 15071-La Coruña, Spain. * E-mail: blaffon@udc.es

² Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidade da Coruña, Facultad de Ciencias, Campus A Zapateira s/n, 15071-La Coruña, Spain.

Resumen

El petrolero *Prestige* se hundió frente a la costa gallega en noviembre de 2002, vertiendo unas 63,000 toneladas de fuel pesado, clasificado por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer como posible carcinógeno humano. En este trabajo se expusieron mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) a fuel del *Prestige* en el laboratorio (1.5 y 3 ppm). Se tomaron muestras de agua de mar y tejidos de mejillón a los 7 y 14 días para determinar la disponibilidad y la bioacumulación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) contenidos en el fuel, y el daño en el ADN inducido por la exposición mediante el ensayo del cometa. El agua de mar fue renovada en el día 14 y se tomaron nuevas muestras el día 21 para analizar la capacidad de recuperación de los mejillones. El contenido total de PAHs (TPAH) en el agua de los tanques expuestos resultó mayor que en el tanque control, siendo superior en el tanque con la menor dosis debido a la gran tendencia que los PAHs presentan a unirse a partículas en el agua. Los mejillones expuestos presentaron mayores niveles de TPAH que los controles, incrementándose en el tiempo durante la fase de recuperación. El coeficiente de correlación obtenido demostró una clara relación dosis ambiental/dosis interna. Se observó incremento significativo en el daño en el ADN en los individuos expuestos, similar en las dos dosis probadas. El daño en el ADN fue constante durante los periodos de exposición y recuperación, reflejo de las roturas de cadena durante los procesos de reparación del ADN. Los resultados obtenidos muestran la importancia de determinar la presencia de los polucionantes en el ambiente, su bioacumulación en los tejidos y sus efectos en los organismos expuestos, para realizar una aproximación integrada en la evaluación de los efectos de los eventos de contaminación en el ambiente marino.

Palabras clave: *Mytilus galloprovincialis*, *Prestige*, PAH, daño en el ADN, bioacumulación.

Abstract

The *Prestige* oil tanker shipwrecked off the coast of Galicia (Spain) in November 2002, spilling nearly 63,000 tons of heavy oil, classified by the International Agency for Research on Cancer as possible human carcinogen. In this work, mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were exposed to *Prestige* oil in the laboratory (1.5 and 3 ppm). Samples of seawater and mussel tissues were taken on days 7 and 14 of the experiment to determine the availability and bioaccumulation of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contained in the oil and the DNA damage induced by the exposure using the comet assay. Seawater was renewed on day 14 and new samples were taken on day 21 to analyze the recovery ability of the mussels. Total PAH (TPAH) contents in seawater from the exposure tanks were higher than in the control tank, and this content was higher in the lower oil-dose tank due to the tendency of PAH to link to particles in water. Exposed mussels had much higher TPAH levels than controls, increasing with time even during the recovery phase. The correlation coefficient obtained demonstrated a clear environmental dose/internal dose relationship. Significant increases in DNA damage were observed in oil-exposed individuals in relation to controls, similar in the two doses tested. The DNA damage was constant during the exposure period but increased during the recovery time, reflecting the strand breakage during the DNA repair processes. The results obtained have shown the importance of determining the presence of pollutants in the environment, their bioaccumulation in organic tissues and their effects on the exposed organisms, in order to perform an integrated approach to evaluate the impact of contamination events in the aquatic environment.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*, *Prestige*, PAH, DNA damage, bioaccumulation.

Introducción

La contaminación del medio ambiente marino por fuel representa un continuo e importante problema en la costa de Galicia (noroeste de España), relacionado fundamentalmente

Introduction

Contamination of the sea environment by fuel represents an important and repeated problem on the coast of Galicia (northwestern Spain), fundamentally related to the intense

con el intenso tráfico de petroleros en la zona, mal estado de una gran parte de la flota y condiciones meteorológicas frecuentemente adversas. En noviembre de 2002, el petrolero *Prestige* se hundió frente a la costa de Galicia, vertiendo cerca de 63,000 toneladas de fuel pesado hasta agosto de 2003. El fuel del *Prestige* fue clasificado como fuel oil número 6 por la Agencia de Protección Medioambiental Estadounidense (USEPA). Se trata de un producto residual de la destilación del fuel, una vez que son eliminadas las fracciones volátiles, de mayor valor económico. Su composición fue descrita por el Centro Superior de Investigaciones Científicas español (CSIC) como 50% de hidrocarburos aromáticos, 22% de hidrocarburos saturados y 28% de resinas y asfaltenos. La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) ha clasificado a este tipo de combustibles como posibles carcinógenos humanos (grupo 2B) (IARC 1989). El fuel del *Prestige* contenía seis hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) catalogados por la IARC como probables o posibles carcinógenos humanos (grupos 2A y 2B): naftaleno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno y dibenz[ah]antraceno, todos ellos entre los 16 PAH designados por la USEPA como contaminantes prioritarios.

La contaminación de un ecosistema se produce cuando éste pierde sus propiedades y su capacidad de mantener los procesos biológicos esenciales. Las respuestas bioquímicas y fisiológicas de los individuos sometidos a cambios en su ambiente natural ocurren por lo general en tiempos cortos, respecto a cambios en niveles mayores de organización, es decir, en poblaciones o comunidades de un ecosistema. Por tanto, las respuestas de los individuos pueden ser consideradas como herramientas útiles para detectar, en un primer momento, la pérdida de calidad de un ecosistema. El nivel de afectación de los organismos por el fuel depende de la cantidad de fuel en el ambiente, de su persistencia y de su disponibilidad. Debido a las características físicas y químicas del fuel del *Prestige*, se espera que las especies bentónicas estén entre las más afectadas por el vertido. Los moluscos bivalvos tienen una actividad metabólica baja en comparación con otros organismos acuáticos como los peces o los crustáceos, así que los compuestos orgánicos lipofílicos tienden a acumularse en sus tejidos alcanzando en éstos niveles mayores que en el agua que los rodea. Por tanto, los moluscos bivalvos, y especialmente los mejillones, son utilizados frecuentemente en programas de monitoreo del medio ambiente marino, donde la salud de los organismos es tomada como reflejo de la salud del ambiente, o de especies de interés comercial o ecológico (Livingstone *et al.* 2000). Los del género *Mytilus* se consideran buenos organismos centinelas en estudios de monitoreo por su amplia distribución en ambos hemisferios, su abundancia, su tamaño adecuado y sus hábitos filtradores, que favorecen la bioacumulación de contaminantes (Kadhim 1990). Además, estos moluscos representan la base de la economía de muchas regiones productoras de mejillón, y su posición en la cadena trófica como parte de la dieta humana los hace muy interesantes en los estudios de contaminación marina. De hecho, se han descrito

traffic of oil tankers in that zone, to the bad state of a great part of the world fleet, and to the frequently adverse meteorological conditions. In November 2002, the *Prestige* oil tanker shipwrecked off the Galician coast, spilling nearly 63,000 tons of heavy oil until August 2003. *Prestige* oil was classified as fuel oil No. 6 by the United States Environmental Protection Agency (USEPA), consisting of a residual product of the distillation of fuel, after the volatile fractions, of higher economic value, have been removed. Its composition was described by the Spanish National Research Council (CSIC) as 50% aromatic hydrocarbons, 22% saturated hydrocarbons and 28% resins and asphaltene. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified this kind of oils as possible human carcinogens (group 2B) (IARC 1989). *Prestige* oil contained six polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) catalogued as probable or possible human carcinogens (groups 2A and 2B) by IARC: naphthalene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene and dibenz[ah]anthracene; all are included in the 16 PAH designated by the USEPA as primary contaminants.

Contamination of an ecosystem occurs when it loses its properties and its ability to maintain the essential biological processes. Biochemical and physiological responses of the individuals subjected to changes in the natural environment usually occur in short times, in relation to changes at higher organization levels, i.e., populations or communities of an ecosystem. Therefore, the responses of individuals may be considered useful tools to detect, as a first step, the quality loss of an ecosystem. The level of affectation of the organisms by oil depends on the quantity of oil in the environment, on its persistence and on its availability. Due to the physical and chemical properties of the *Prestige* oil, benthic species would be expected to be among the most affected by the spill. Bivalve molluscs have low metabolic activity, as compared to other aquatic organisms like fishes or crustaceans, so lipophilic organic compounds tend to accumulate in their tissues and reach higher levels than in the surrounding water. Therefore, bivalve molluscs, especially mussels, are frequently used in monitoring programs of the sea environment, where the health of the organism is taken to reflect the health of the environment, or any species of commercial or ecological interest (Livingstone *et al.* 2000). Species of the genus *Mytilus* are considered good sentinel organisms in monitoring studies because of their broad distribution in both hemispheres, their abundance and suitable size, and their filter-feeding habits that favour the bioaccumulation of contaminants (Kadhim 1990). In addition, these molluscs represent the basis of the economy of many mussel-producing regions, and their position in the trophic chain as part of the human diet makes them very interesting in sea contamination studies. In fact, genotoxic effects have been reported in rats fed with mussels contaminated by the *Erika* oil spill (Lemiere *et al.* 2005).

Since it is known that many chemical agents are mutagenic and/or carcinogenic, genotoxicity tests have been applied to marine organisms (de Raat *et al.* 1985). The measurement of

efectos genotóxicos en ratas alimentadas con mejillones contaminados por el vertido del *Erika* (Lemiere *et al.* 2005).

Desde que se sabe que muchos agentes químicos son mutagénicos y/o carcinogénicos, las pruebas citogenéticas se han aplicado a los organismos marinos (de Raat *et al.* 1985). La medida del daño en el ADN puede ser utilizada como biomarcador sensible con gran valor predictivo en la detección de las propiedades genotóxicas de los contaminantes y su efecto sobre la integridad de los ecosistemas acuáticos (McCarthy y Shugart 1990). Además, la ruptura de las cadenas de ADN no requiere que las células estén en fase de división como la mayoría de los ensayos citogenéticos. A este respecto, el ensayo del cometa constituye una técnica sensible, rápida y económica para la detección de roturas en las cadenas de ADN, que constituyen un adecuado biomarcador no específico de genotoxicidad en peces y otras especies acuáticas (Mitchelmore y Chipman 1998). Además, permite la evaluación de procesos de reparación del daño inducido y la detección de células en apoptosis, utilizando una pequeña cantidad de tejido de modo rápido y efectivo (Olive *et al.* 1992).

En este trabajo se expusieron mejillones *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) a fuel del *Prestige* en el laboratorio; se evaluó la disponibilidad en el agua de mar y la bioacumulación en los tejidos del mejillón de los PAH contenidos en el fuel, y se determinó el daño en el ADN inducido por la exposición por medio del ensayo del cometa. Además, se analizó la capacidad de recuperación de los mejillones una vez eliminada la exposición.

Material y métodos

Recolección de muestras

El fuel del *Prestige* se obtuvo de la ría de Muros-Noia, intensamente afectada por el vertido (coordenadas UTM 494978.07 N y 4734381.93 E, huso horario 29, hemisferio Norte). La muestra se recogió en un recipiente hermético protegido de la luz y se almacenó a 4°C hasta su análisis y utilización.

Los mejillones (*M. galloprovincialis*) se obtuvieron de la ría de Vilagarcía de Arousa, no afectada por el vertido del *Prestige*. El tamaño de los mejillones fue de 6–8 cm de longitud. Después de su recolección, los mejillones fueron inmediatamente transportados al laboratorio (menos de 3 h), divididos en tres grupos y colocados en tanques intensamente aireados con agua de mar filtrada; se situaron en una cámara de fotoperiodo en ciclos de 12 h luz-oscuridad a temperatura controlada de 18°C. Uno de los tanques contuvo individuos control (tratados con metanol 0.05%) y los otros dos contuvieron individuos expuestos a fuel (1.5 y 3 ppm). Los mejillones fueron alimentados diariamente con dos especies de microalgas (*Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*). La aclimatación de los moluscos a las condiciones del laboratorio se realizó durante cuatro días.

DNA damage can be used as a sensitive biomarker with great predictive value to detect the genotoxic properties of contaminants and their effect on the integrity of aquatic ecosystems (McCarthy and Shugart 1990). Moreover, DNA strand breakage does not require cells to be in a dividing phase like most cytogenetic assays. In this regard, the comet assay is a sensitive, rapid and economic technique for the detection of DNA strand breaks, which is ideally suited as a non-specific biomarker of genotoxicity in fish and other aquatic species (Mitchelmore and Chipman 1998). In addition, it allows the evaluation of repair processes of induced damage and the detection of apoptotic cells, using a small amount of tissue in a quick and cost-effective manner (Olive *et al.* 1992).

In this work, mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) were exposed to *Prestige* oil in the laboratory. The availability in seawater and bioaccumulation in mussel tissues of the PAH contained in the oil were evaluated, and DNA damage induced by the exposure was measured using the comet assay. In addition, the recovery ability of the mussels after the exposure was analyzed.

Material and methods

Sample collection

Prestige oil was collected from the Muros-Noia estuary, intensely affected by the spill (UTM coordinates 494978.07 N and 4734381.93 E, time zone 29, Northern Hemisphere). The sample was placed in a hermetic container protected from light and stored at 4°C until its analysis and use.

Mussels (*M. galloprovincialis*) were collected from the Vilagarcía de Arousa estuary, not affected by the *Prestige* oil spill. The size of the mussels was 6–8 cm in length. After collection, mussels were immediately transported to the laboratory (less than 3 h), divided into three groups and placed in highly aerated tanks with filtered seawater. They were placed in a photoperiod chamber in cycles of 12-h light/darkness at a controlled temperature of 18°C. One tank contained control individuals (treated with 0.05% methanol), and the other two contained oil-exposed individuals (1.5 and 3 ppm). The mussels were fed daily with two species of microalgae (*Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*). Acclimatization of molluscs to laboratory conditions lasted for four days.

Exposure of mussels to *Prestige* oil

The control treatment consisted of 10 mL of methanol (final concentration 0.05%). Two oil concentrations were prepared: 1.5 and 3 ppm. The corresponding quantity of oil was weighed, diluted in 10 mL of methanol and added to the seawater in the tanks. On day 7 of the treatment, seawater and mussel tissue samples (20 g) were taken from each tank in glass containers to analyze PAH content, and 18 individuals were randomly selected from each tank in order to evaluate DNA damage using the comet assay. Exposure was extended

Exposición de los mejillones al fuel del Prestige

El tratamiento control consistió en 10 mL de metanol (concentración final 0.05%). Se prepararon dos concentraciones de fuel: 1.5 y 3 ppm: se pesó la cantidad correspondiente de fuel, se diluyó en 10 mL de metanol y se añadió al tanque con agua de mar. Después de siete días de tratamiento, se tomaron muestras de agua de mar y de tejido de mejillón (20 g) de cada uno de los tanques en recipientes de vidrio para analizar su contenido de PAHs, y se seleccionaron al azar 18 individuos de cada tanque para evaluar el daño en el ADN por medio del ensayo del cometa. La exposición se prolongó hasta el día 14, cuando se tomaron nuevas muestras de agua de mar y tejido de mejillón y se seleccionaron otros 18 individuos para el ensayo del cometa. Entonces se renovó el agua de cada uno de los tanques con agua de mar limpia y los mejillones se mantuvieron durante siete días más, cuando se tomaron nuevas muestras de agua de mar y tejido de mejillón, y se tomaron 18 individuos más para el ensayo del cometa. Las dosis de exposición y periodos de tiempo se seleccionaron en base a estudios previos (Neff y Anderson 1981, Hamoutene *et al.* 2002). Además, Gagnon y Holdway (2000) determinaron que, después de vertidos accidentales de hidrocarburos, sus concentraciones en la columna de agua son similares a las utilizadas en este trabajo.

Análisis del contenido de PAHs en el fuel, agua de mar y tejido de mejillón

La preparación de las muestras de fuel y agua de mar para el análisis se realizó siguiendo el protocolo de la USEPA (2000). Para la preparación de las muestras de tejido de mejillón se aplicó la técnica de Baumard *et al.* (1999). Los análisis de contenido de PAH de las muestras de fuel, agua de mar y tejido de mejillón se realizaron por medio de una metodología de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), según Baumard *et al.* (1999). Los PAHs determinados fueron: naftaleno, 2-metilnaftaleno, bifenilo, 2,6-dimetilnaftaleno, 1,2-dimetilnaftaleno, acenaftileno, acenafteno, 2,3,5-trimetilnaftaleno, fluoreno, 1-metilfluoreno, dibenzotiofeno, fenantreno, antraceno, 2-metilantraceno, 1-metilfenantreno, fluoranteno, pireno, 11H-benzofluoreno, 1,2-benzodifenilensulfuro, benz[a]antraceno, trifenileno, criseneno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, perileno, benzo[ghi]perileno, dibenz[ah]antraceno, indopireno, 2-metildibenzotiofeno, 2,4-dimetildibenzotiofeno, 2-propilbenzotiofeno y 2-butilbenzotiofeno. La suma de la cantidad total de todos estos compuestos se consideró como el índice de PAHs totales (TPAH).

Ensayo del cometa

Las branquias de mejillón se extirparon y diseccionaron utilizando tijeras y pinzas, y se colocaron en tubos conteniendo 8 mL de una solución compuesta por 20 mM de HEPES, 500 mM NaCl, 12.5 mM KCl y 5 mM EDTA, y se dejaron durante

until day 14, when new seawater and mussel tissue samples were taken, and 18 individuals were selected for the comet assay. Then, the water of the tanks was renewed with clean fresh seawater and mussels were maintained for another seven days, when new seawater and mussel tissue samples were collected and another 18 individuals were taken for the comet assay. Doses of exposure and time periods were chosen based on previous studies (Neff and Anderson 1981, Hamoutene *et al.* 2002). In addition, after accidental hydrocarbon spills, Gagnon and Holdway (2000) determined concentrations in the seawater column that were similar to the ones used in this work.

Analysis of PAH content of oil, seawater and mussel tissue

The preparation of oil and seawater samples for the analysis was made following USEPA (2000) protocol. For the preparation of mussel tissue samples, the technique described by Baumard *et al.* (1999) was applied. Analyses of PAH content of oil, seawater and mussel tissue samples were carried out through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), according to Baumard *et al.* (1999). The following PAH were determined: naphthalene, 2-methylnaphthalene, biphenyl, 2,6-dimethylnaphthalene, 1,2-dimethylnaphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, 2,3,5-trimethylnaphthalene, fluorene, 1-methylfluorene, dibenzothiophene, phenanthrene, anthracene, 2-methylantracene, 1-methylphenanthrene, fluoranthene, pyrene, 11H-benzofluorene, 1,2-benzodiphenylene sulfide, benz[a]anthracene, triphenylene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[e]pyrene, benzo[a]pyrene, perylene, benzo[ghi]perylene, dibenz[ah]anthracene, indopyrene, 2-methyldibenzothiophene, 2,4-dimethyldibenzothiophene, 2-propylbenzothiophene and 2-butylbenzothiophene. The sum of the total quantity of all these compounds was considered the index of total PAH (TPAH).

Comet assay

Mussel gills were excised and dissected using scissors and tweezers, and placed in a tube containing 8 mL of a solution composed of 20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 12.5 mM KCl and 5 mM EDTA, and left for 1 h in soft horizontal shaking. Tubes were then placed vertically in an ice container for 5 min, for the tissue fragments to settle. The supernatant containing suspended cells was collected with a pipette and centrifuged at 1500 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in 500 µL of Kenny's salt solution (KSS: 0.4 M NaCl, 9 mM KCl, 0.7 mM K₂HPO₄, 2 mM NaHCO₃) and cell viability was tested using the trypan blue exclusion technique.

The comet assay methodology applied was based on the alkaline assay described by Wilson *et al.* (1998), with minor modifications. Cells were washed twice in KSS, divided into two fractions and centrifuged for 3 min at 3000 rpm. The pellet containing $\sim 2.5 \times 10^5$ cells was resuspended in 80 µL of

1 h en agitación horizontal suave. Después, los tubos se colocaron verticalmente en hielo durante 5 min, para permitir la sedimentación de los fragmentos de tejido. El sobrenadante conteniendo las células suspendidas se recogió con una pipeta y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 500 µL de solución salina de Kenny (KSS: 0.4 M NaCl, 9 mM KCl, 0.7 mM K₂HPO₄, 2 mM NaHCO₃), y se probó la viabilidad celular utilizando la técnica de exclusión de azul de tripán.

La metodología del ensayo del cometa utilizada se basó en el ensayo alcalino descrito por Wilson *et al.* (1998), con pequeñas modificaciones. Las células se lavaron dos veces en KSS, se dividieron en dos fracciones y se centrifugaron durante 3 min a 3000 rpm. El botón celular conteniendo ~5 × 10⁵ células se resuspendió en 80 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LMA, Gibco BRL, Paisley, Scotland) al 0.5% en KSS, y se colocó en un portaobjetos cubierto por una primera capa de agarosa de punto de fusión normal (Gibco BRL, Paisley, Scotland) al 0.5%. Los portaobjetos se situaron sobre una lámina de metal a 4°C durante 10 min, antes de la adición de una capa final de 80 µL de LMA. Los portaobjetos se colocaron durante 1 h a 4°C en oscuridad en una cápsula Coplin conteniendo solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 250 mM NaOH, 10 mM Tris-HCl, 1% sarcosil, pH 10 con 1% Triton X-100 añadido justo antes de su utilización).

Después de la lisis, los portaobjetos se situaron en horizontal en un tanque de electroforesis colocado sobre hielo. El tanque se rellenó con solución de electroforesis (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13) hasta cubrir los portaobjetos, y se dejaron durante 20 min en oscuridad para prevenir daños adicionales sobre el ADN, para permitir el desenrollamiento del ADN y la expresión de los sitios álcali-lábiles. La electroforesis se realizó a 25 V y 300 mA (0.83 V cm⁻¹) durante 20 min. Los portaobjetos se lavaron tres veces durante 5 min, cada uno con solución de neutralización (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5); se tiñeron con 60 µL de 4,6-diamidino-2-fenilindol 5 mg mL⁻¹ en solución antifade y se almacenaron en un contenedor húmedo sellado para prevenir el secado del gel.

Un observador “ciego” examinó 100 células seleccionadas al azar de cada individuo (50 por portaobjetos replicado) utilizando una amplificación de 400×. La captura y análisis de las imágenes se realizó mediante el programa QWIN Comet (Leica Imaging Systems, Cambridge, UK). La longitud de la cola del cometa (TL), medida desde el centro estimado de la célula, se utilizó como parámetro para estimar el daño en el ADN.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para determinar la existencia de diferencias entre grupos, seguido del test de Dunnet. Las asociaciones entre dos variables se analizaron mediante la correlación de Pearson. El nivel de significancia se estableció en 0.05. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con

0.5% low-melting-point agarose (LMA, Gibco BRL, Paisley, Scotland) in KSS and placed on a slide precoated with a layer of 0.5% normal-melting-point agarose (Gibco BRL, Paisley, Scotland). It was placed for 10 min on a metal plate at 4°C before the addition of a final layer of 80 µL LMA. The slides were placed for 1 h at 4°C in darkness in a Coplin jar containing lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 250 mM NaOH, 10 mM Tris-HCl, 1% sarcosyl, pH 10, with 1% Triton X-100 added just before use).

After lysis, slides were placed in a horizontal electrophoresis tank in an ice bath. The tank was filled with electrophoresis solution (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH >13) to cover the slides, and they were left for 20 min in the dark to prevent the occurrence of additional DNA damage, to allow DNA unwinding and alkaline-labile sites expression. Electrophoresis was then conducted at 25 V and 300 mA (0.83 V cm⁻¹) for 20 min. The slides were washed three times for 5 min each with neutralizing solution (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), stained with 60 mL of 5 mg mL⁻¹ 4,6-diamidino-2-phenylindole in antifade solution and stored in a humidified airtight container to prevent drying of the gel.

A “blind” scorer examined 100 randomly selected cells from each individual (50 per replicate slide) using a magnification of 400×. Image capture and analysis were performed using the QWIN Comet software (Leica Imaging Systems, Cambridge, UK). Tail length (TL), measured from the estimated centre of the cell, was used as DNA damage parameter.

Statistical analysis

A two-way analysis of variance (ANOVA) was applied to determine the existence of differences among groups, followed by Dunnet’s test. The associations between two variables were analyzed by Pearson’s correlation. The level of significance was set at 0.05. All statistical analyses were carried out using the SPSS for Windows statistical package, version 11.0 (Illinois, USA).

Results

The PAH content in the *Prestige* oil sample used in this work was analyzed using the GC-MS technique and the results obtained are shown in table 1. The quantities of the different PAH analyzed were very variable, the highest concentrations corresponding to 2-methylanthracene, anthracene and 2,6-dimethylnaphthalene (above 200 µg mL⁻¹), and the lowest concentrations to 2-butylbenzothiophene, 1,2-benzodiphenylsulfure and 2-propylbenzothiophene (below 0.25 µg mL⁻¹). Triphenylene was under the limit of quantification.

The seawater used to maintain the mussels was analyzed before starting the study to determine its possible PAH content, and the results obtained are gathered in table 2. The only PAH present in the seawater were naphthalene, phenantrene, benzo[b]fluoranthene and benzo[j]fluoranthene, all of them below 0.002 µg L⁻¹.

el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 11.0 (Illinois, USA).

Resultados

El contenido en PAH de la muestra de fuel del *Prestige* utilizada en este trabajo se analizó por medio de una técnica de GC-MS, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1. Las cantidades de los diferentes PAH analizados fueron muy variables, estando mayoritariamente representados 2-metilntraceno, antraceno y 2,6-dimetilntraceno (por encima de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y en menores concentraciones 2-butilbenzotiofeno, 1,2-benzodifenilensulfuro y 2-propilbenzotiofeno (por debajo de 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). El trifenileno estuvo por debajo del límite de cuantificación.

El agua de mar utilizada para mantener los mejillones fue analizada antes del inicio del estudio para determinar su posible contenido en PAH, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2. Los únicos PAH presentes en el agua fueron nftaleno, fenantreno, benzo[b]fluoranteno y benzo[j]fluoranteno, todos ellos por debajo de 0.002 $\mu\text{g L}^{-1}$.

En el agua de mar del tanque control se observaron bajos niveles de TPAH (tabla 3), no sobrepasando nunca los 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, aunque fueron mayores que los iniciales en la misma agua de mar. Las concentraciones de TPAH en los tanques de tratamiento fueron mayores que en los correspondientes tanques control, aunque estos niveles no variaron

In the seawater of the control tank, low TPAH levels were observed (table 3), never exceeding 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, although they were higher than in the initial seawater. The TPAH concentrations in the treatment tanks were higher than in the corresponding control tank, although these levels did not change much during the oil treatment, i.e., between days 7 and 14. Moreover, during this period, TPAH contents were higher in the tank with the lower oil dose (1.5 ppm) than in the tank with the higher oil dose (3 ppm). During the recovery phase, once the exposure had been removed, a great decrease was observed in TPAH levels, both in the control and 1.5-ppm tanks. Nevertheless, these levels remained constant in the tank containing the dose of 3 ppm.

Mussel tissues were analyzed to determine the possible PAH bioaccumulation. The data obtained are given in table 4. Control individuals showed certain TPAH content, but exposed mussels showed much higher TPAH levels, increasing with oil dose. In addition, during the exposure time, both control and 1.5-ppm-exposed individuals hardly modified their TPAH content, but the 3-ppm-exposed mussels showed a significant increase in their hydrocarbon level. On the contrary, during the recovery time, TPAH concentrations in the 3-ppm-exposed individuals remained almost constant, but decreased in controls and increased in the 1.5-ppm-exposed mussels. The association between TPAH content in the seawater and in the mussel tissues was calculated, and a correlation coefficient of $r = 0.740$ (significant at the 0.05 level) was obtained.

Tabla 1. Contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el fuel del *Prestige* utilizado en este estudio. <LQ = Debajo del límite de cuantificación.
Table 1. Content of polycyclic aromatic hydrocarbons in the *Prestige* oil used in this study. <LQ = Below the level of quantification.

Compound	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Compound	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Naphthalene	99.08	1,2-benzodiphenylene sulfide	0.22
2-methylnaphthalene	161.01	Benz[a]anthracene	32.18
Biphenyl	41.45	Triphenylene	<LQ
2,6-dimethylnaphthalene	214.15	Chrysene	3.55
1,2-dimethylnaphthalene	14.79	Benzo[b]fluoranthene +	
Acenaphthylene	15.75	Benzo[j]fluoranthene	9.60
Acenaphthene	15.30	Benzo[k]fluoranthene	9.20
2,3,5-trimethylnaphthalene	17.65	Benzo[e]pyrene	20.45
Fluorene	0.45	Benzo[a]pyrene	19.01
1-methylfluorene	6.41	Perylene	7.73
Dibenzothiophene	10.20	Benzo[ghi]perylene	3.08
Phenanthrene	36.22	Dibenz[ah]anthracene	16.39
Anthracene	259.21	Indopyrene	13.93
2-methylanthracene	271.45	2-methyldibenzothiophene	1.59
1-methylphenanthrene	41.30	2,4-dimethyldibenzothiophene	0.49
Fluoranthene	19.20	2-propylbenzothiophene	0.24
Pyrene	145.17	2-butylbenzothiophene	0.17
11H-benzofluorene	18.08	THAP	1524.70

Tabla 2. Contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el agua de mar utilizada en este estudio. <LQ = Debajo del límite de cuantificación.
Table 2. Content of polycyclic aromatic hydrocarbons in the seawater used in this study. <LQ = Below the level of quantification.

Compound	$\mu\text{g mL}^{-1}$	Compound	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Naphthalene	0.002	1,2-benzodiphenylene sulfide	<LQ
2-methylnaphthalene	<LQ	Benz[a]anthracene	<LQ
Biphenyl	<LQ	Triphenylene	<LQ
2,6-dimethylnaphthalene	<LQ	Chrysene	<LQ
1,2-dimethylnaphthalene	<LQ	Benzo[b]fluoranthene +	
Acenaphthylene	<LQ	Benzo[j]fluoranthene	0.001
Acenaphthene	<LQ	Benzo[k]fluoranthene	<LQ
2,3,5-trimethylnaphthalene	<LQ	Benzo[e]pyrene	<LQ
Fluorene	<LQ	Benzo[a]pyrene	<LQ
1-methylfluorene	<LQ	Perylene	<LQ
Dibenzothiophene	<LQ	Benzo[ghi]perylene	<LQ
Phenanthrene	0.001	Dibenz[ah]anthracene	<LQ
Anthracene	<LQ	Indopyrene	<LQ
2-methylanthracene	<LQ	2-methyldibenzothiophene	<LQ
1-methylphenanthrene	<LQ	2,4-dimethyldibenzothiophene	<LQ
Fluoranthene	<LQ	2-propylbenzothiophene	<LQ
Pyrene	<LQ	2-butylbenzothiophene	<LQ
11H-benzofluorene	<LQ	THAP	0.004

mucho durante el tratamiento con fuel, es decir, entre los días 7 y 14. Además, durante este periodo los contenidos de TPAH fueron mayores en el tanque con la menor dosis de fuel (1.5 ppm) que en el tanque con la dosis mayor (3 ppm). Durante la fase de recuperación, una vez que la exposición fue eliminada, se observó un gran descenso en los niveles de TPAH, tanto en el tanque control como en el que contenía 1.5 ppm; sin embargo, los niveles permanecieron constantes en el tanque con 3 ppm.

Los tejidos de mejillón se analizaron para determinar la posible bioacumulación de PAH. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 4. Los individuos control mostraron cierto contenido en TPAH, pero los mejillones expuestos mostraron niveles de TPAH mucho mayores, incrementándose con la dosis de fuel. Además, durante el tiempo de exposición tanto los controles como los individuos expuestos a 1.5 ppm prácticamente no modificaron su contenido de TPAH, pero los mejillones expuestos a 3 ppm incrementaron mucho su nivel de hidrocarburos. Por el contrario, durante el tiempo de recuperación las concentraciones de TPAH en los individuos expuestos a 3 ppm permanecieron casi constantes, mientras que en los controles descendieron y en los mejillones expuestos a 1.5 ppm se incrementaron. Se calculó la asociación entre el contenido de TPAH en el agua de mar y en los tejidos de mejillón y se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0.740$, significativo a nivel de 0.05.

The results obtained in the evaluation of DNA damage in the mussels exposed to *Prestige* oil can be seen in table 5. Oil-exposed individuals showed significantly higher TL than control individuals, resulting in increasing TL with the dose applied, although no difference was detected between the two doses. In addition, DNA damage evaluated on day 7 since the start of the study was not significantly different from that detected on day 14, for any oil treatment tested. Nevertheless, TL values observed on day 21 were significantly higher than those observed on day 14 for the two oil doses. The TL was correlated with TPAH contents in seawater and in mussel tissues, with correlation coefficients of $r = 0.488$ for seawater and $r = 0.896$ (significant at the 0.01 level) for mussel tissues.

Tabla 3. Contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos totales ($\mu\text{g L}^{-1}$) en el agua de mar durante el tratamiento con fuel y la fase de recuperación.

Table 3. Content of total polycyclic aromatic hydrocarbons ($\mu\text{g L}^{-1}$) in seawater during the oil treatment and recovery phase.

Time	Dose		
	Control	1.5 ppm	3 ppm
7 days	0.189	0.954	0.523
14 days	0.163	0.875	0.664
21 days	0.077	0.435	0.683

Tabla 4. Contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos totales ($\mu\text{g kg}^{-1}$ peso seco) en el tejido de mejillón durante el tratamiento con fuel y la fase de recuperación.

Table 4. Content of total polycyclic aromatic hydrocarbons ($\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight) in mussel tissue during the oil treatment and recovery phase.

Time	Dose		
	Control	1.5 ppm	3 ppm
0 days	131.75		
7 days	194.87	761.83	729.98
14 days	181.75	790.01	906.96
21 days	131.75	1096.25	987.39

Los resultados obtenidos en la evaluación del daño en el ADN en los mejillones expuestos a fuel del *Prestige* se muestran en el tabla 5. Los individuos expuestos a fuel mostraron TL significativamente mayores que los individuos control, incrementándose su valor con la dosis aplicada, aunque no se detectaron diferencias significativas entre las dos dosis. Además, el daño en el ADN evaluado al día 7 del inicio del estudio no fue significativamente diferente del detectado al día 14, en ninguno de los tratamientos probados. Sin embargo, los valores de TL observados al día 21 fueron significativamente mayores que los observados al día 14 para las dos dosis de fuel. Se correlacionó TL con los contenidos de TPAH en el agua de mar y en el tejido de mejillón, obteniendo coeficientes de correlación de $r = 0.488$ para el agua de mar y $r = 0.896$ (significativo a nivel de 0.01) para el tejido de mejillón.

Discusión

Debido al hecho de que los sistemas biológicos representan la principal diana para numerosos contaminantes ambientales, éstos pueden proporcionar importante información que no se podría obtener del análisis químico de muestras ambientales (Jha y Cheung 2000). Así, cada vez es más frecuente en programas de control ambiental y monitorización recurrir a la medida de biomarcadores de exposición o determinar directamente los efectos de los contaminantes en los organismos (Widdows y Donkin 1989, Rainbow 1993). Por tanto, las monitorizaciones química y biológica no son determinaciones excluyentes sino complementarias (Jha y Cheung 2000). Para evaluar los efectos causados por los contaminantes en un medio ambiente es esencial seleccionar los organismos apropiados y es importante demostrar que la respuesta genotóxica en esos organismos se encuentra relacionada con la presencia de contaminantes en el ambiente.

El objetivo de este estudio, llevado a cabo en mejillones expuestos al fuel del *Prestige*, consistió en determinar la disponibilidad de los PAH contenidos en el fuel en el agua de mar de los tanques experimentales, la bioacumulación de estos hidrocarburos en los tejidos de los organismos expuestos y el daño en el ADN inducido en los mejillones por la exposición a fuel.

Tabla 5. Daño en el ADN detectado en los mejillones durante el tratamiento con fuel y la fase de recuperación (TL, μm , media \pm SE).

Table 5. The DNA damage detected in mussels during the oil treatment and recovery phase (comet assay tail length, μm , mean \pm SE).

Time	Dose		
	Control	1.5 ppm	3 ppm
0 days	37.95 \pm 0.17 ^b		
7 days	33.40 \pm 0.19	38.71 \pm 0.15 ^a	39.45 \pm 0.14 ^a
14 days	37.42 \pm 0.47 ^b	38.87 \pm 0.15 ^a	39.33 \pm 0.16 ^a
21 days	35.49 \pm 0.00	43.26 \pm 0.18 ^{a,c}	41.02 \pm 0.17 ^{a,c}

^a $P \leq 0.05$, significant difference relative to the corresponding control.

^b $P \leq 0.05$, significant difference relative to 7 days.

^c $P \leq 0.05$, significant difference relative to 14 days.

Discussion

Since biological systems represent the main target for numerous environmental contaminants, they can provide important information that could not be obtained from chemical analysis of environmental samples (Jha and Cheung 2000). It has therefore become more and more frequent in environmental control and monitoring programs to resort to the measurement of exposure biomarkers or to directly determine the effects of the contaminants in the organisms (Widdows and Donkin 1989, Rainbow 1993). Chemical monitoring and biological monitoring are not excluding but complementary determinations (Jha and Cheung 2000). To evaluate the effects caused by contaminants in an environment it is essential to select the appropriate organisms, and it is important to demonstrate that the genotoxic response in these organisms is related to the presence of the contaminants in the environment.

The purpose of this study, using mussels exposed to *Prestige* oil, was to determine the availability of the PAH contained in the oil in the seawater of the experimental tanks, the bioaccumulation of these hydrocarbons in the tissues of the exposed individuals, and the DNA damage induced in the mussels by the exposure to oil. Thus, we performed a complete set of determinations as a first step to evaluate the effects of the *Prestige* oil in the sea environment: chemical analyses of environmental samples (PAH in seawater), determinations of an exposure biomarker (PAH in mussel tissues), and measurement of an effect biomarker (DNA damage in mussel gills). In addition, we evaluated the recovery ability of the mussels after the exposure period, in terms of elimination of PAH contained in their tissues and repair of damaged DNA.

The filtered seawater used did not contain practically any PAH. Nevertheless, in the control tank the level of these compounds increased during the first 14 days of the experiment. This was probably due to the excretory activity of the mussels, because they contained certain basal levels in their tissues. In the tanks containing the oil exposure doses, TPAH content was higher than in the control tank, as expected, though this content

Por tanto, hemos realizado un conjunto completo de determinaciones como primer paso en la evaluación de los efectos del fuel del *Prestige* en el medio ambiente marino: análisis químicos de muestras ambientales (PAH en el agua de mar), determinaciones de un biomarcador de exposición (PAH en tejido de mejillón), y medida de un biomarcador de efecto (daño en el ADN en branquias de mejillón). Además, hemos evaluado la capacidad de recuperación de los mejillones una vez que la exposición fue retirada, en términos de eliminación de los PAH contenidos en sus tejidos y reparación del DNA dañado.

El agua de mar filtrada prácticamente no contenía PAH. Sin embargo, en el tanque control el nivel de estos compuestos se incrementó durante los primeros 14 días de experimento. Esto se debió probablemente a la actividad excretora de los mejillones, puesto que contenían ciertos niveles basales en sus tejidos. En los tanques que contuvieron las dosis de exposición a fuel el contenido de TPAH fue mayor que en el tanque control, según lo esperado; sin embargo, este contenido fue mayor en el tanque con la dosis menor de fuel. Esto puede explicarse en base a la gran tendencia que los PAH, como muchos otros contaminantes, presentan a unirse a partículas en el agua (Irwin *et al.* 1997, Bowman *et al.* 2002), así que a medida que la concentración total de fuel en el agua se incrementa, sus componentes experimentan mayor dificultad en incorporarse a la fracción soluble en agua. Varios autores han verificado este comportamiento también en metales pesados, que incrementaban su biodisponibilidad en el ambiente cuando la concentración de materia orgánica desciende (Fernandes *et al.* 1994, Salomons *et al.* 1995, Villar *et al.* 1999). Por otra parte, las diferencias observadas en los contenidos de TPAH en el agua de mar entre las dos dosis de fuel evaluadas pueden ser también explicadas en parte por la solubilidad, pues algunos de los hidrocarburos analizados podrían haber alcanzado su límite de solubilidad en la dosis mayor. Los contenidos de TPAH observados en todos los tanques, tanto control como tratamientos, después de renovar el agua de mar con agua nueva filtrada, pueden ser de nuevo explicados en base a la actividad excretora de los mejillones.

Respecto a los contenidos de PAH en el tejido de mejillón, los resultados obtenidos mostraron que los individuos control presentaban ciertas cantidades de estos compuestos, procedentes de su previa localización original. Los mejillones expuestos presentaron niveles de TPAH mucho mayores que los controles, como consecuencia de la exposición, y estos niveles se incrementaron con el tiempo. Durante la fase de recuperación los contenidos de hidrocarburos de los organismos continuaron incrementándose. A pesar de que el agua de mar de los tanques se había renovado, esto pudo ser debido a la presencia en el agua de PAH procedentes de partículas adheridas a las conchas de los mejillones o a las paredes del tanque, que no fue lavado durante el cambio de agua, como consecuencia de la intensa aireación de los tanques.

El coeficiente de correlación obtenido para la asociación entre los contenidos de TPAH en el agua y en el tejido de

was higher in the tank containing the lower oil dose. An explanation for this could be the great tendency shown by PAH, like many other contaminants, to link to particles in water (Irwin *et al.* 1997, Bowman *et al.* 2002); hence, as the total concentration of oil in water increases, its components experience more difficulty in being incorporated to the water soluble fraction. Several authors have verified this behaviour in heavy metals that increased their bioavailability in the environment when the concentration of organic matter decreased (Fernandes *et al.* 1994, Salomons *et al.* 1995, Villar *et al.* 1999). On the other hand, differences observed in TPAH contents in seawater between the two oil doses tested may also be explained in part by solubility, since some of the hydrocarbons analyzed could have reached their solubility limit in the higher dose. The TPAH contents observed in all the tanks, both control and oil treatments, after renewing the seawater with clean filtered seawater could also be explained by the excretory activity of the mussels.

Regarding the PAH contents in mussel tissues, the results obtained showed that control individuals presented certain amounts of these compounds, which came from their previous native location. Exposed mussels had much higher TPAH levels than controls, as a consequence of the exposure, and these levels increased with time. During the recovery phase, the hydrocarbon contents in mussel organisms continued increasing. Even though the seawater in the tanks had been renewed, this could be due to the presence in the water of PAH from particles adhered to the mussel shells or to the walls of the tanks, not washed during the water change, because of the high aeration of the tanks.

The correlation coefficient obtained for the association between TPAH contents in water and mussel tissues demonstrated a clear environmental dose/internal dose relationship, according to Daskalakis (1996), who states that contaminant concentrations in mussel tissues are proportional to environmental concentrations, the measurement in organic tissues becoming a good indicator of bioavailability.

In the aquatic environment, marine organisms are characterized by their high sensitivity to DNA damage induced by xenobiotic agents, probably because of their relatively ineffective DNA repair processes (Bolognesi *et al.* 2004) and their high exposure level related to their filter-feeding activity. Mussel gills were selected for the determination of DNA damage because they are easy to obtain, they filter great volumes of seawater (2 L h^{-1} in an adult mussel), and they are a relatively homogeneous tissue from which a cell suspension can be obtained without any chemical disintegration (Wilson *et al.* 1998, Akcha *et al.* 2004).

The TL values obtained for control mussels fluctuated during the experiment, probably as a result of their manipulation and stress conditions in the laboratory. Significant increases in DNA damage have been observed in oil-exposed individuals in relation to their corresponding controls, these increases being constant during the exposure period. These results agree with those presented by Hamoutene *et al.* (2002), who detected an

mejillón demostró la existencia de una clara relación dosis ambiental/dosis interna, de acuerdo con Daskalakis (1996), quien afirma que las concentraciones de contaminantes en los tejidos de mejillón son proporcionales a las concentraciones ambientales, constituyendo la medida en tejidos orgánicos un buen indicador de la biodisponibilidad.

En el medio ambiente acuático, los organismos marinos se caracterizan por su elevada sensibilidad al daño en el ADN inducido por agentes xenobióticos, probablemente debido a sus procesos de reparación del ADN relativamente ineficientes (Bolognesi *et al.* 2004), y a su alto nivel de exposición relacionado con su actividad filtradora. Las branquias de mejillón fueron seleccionadas para la determinación del daño en el ADN porque son fáciles de obtener, filtran grandes volúmenes de agua de mar (2 L h^{-1} en un mejillón adulto), y constituyen un tejido relativamente homogéneo que permite la obtención de una suspensión celular sin procesos de desintegración química (Wilson *et al.* 1998, Akcha *et al.* 2004).

Los valores de TL obtenidos en mejillones control a lo largo del tiempo fueron fluctuantes, probablemente relacionados con la manipulación y condiciones de estrés en el laboratorio. Se observaron incrementos significativos en el daño en el ADN en individuos expuestos al fuel con respecto a sus correspondientes controles, siendo estos incrementos constantes durante el periodo de exposición. Estos resultados concuerdan con los presentados por Hamoutene *et al.* (2002), quienes detectaron incremento en el daño en el ADN en células digestivas de mejillones (*M. edulis*) expuestos a crudo arábigo, pero no observaron incremento en hemocitos, indicando que los efectos del fuel podrían ser específicos de ciertos tipos celulares. En este estudio no se obtuvieron diferencias en TL entre las dos dosis de fuel ensayadas, de acuerdo con Taban *et al.* (2004), quienes expusieron a mejillones a varias dosis de fuel durante cinco semanas y observaron que el daño inducido en el ADN por las dos dosis mayores no era significativamente diferente. El daño en el ADN evaluado después de la fase de recuperación descendió en los individuos control pero, sorprendentemente, se incrementó en los mejillones expuestos al fuel. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los procesos de reparación del ADN implican roturas de cadena que son detectadas en el ensayo del cometa como incrementos en TL. Por tanto, no se ha detectado evidencia de recuperación en los mejillones expuestos al fuel, ni en cuanto a la eliminación de los PAH bioacumulados en sus tejidos ni en cuanto a la reparación del daño inducido en el ADN, probablemente debido a que el tiempo de recuperación ensayado fue insuficiente.

La asociación entre TL y el contenido en TPAH en los tejidos de mejillón fue buena, al contrario de lo que ocurrió con la asociación con los niveles de TPAH en el agua de mar. Esto demuestra que el daño en el ADN en los organismos no depende tanto de la presencia de contaminantes en el ambiente como de su capacidad para incorporarlos.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio muestran la importancia de determinar la presencia de polucio-

nantes en el medio ambiente, su bioacumulación en los tejidos

increase in DNA damage in the digestive cells of mussels (*M. edulis*) exposed to Arabian crude oil, but the increase was not observed in haemocytes, indicating that oil effects could be specific of certain cell types. No differences in TL were obtained in this study between the two oil doses assayed, in accordance with Taban *et al.* (2004), who exposed mussels to several oil doses for five weeks and observed that the DNA damage induced by the two highest doses was not significantly different. The DNA damage evaluated after the recovery phase decreased in control individuals, but surprisingly increased in oil-exposed mussels. Nevertheless, it must be taken into account that DNA repair processes involve strand breakages that are detected in the comet assay as an increase in TL. Therefore, the oil-exposed mussels showed no evidence of recovery, neither in the elimination of bioaccumulated PAH in their tissues nor in the repair of DNA damage, probably because the recovery time assayed was insufficient.

The association between TL and TPAH content in mussel tissues was good, as opposed to the association with TPAH levels in seawater. This demonstrates that DNA damage in the organisms is not as dependent on the presence of contaminants in the environment as on their ability to incorporate it.

In summary, the results obtained in this work have shown the importance of determining the presence of pollutants in the environment, their bioaccumulation in organic tissues and their effects on the exposed organisms, in order to perform an integrated approach to evaluate the impact of contamination events in the aquatic environment.

Acknowledgements

Felipe Porta is gratefully acknowledged for kindly supplying the mussels. This investigation was supported by a grant from the Xunta de Galicia (PGIDIT03RMA10301PR). Iria Aldao and Beatriz Pérez-Cadahía were supported by fellowships from the University of A Coruña.

orgánicos y sus efectos en los organismos expuestos, para realizar una aproximación integrada en la evaluación de los efectos de los sucesos de contaminación en el medio acuático.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Felipe Porta su colaboración para el suministro de los mejillones. Esta investigación ha sido financiada por un proyecto de la Xunta de Galicia (PGIDIT03RMA10301PR). Iria Aldao y Beatriz Pérez-Cadahía fueron financiadas por becas de la Universidade da Coruña.

Referencias

Akcha F, Tanguy A, Leday G, Pelluhet L, Budzinski H, Chiffolleau F. 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and

- hemolymph cells of mussels *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar. Environ. Res.* 58: 753–756.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, Bellocq J. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47: 415–439.
- Bolognesi C, Frezilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggeri P. 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: Wild versus caged mussels. *Mutat. Res.* 552: 153–162.
- Bowman JC, Zhou JL, Readman JW. 2002. Sorption and desorption of benzo(a)pyrene in aquatic systems. *J. Environ. Monit.* 4: 761–766.
- Daskalakis D. 1996. Variability of metal concentrations in oyster tissue and implications to biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 32: 794–801.
- De Raat K, Haustveit O, De Krenk F. 1985. The role of mutagenicity testing in the ecotoxicological evaluation of industrial discharges into the aquatic environment. *Food Chem. Toxicol.* 23: 33–41.
- Fernandes, H, Bidone M, Edison D, Veiga, Lene HS. 1994. Heavy metal pollution in the coastal lagoons of Jacarepaguá, Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Pollut.* 85: 259–264.
- Gagnon MM, Holdway DA. 2000. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 70–77.
- Hamoutene D, Payne JF, Rahimtula A, Lee K. 2002. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Mar. Environ. Res.* 54: 471–474.
- IARC. 1989. Occupational exposures in petroleum refining, crude oil and major petroleum fuels. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 45. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Irwin RJ, VanMouwerik M, Stevens L, Seese MD, Basham W. 1997. Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado.
- Jha N, Cheung V. 2000. Detection of genotoxins in the marine environment: Adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Mutat. Res.* 464: 213–228.
- Khadim MA. 1990. Methodologies for monitoring the genetic effects of mutagens and carcinogens accumulated in the body of marine mussels. *Rev. Aquat. Sci.* 2: 83–107.
- Lemiere S, Cossu-Leguille C, Bispo A, Jourdain MJ, Lanhers MC, Burnel D, Vasseur P. 2005. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the "Erika" oil-spill. *Mutat. Res.* 581: 11–21.
- Livingstone DR, Chipman JK, Lowe DM, Minier C. 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: Recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.* 13: 1–6.
- McCarthy F, Shugart R. 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, 457 pp.
- Mitchelmore CL, Chipman JK. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.* 399: 135–147.
- Neff JM, Anderson JW. 1981. Response of Marine Animals to Petroleum and Specific Petroleum Hydrocarbons. Applied Science Publishers, London.
- Olive PL, Wlodek D, Durand RE, Banáth JP. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 198: 259–267.
- Rainbow RS. 1993. The significance of trace metals concentrations in marine invertebrates. In: Dallinger R, Rainbow PS (eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, Lewis, Boca-Raton Florida, pp. 3–23.
- Salomons W, Förstner U, Mader P. 1995. Heavy Metals: Problems and Solutions. Springer, Berlin, 412 pp.
- Taban IG, Bechman RK, Torgriksen S, Baussaut T, Sanni S. 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Mar. Environ. Res.* 58: 701–705.
- USEPA-600/4-00-025. 2000. Determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Industrial and Municipal Wastewater. Environmental Protection Agency. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, Ohio.
- Villar C, Stripeikis J, D'Huicque D, Tudino M, Troccoli O, Bonetto C. 1999. Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de La Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia* 416: 41–49.
- Widdows J, Donkin P. 1989. The application of combined tissue residue chemistry and physiological measurements of mussels (*Mytilus edulis*) for the assessment of environmental pollution. *Hydrobiologia* 188/189: 454–461.
- Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat. Res.* 399: 87–95

*Recibido en marzo de 2005;
aceptado en enero de 2006.*