



Universitat Jaume I

Departament de Química Física i Analítica

Institut Universitari de Plaguicides i Aigües

**ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y BIOACUMULACIÓN DE
COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS EN LA
PISCICULTURA DEL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL.
COMPARACIÓN CON EL ECOSISTEMA MARINO
CIRCUNDANTE**

Tesis Doctoral

Miguel Angel Blanes Fernández

2011

Dr. Roque Serrano Gallego, Profesor Titular de Química Analítica y **Dr. Francisco López Benet**, Catedrático de Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castelló.

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral “Estudio de la presencia y bioacumulación de compuestos organoclorados en la piscicultura del Mediterráneo occidental. Comparación con el ecosistema marino circundante” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departament de Química Física i Analítica de la Universitat Jaume I de Castelló, por **Miguel Ángel Blanes Fernández**.

Lo que certificamos a los efectos oportunos en Castelló de la Plana, a 14 de Junio de 2011.

Fdo. Dr. Roque Serrano Gallego

Fdo. Dr. Francisco López Benet

Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctor en Química de la Universitat Jaume I.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por tres censores independientes directamente relacionados con el área de investigación:

- **Dr. Juan Carlos Navarro Tárrega**, Investigador Científico, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- **Dra. M^a Adela Sevillano Cabeza**, Titular de Universidad, Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia.
- **Dr. Antonio Manuel García Carrascosa**, Titular de Universidad, Departamento de Zoología, Universidad de Valencia.

*A todas las buenas personas que de una manera u otra han ayudado a que
este trabajo sea una realidad.*

*A mis amigas y amigos, sabiendo que un amigo es el hermano que uno
mismo se da.*

*A toda mi familia, por el infinito cariño, la permanente compañía y la
lealtad absoluta.*

Muy especialmente a Sandra y a Marco.

RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la presencia y bioacumulación de compuestos organoclorados en la piscicultura del Mediterráneo occidental, así como en el entorno marino circundante.

La investigación realizada se estructura en tres partes diferenciadas. En la primera parte se ha utilizado la técnica GC-MS para el estudio de la presencia de los contaminantes organoclorados en productos de la acuicultura marina, investigándose el comportamiento de los mismos a lo largo del ciclo biológico de la dorada (*Sparus aurata*), y comparando los resultados obtenidos en ejemplares salvajes y cultivados. Además, se ha realizado un estudio específico sobre la transferencia maternal de organoclorados a los ovocitos de doradas salvajes y cultivadas.

En la segunda parte se han determinado las relaciones entre isótopos estables de carbono y nitrógeno con el objetivo de estudiar las diferentes características alimentarias de las doradas salvajes y cultivadas, relacionándolas con el comportamiento de los compuestos organoclorados en las cadenas tróficas estudiadas.

Por último, se ha desarrollado metodología analítica para la determinación de Dioxin-Like PCBs mediante GC-MS/MS (trampa iónica), en muestras procedentes de la acuicultura marina, estudiando en detalle las etapas de purificación de los extractos y el fraccionamiento de los analitos previamente a la determinación analítica.

ÍNDICE GENERAL

Objetivos, metodología y plan de trabajo.....	1
--	----------

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes orgánicos persistentes, compuestos organoclorados.....	11
1.1.1 Bifenilos policlorados.....	12
1.1.2 Plaguicidas organoclorados.....	27
1.1.3 Contaminantes organoclorados en el Mar Mediterráneo: PCBs y DDTs.....	30
1.1.4 Determinación analítica de PCBs y DDTs.....	39
1.2 Isótopos estables	
1.2.1 Uso de los isótopos estables para el estudio de relaciones tróficas.....	42
1.2.2 Determinación analítica de isótopos estables.....	43
1.3 La acuicultura marina	
1.3.1 La acuicultura marina en el mundo.....	44
1.3.2 La acuicultura marina en la Unión Europea.....	45

1.3.3 La acuicultura marina en el Mediterráneo español.....	47
1.4 Estudio de la presencia de contaminantes organoclorados en doradas salvajes y cultivadas del Mediterráneo Occidental	
1.4.1 Zona de estudio.....	50
1.4.2 Especie de estudio.....	53
1.5 Referencias.....	56

CAPÍTULO 2. VARIACIÓN ESTACIONAL Y DISTRIBUCIÓN ENTRE TEJIDOS DE CONTAMINANTES ORGANOCLORADOS EN DORADA (*Sparus aurata*). RELACIÓN CON FACTORES AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS.

2.1 Introducción.....	69
2.2 Artículo científico 1.....	73
<i>Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pollutants in wild and farmed gilthead sea bream (<i>Sparus aurata</i>) from the Western Mediterranean Sea and their relationship with environmental and biological factors.</i>	

M.A. Blanes, R. Serrano, F. J. López.

Archives of environmental contamination and toxicology (2009) 57:133-144

2.3 Artículo científico 2.....109

Maternal transfer of organochlorine compounds to oocytes in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata).

Roque Serrano, Miguel A. Blanes, Francisco J. López.

Chemosphere 70 (2008) 561-566

2.4 Discusión de los resultados.....131

2.5 Referencias.....138

CAPÍTULO 3: BIOMAGNIFICACIÓN DE CONTAMINANTES ORGANOCOLORADOS EN CADENAS TRÓFICAS MARINAS.

3.1 Introducción.....147

3.2 Artículo científico 3.....151

Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the Western Mediterranean.

R. Serrano, M.A. Blanes, L. Orero.

Chemosphere 69 (2007) 1075-1080

3.3 Artículo científico 4.....175

*Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and stable isotope characterization of the trophic chains.*

Roque Serrano, Miguel A. Blanes, Francisco J. López.

Science of the total environment 389 (2008) 340-349

3.4 Discusión de los resultados.....209

3.5 Referencias.....214

CAPITULO 4: DETERMINACIÓN DE PCBs COPLANARES (DIOXIN-LIKE PCBs) EN MUESTRAS PROCEDENTES DE ACUICULTURA MARINA.

4.1 Introducción.....221

4.2 Artículo científico 5.....225

Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls in fish feed and cultured fish fillets using liquid-liquid chromatography clean up and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry

Miguel A. Blanes, Roque Serrano, Francisco J. López, Elena Serrano, Félix Hernández

Talanta (Submitted)

4.3 Discusión de los resultados.....251

4.4 Referencias.....254

CAPITULO 5: CONCLUSIONES GENERALES.....261

**OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON LA
TESIS.....267**

**OBJETIVOS, METODOLOGÍA Y PLAN DE
TRABAJO**

OBJETIVOS

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es el estudio de la presencia y comportamiento de contaminantes organoclorados en productos de la acuicultura marina, así como en el entorno marino circundante a esta actividad en las costas mediterráneas del levante español.

Asimismo se ha estudiado la aplicación de metodología para la determinación de isótopos estables de carbono y nitrógeno para un conocimiento más profundo del comportamiento de los compuestos organoclorados en las cadenas tróficas consideradas en este estudio.

Finalmente, se ha desarrollado metodología analítica para la determinación de Dioxin-Like PCBs en las muestras consideradas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en trampa iónica.

METODOLOGÍA

La metodología seguida en este trabajo puede resumirse en los siguientes apartados:

1. Selección de los analitos de interés y revisión bibliográfica respecto a las técnicas disponibles para su determinación, así como las relaciones de los niveles de organoclorados con otros factores como el ciclo biológico o la biomagnificación de los mismos.

2. Diseño de campañas de muestreo adecuadas a la búsqueda de variaciones estacionales de los niveles de organoclorados. Se ha realizado un esfuerzo especial destinado a detectar el momento del desarrollo gonadal y a conseguir ovocitos de ejemplares silvestres y cultivados para el análisis.

3. Estudio de las condiciones óptimas de preparación de muestra para la determinación de relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno, con especial atención a la extracción de los lípidos.

4. Optimización de las condiciones MS/MS utilizando el detector de trampa iónica para maximizar la sensibilidad y la selectividad en la determinación de los compuestos Dioxin-Like PCBs.

PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo seguido se detalla a continuación:

1. Determinación de compuestos organoclorados en diferentes tejidos de dorada, salvaje y cultivada, estudiando las variaciones estacionales de los niveles encontrados a lo largo del ciclo biológico.

2. Evaluación y estudio del proceso de transferencia maternal de los organoclorados desde el hígado a los ovocitos en las doradas durante el proceso de desarrollo gonadal.

3. Desarrollo de una metodología adecuada para la determinación de relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno en muestras de origen marino, estudiando la relevancia de la etapa de preparación de muestra.

4. Aplicación de las relaciones isotópicas de carbono y nitrógeno para establecer las diferencias existentes entre los niveles tróficos de las doradas salvajes y cultivadas.

5. Desarrollo y validación de una metodología analítica con los niveles de sensibilidad y selectividad adecuados para la determinación de Dioxin-Like PCBs en muestras de acuicultura marina mediterránea.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes orgánicos persistentes, compuestos organoclorados

1.2 Isótopos estables

1.3 La acuicultura marina

1.4 Estudio de la presencia de contaminantes organoclorados en doradas
salvajes y cultivadas del Mediterráneo Occidental

1.5 Referencias

1.1. CONTAMINANTES ORGÁNICOS PERSISTENTES, COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS

Los contaminantes orgánicos persistentes son compuestos generados en grandes cantidades desde los años 50. Durante su producción, uso y eliminación, estos compuestos han entrado en el medio ambiente en cantidades relevantes. Son compuestos tóxicos que se acumulan en los organismos vivos y no son fácilmente degradables. Por ello, tienen una elevada persistencia en el ambiente marino y, dada su capacidad para acumularse en los tejidos grasos, son potencialmente peligrosos para los organismos.

La presencia y ubicuidad de estos compuestos puede ser debida a su elevada vida media o a su continuo aporte al medio. Los casos más relevantes de los primeros serían los insecticidas organoclorados (OCs) y los bifenilos policlorados (PCBs) que exhiben una elevada estabilidad química, carácter relativamente apolar, gran persistencia ambiental y marcada tendencia a acumularse en la fracción lipídica de los organismos. Entre los compuestos con un aporte continuado y actual al medio marino destacan los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), surfactantes y agentes *anti-fouling*.

Hay que destacar por su especial relevancia la existencia de unos compuestos no deseados y que se obtienen como subproductos en diferentes procesos industriales, como son las dioxinas policloradas y los furanos policlorados, PCDDs y PCDFs respectivamente.

Como se ha indicado, los contaminantes organoclorados pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos persistentes. Se pueden clasificar en dos grupos principales. El primero de ellos formado por productos con aplicaciones industriales como los PCBs y el segundo compuesto por plaguicidas de síntesis

como el DDT, Aldrin, Dieldrin, Hexaclorobenceno, Hexaclorociclohexano, Endosulfan, Metoxiclor, Toxafeno, todos ellos utilizados ampliamente en el pasado.

1.1.1 BIFENILOS POLICLORADOS

Los PCBs son compuestos organoclorados de síntesis con aplicación industrial. Su producción comercial comenzó en 1929 y se extendió hasta los años 80; el total acumulado está establecido en 1.2 millones de toneladas. Los PCBs se fabricaron en varios países, que ordenados por relevancia de la cantidad producida son: EUA, Alemania occidental, Francia, Reino Unido, Japón, España, Italia y Checoslovaquia. También la antigua URSS fabricó PCBs, pero no se dispone de cifras exactas (Holoubek 2001).

Usos, fabricación y nomenclatura

Los PCBs han sido extensivamente utilizados, destacando los usos como: fluidos dieléctricos en transformadores y condensadores, fluidos de transferencia de calor, fluidos hidráulicos, lubricantes y aceites de corte, aditivos en pesticidas, adhesivos y plásticos.

La fabricación de los PCBs se lleva a cabo mediante la cloración directa del bifenilo con cloro gas a temperaturas por encima de 170 °C y en presencia de cloruro de hierro como catalizador. El grado de cloración promedio de la mezcla de reacción es controlada por el tiempo de reacción, hasta obtener las propiedades físicas y químicas deseadas (Erickson 2001).

Los PCBs son así sintetizados como mezclas complejas de docenas de diferentes congéneres, siendo cada congénere un PCB característico. Los congéneres con el mismo número de cloros se llaman homólogos, siendo isómeros los homólogos con diferentes posiciones de cloración.

Dadas las condiciones de reacción, no todos los congéneres se obtienen en la misma proporción. Algunos se obtienen de forma mayoritaria y otros se obtienen en muy baja proporción, debido a las consideraciones cinéticas y termodinámicas de la síntesis orgánica. De esta forma, se van obteniendo en la síntesis los isómeros mayoritarios de cada grupo de congéneres, pudiendo llegar a grados mayores de cloración modificando las condiciones de reacción. De esta manera el resultado de la síntesis industrial de PCBs son mezclas de bifenilos policlorados con diferentes índices de cloración.

Las mezclas obtenidas en la síntesis en las que predominan los congéneres de bajo índice de cloración son líquidos claros y viscosos, mientras que las mezclas donde predominan los congéneres de alto índice de cloración son más viscosas, asemejándose más a una resina.

La forma de clasificar estas mezclas industriales para su comercialización y uso ha estado fundamentada en el porcentaje en masa de cloro presente en la mezcla. Tomando como ejemplo la serie de aroclor de Montsanto, el aroclor 1260 contiene un 60% en masa de cloro y el 1245 un 45% en masa de cloro.

Para nombrar a los PCBs se pueden utilizar los nombres estructurales sistemáticos en versión completa (3,3',4,4',5-pentacloro-1,1'-bifenilo) o contraídas (3,3',4,4',5-Pentaclorobifenilo, 3,3',4,4',5-PentaPCB). Esta última forma es muy utilizada, aunque es frecuente referirse mediante un código numérico que asocia a cada congénere un número precedido del genérico PCB, en este caso PCB 126.

Estructura

Los PCBs tienen una estructura química basada en dos moléculas de benceno unidas formando un bifenilo, conteniendo 12 átomos de carbono y con

una cantidad variable de átomos de cloro que sustituyen a los átomos de hidrogeno del bifenilo (Figura 1.1).

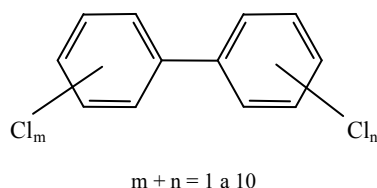


Figura 1.1.: Estructura general de los PCBs.

Hay que destacar que las propiedades fisico-químicas de los PCBs van a depender tanto de la cantidad de cloros que posean como de las posiciones que estos ocupen, siendo esto último especialmente relevante a la hora de explicar la relevancia ecotoxicológica de cada congénere. En este sentido repasaremos brevemente la formación de las diferentes estructuras de los PCBs.

Dado que existen 10 posiciones susceptibles de cloración (Figura 1.2), el grado de sustitución de los bifenilos será desde un átomo de cloro hasta diez, desde el monoclorobifenilo hasta llegar al decaclorobifenilo.

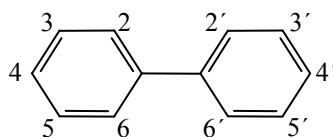


Figura 1.2: Posiciones de sustitución en el bifenilo.

Las posiciones 2, 2', 6, 6' se denominan *orto*, las 3, 3', 5, 5' se denominan *meta* y las 4, 4' se denominan *para*. Por condiciones de simetría, al colocar el primer átomo de cloro solo se pueden generar 3 moléculas distintas. Las posiciones 2, 2', 6, 6' son indistinguibles para un átomo de cloro, de la misma forma las posiciones 3, 5, 3', 5' son una opción única y por último las posiciones 4, 4' son asimismo indistinguibles. Podemos transformar una molécula clorada en

4 en otra clorada en 4' realizando el ejercicio de visualizarla desde atrás del plano del papel (Figura 1.3).

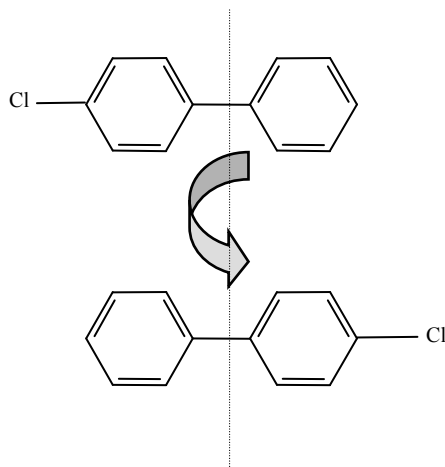


Figura 1.3: Interconversión de las posiciones *para*.

Ahora bien, cuando colocamos un segundo átomo de cloro, tenemos 9 posibles posiciones libres para ubicarlo para cada una de las 3 moléculas monocloradas, Figura 1.4.

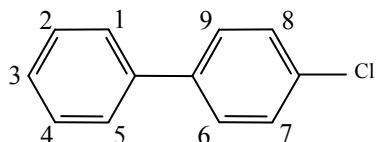


Figura 1.4: Posiciones libres en un monoclorobifenilo.

Para la estructura representada tenemos 9 vacantes donde colocar un segundo átomo de cloro, pero dada la simetría sería equivalente colocarlo en la posición 8 ó 7, en 9 ó 6, en 1 ó 5, en 2 ó 4, ó en 3. Cada pareja es interconvertible girando la estructura 180° según el eje de simetría que contiene (Figura 1.5). Así, solo es posible obtener 5 de las 9 moléculas teóricas.

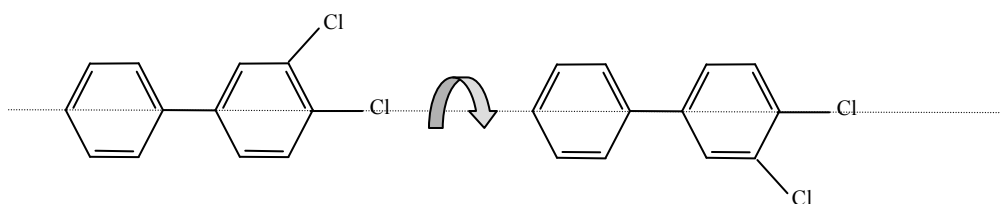


Figura 1.5: Interconversión en el eje axial.

Para los diclorobifenilos, dadas las condiciones de simetría, obtenemos 12 moléculas de las 27 teóricamente posibles. En el caso de añadir otro átomo de cloro para obtener un triclorobifenilo y dado que de las 10 posiciones iniciales se encuentran cubiertas 2, quedan 8 posiciones susceptibles de ser cloradas. Así, en principio, hay 8 posibilidades para cada uno de los 12 congéneres biclorados, aunque por las ya comentadas razones de simetría se generan realmente 24 congéneres triclorados. Este planteamiento puede seguirse para obtener todos los isómeros posibles de los PCBs alcanzando un total de 209 compuestos.

Tabla 1.1: Número de congéneres para cada grupo de homólogos.

Grupo de homólogos	Número de congéneres
Monoclorobifenilos	3
Diclorobifenilos	12
Triclorobifenilos	24
Tetraclorobifenilos	42
Pentaclorobifenilos	46
Hexaclorobifenilos	42
Heptaclorobifenilos	24
Octaclorobifenilos	12
Nonaclorobifenilos	3
Decaclorobifenilo	1
Total PCBs	209

Los PCBs se agrupan por el número de átomos de cloro que poseen en grupos de homólogos, nombrados según la ya expuesta clasificación: monoclorobifenilos, diclorobifenilos, triclorobifenilos, tetraclorobifenilos, pentaclorobifenilos, hexaclorobifenilos, heptaclorobifenilos, octaclorobifenilos, nonaclorobifenilos y decaclorobifenilo.

Se puede observar que el mayor número de compuestos lo alcanzamos para los pentaclorobifenilos, seguidos de hexaclorobifenilos y tetraclorobifenilos (Tabla 1.1). Asimismo hay que considerar que solo 130 isómeros de PCBs de los 209 posibles se encuentran en cantidades relevantes en las mezclas comerciales.

PCBs como contaminantes: orígenes y circulación global

Los PCBs tienen pocas aplicaciones que den lugar a un aporte directo e intencionado sobre el medio ambiente, siendo normalmente liberados al medio como efecto secundario de su uso, desde aplicaciones tales como agentes plastificantes, disolventes, aceites de corte, o en otros casos después de la rotura de circuitos de fluidos hidráulicos o térmicos, el incendio o explosión de instalaciones eléctricas o el incorrecto desmantelamiento de las mismas.

Aunque su producción comenzó en 1929, la mayoría de los PCBs se fabricaron en el periodo entre 1950 y 1983. Se estima que en 1982 el 31% de los PCBs ya había sido dispersado en el medio ambiente, el 4% había sido destruido y el 65% continuaba en uso, almacenado o depositado en vertederos. Asimismo se estima que dadas sus propiedades físico-químicas cerca del 99% en masa de los PCBs liberados al ambiente se encontraría adsorbido en el suelo (Erickson 2001).

El tránsito y la distribución global de los PCBs son, en gran medida, una consecuencia previsible de sus propiedades físico-químicas (Holoubeck 2001). Los PCBs son muy resistentes a la degradación química y biológica,

particularmente los congéneres con índices de cloración más altos, teniendo muy alta persistencia en suelos, sedimentos y biota. Son moléculas apolares, por lo que se pueden acumular en los tejidos grasos. Esto puede, en algunos casos, desencadenar un proceso de biomagnificación, encontrando niveles mayores de PCBs en los niveles altos de las cadenas tróficas.

Los PCBs están sometidos a un transporte de larga distancia desde la fuente de emisión de los mismos. Este transporte es explicable en parte por la fugacidad o tendencia de escape que si es mayor en una fase que en otra, provoca que un compuesto pase de una a la otra, transfiriéndose de esta forma de una atmósfera contaminada a un lago no contaminado, o de un suelo contaminado a una atmósfera no contaminada. Así pues, los países industrializados de zonas templadas, donde la manufactura o uso de PCBs en las décadas de 1960-1970 fue muy intenso, se convirtieron en fuentes de contaminación a escala global.

Los procesos de transporte están controlados por la temperatura, la presión de vapor y la apolaridad de los PCBs, que tienen diferentes propiedades físico-químicas en función de su índice de cloración, produciéndose un fraccionamiento de los diferentes congéneres. Los PCBs de bajo índice de cloración alcanzan más fácilmente el equilibrio con la atmósfera, mientras que los mas clorados tienden a asociarse con partículas o con carbón orgánico (Holoubeck 2001).

El parámetro más utilizado para predecir y evaluar en cierta medida la capacidad potencial de una sustancia para acumularse en los organismos vivos y, en consecuencia, a lo largo de las redes tróficas, es el logaritmo del coeficiente de reparto entre octanol y agua (Log Kow). Este parámetro estima la mayor o menor afinidad por la fracción lipídica y como consecuencia la adsorción en suelos o sedimentos y la posible biomagnificación en organismos acuáticos. En el caso de los PCBs obtenemos valores para el Log Kow que dependen fundamentalmente

del grado de cloración, oscilando desde 4.7 para el monoclorobifenilo hasta valores alrededor de 8 para los congéneres de mayor cloración (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Valores del logaritmo del coeficiente de reparto entre octanol y agua para los diferentes homólogos.

Homólogo	Log Kow
Monoclorobifenilo	4.7
Diclorobifenilo	5.1
Triclorobifenilo	5.5
Tetraclorobifenilo	5.9
Pentaclorobifenilo	6.3
Hexaclorobifenilo	6.7
Heptaclorobifenilo	7.1
Octaclorobifenilo	7.5
Nonaclorobifenilo	7.9
Decaclorobifenilo	8.3

Biodegradación y metabolismo

En primer lugar, es necesario destacar que las rutas de biodegradación o metabolismo de los PCBs estarán condicionadas por las propiedades físico-químicas concretas de cada congénere, su Log Kow y su estereoquímica.

La biodegradación puede transcurrir por rutas anaeróbicas o aeróbicas, o también puede ocurrir de manera secuencial: primero por rutas anaeróbicas, donde el compuesto pierde parte de los átomos de cloro pasando a un índice de cloración menor, para ser completamente degradado por rutas aeróbicas.

La degradación anaeróbica de los PCBs implica deshalogenación reductiva del átomo de cloro, donde el compuesto halogenado es el aceptor de electrones.

La deshalogenación reductiva ataca predominantemente a los cloros situados en posiciones *meta* y *para*, siendo más difíciles de atacar los sustituyentes en *orto*. La pérdida preferente de los átomos de cloro en posiciones *meta* y *para* puede reducir la presencia de los congéneres coplanares Dioxin-Like PCBs (Borja et al. 2005).

La degradación aeróbica de los PCBs puede partir de productos de degradación de vías anaeróbicas de bajo índice de cloración. Esto facilita etapas que conducen a la apertura del anillo, que no son viables cuando hay muchos sustituyentes cloro en el bifenilo.

Las rutas aeróbicas constan de muchas etapas, pudiéndose identificar ciertos intermedios como ácidos clorobenzoicos, ácidos benzoicos y catecoles. Existen múltiples rutas posibles dependiendo del medio y de los microorganismos presentes. En líneas generales se cumplen una serie de premisas descritas por Furukawa (Borja et al. 2005):

- La tasa de biodegradación de los PCBs desciende conforme aumenta el índice de cloración.
- Un PCB con dos sustituyentes cloro en posiciones orto en el mismo anillo (2,6-) o en diferente anillo (2,2'-), muestra una alta resistencia a la degradación.
- Los PCBs que tienen sustituyentes cloro en un solo anillo se degradan más rápido que otros PCBs con el mismo número de cloros repartido entre los dos anillos.
- Los PCBs tetraclorados y pentaclorados que tienen átomos de cloro en posiciones 2,3- en un anillo, son más fácilmente atacados que otros PCBs con el mismo índice de cloración.

- La hidroxilación previa a la apertura del anillo se produce en el anillo no clorado, o menos clorado, de la molécula.

La biodegradación de los PCBs no está favorecida, ya que estos no poseen grupos funcionales reactivos; de manera que estas moléculas lipofílicas deben hidroxilarse primero para convertirse en polares y poder ser así excretadas.

El factor limitante en la eliminación de los PCBs es el de la metabolización que ocurre gracias al sistema mono-oxigenasa dependiente del Citocromo P-450. Los productos hidroxilados son los metabolitos mayoritarios de los PCBs y se sabe que la hidroxilación ocurre mayoritariamente en las posiciones *para* o *meta*, si estas no están cloro-sustituidas.

El contenido en cloro, el patrón de sustitución (posiciones que ocupan los átomos de cloro) y la presencia de ciertas iso-enzimas del sistema Citocromo P-450, son los factores más importantes en el metabolismo de los PCBs (Fiedler y Lau 1998).

En general, el metabolismo de los PCBs desciende conforme aumentan los sustituyentes cloro y descienden las posiciones adyacentes no cloradas. De esta forma, los congéneres muy clorados con grupos 2,3,4-tricloro fenil son resistentes a la degradación biológica. Asimismo, se han identificado otros metabolitos de PCBs con estructura de catecol y metilsulfona (James 2001). Las metilsulfonas, como productos de degradación de bifenilos policlorados, se han encontrado en múltiples tejidos de animales expuestos a PCBs. Son compuestos apolares que se pueden acumular en la fracción lipídica de algunos tejidos, como el tejido adiposo y el hígado (Larsson et al. 2002), si bien es necesario que el organismo implicado tenga esta capacidad de metabolización de PCB a metilsulfona (Stapleton et al. 2001).

Toxicidad de los PCBs

La toxicidad de los PCBs depende de la estructura de los mismos. Diferentes estructuras desencadenan diferentes efectos en el organismo. De esta forma, los congéneres de PCBs muestran individualmente un amplio espectro de respuestas bioquímicas y tóxicas: cancerígenos, disruptores endocrinos o trastornos en el desarrollo, entre otros. No obstante, el caso más relevante por su gravedad es el de los PCBs que muestran una actividad toxicológica similar a la de las dioxinas, como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (Figura 1.6).

La actividad toxicológica de tipo dioxina se basa en el reconocimiento de una molécula dada por el receptor Ah-receptor (receptor para aril-hidrocarbano). Este receptor reconoce a las dioxinas policloradas, a los hidrocarburos policíclicos aromáticos y a algunos congéneres de PCBs que cumplen con una serie de características estructurales específicas (Safe 2001).

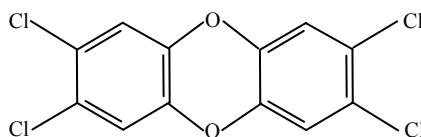


Figura 1.6: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina.

Estas características estructurales son:

- 1- El bifenilo deberá tener 4 sustituyentes cloro como mínimo.
- 2- Las posiciones en *para* estarán ocupadas por sendos cloros.
- 3- La molécula tendrá dos o más cloros en *meta*.
- 4- Las posiciones en *orto* estarán libres de cloro o solamente habrá uno.

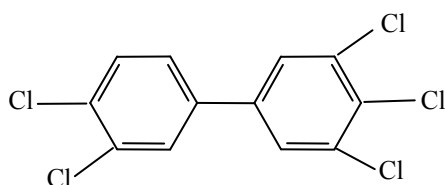


Figura 1.7: PCB 126.

En este conjunto de PCBs ambos fenilos pueden situarse en un plano y si cumplen además la serie de características estructurales anteriormente enumeradas, obtenemos los llamados Dioxin-Like PCBs (Figura 1.7), de ahora en adelante D-L PCBs (Tabla 1.3).

La toxicidad de estos compuestos varía dependiendo de las posiciones ocupadas por los átomos de cloro. Para conocer la toxicidad de una mezcla de D-L PCBs existe una serie de equivalencias de toxicidad normalizadas. Se referencia la toxicidad de cada uno de los PCBs estudiados respecto a la toxicidad de la dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina, conocida como 2,3,7,8-TCDD, que es la más tóxica y se le asigna un valor de toxicidad unidad. En función de la toxicidad de cada uno de los D-L PCBs se les asigna un factor de equivalencia tóxica (TEF), obteniéndose a partir de los TEFs de los PCBs el equivalente tóxico (TEQ), a partir de la formula:

$$\text{TEQ} = ([\text{PCB 126}] * \text{TEF}_{\text{PCB 126}}) + ([\text{PCB 118}] * \text{TEF}_{\text{PCB 118}}) + ([\text{PCB 169}] * \text{TEF}_{\text{PCB 169}})$$

Siendo [PCB 126] la concentración del PCB 126 y $\text{TEF}_{\text{PCB 126}}$ su factor de equivalencia tóxica. Así sucesivamente, obtenemos el TEQ de la muestra (Tabla 1.3). También existe esta asignación estandarizada para la toxicidad de los furanos policlorados (PCDFs) y las dioxinas policloradas (PCDDs).

Los primeros casos de toxicidad aguda con PCBs ocurrieron en trabajadores de plantas industriales donde se manufacturaban PCBs o se utilizaban en gran cantidad, como en centrales con condensadores y transformadores eléctricos. En estas condiciones se da exposición prolongada a PCBs y hay claros indicios de varios problemas de salud asociados: dermatológicos severos y mayor porcentaje de cáncer, aunque este grupo de población estaba expuesto a más sustancias tóxicas tales como disolventes y metales pesados (Persky 2001).

Tabla 1.3: Congéneres Dioxin-Like, factores de equivalencia tóxica, UE R.1881/2006 (EU 2006 b).

Congéneres	PCB	TEF
No- <i>orto</i> -sustituidos	77	0.0001
	81	0.0001
	126	0.1
	169	0.01
Mono- <i>orto</i> -sustituidos	105	0.0001
	114	0.0005
	118	0.0001
	123	0.0001
	156	0.0005
	157	0.0005
	167	0.00001
189	0.0001	

Existen casos de intoxicación masiva con PCBs como los de Yusho en Japón en 1968 o YuCheng en Taiwan en 1979. En ambos casos una población de varios miles de personas consumió aceite de arroz contaminado con PCBs, habiendo una gran exposición prenatal que provocó una generación de niños con multitud de problemas de desarrollo y crecimiento, además de

hiperbilirrubinemia, hiperpigmentación, deformidades en cara, dientes y encías, falta de peso y altura y desordenes del comportamiento (Guo y Hsu 2001). Estos efectos son atribuibles en su mayoría a la toxicidad de compuestos Dioxin-Like presentes en las mezclas de PCB. No todos los efectos observados en este caso son atribuibles a los PCBs coplanares, ya que en el aceite de Yusho analizado se encontró una cantidad significativa de dibenzofuranos policlorados, que también exhiben actividad Dioxin-Like (Yao et al. 2002).

No obstante, la exposición más habitual en los seres humanos es la crónica, que depende de múltiples factores, como la dieta, la zona de residencia o, incluso, la exposición laboral (Freels et al. 2007).

La relevancia de la exposición crónica y la importancia de la dieta como principal vía de entrada de PCBs al organismo ha sido ampliamente estudiada (Domingo y Bocio 2007, Bordajandi et al. 2006, Abad et al. 2002). Los efectos de los PCBs como disruptores endocrinos y, en concreto, sus efectos sobre la función tiroidea han sido objeto de múltiples estudios (Longnecker 2001). De igual forma, un tema de la máxima relevancia es la transferencia de PCBs vía la leche materna, dada la especial vulnerabilidad del recién nacido (Glynn et al. 2001).

Regulación de usos y situación legal de los PCBs

Los PCBs son compuestos apolares que destacan por su elevada estabilidad y difícil degradación, características que redundan en una alta capacidad de bioacumulación en los organismos vivos y en las cadenas tróficas. Estas características junto con una demostrada toxicidad provocaron que a partir de los años 70 varios países como EUA y Japón comenzaran a regular sus usos y prohibir después toda fabricación de PCBs. Monsanto, máximo productor de PCBs, limitó a partir de 1972 las ventas de PCBs a usos de ciclo cerrado en

transformadores y condensadores eléctricos, evaluados como menos relevantes para evitar el aporte de PCBs al medio.

A estas medidas se fueron sumando países como Alemania y el resto de Europa Occidental, llegando a una prohibición de fabricación y nuevos usos en muchos países a partir de 1985. Según los datos de la Agencia para el Medio Ambiente de las Naciones Unidas (UN 2002) no existe actualmente fabricación de PCBs en ningún lugar del mundo. No obstante, en muchos lugares los PCBs continúan en uso como fluidos en condensadores y transformadores eléctricos. Además, gran cantidad de PCBs y de residuos con alto contenido en PCBs están acumulados en muchas partes del mundo esperando tratamiento.

La necesidad de control sobre los PCBs se ha traducido en una serie de medidas en diferentes marcos de referencia. Una vez prohibida su fabricación, la siguiente etapa ha sido el inventariado completo de stocks de PCBs, equipamientos y depósitos. Una vez realizados los inventarios, son necesarios planes nacionales de gestión del stock. El correspondiente Plan Nacional para España se aprobó en 1999 (UN 2002).

Dentro de la Unión Europea, la estrategia común sobre los PCBs está regulada entre otras normas por la Directiva/96/59/EEC sobre eliminación de PCBs y PCTs (EU 1996) y la Directiva/1999/31 sobre los vertederos de residuos (EU 1999). Asimismo, la COM(2001) 593 (Comunicación de la Comisión al Consejo, el Parlamento y el Comité Económico y Social) (EU 2001), recoge la Estrategia comunitaria sobre las dioxinas, los furanos y los bifenilos policlorados, destacando en el anexo I de la misma un listado de legislación comunitaria en vigor sobre dioxinas y PCBs. Destaca de igual forma la COM(2004) 240 (EU 2004), relativa a la aplicación de la Estrategia comunitaria COM(2001) 593 (EU 2001).

A nivel internacional destaca la Convención de Basel que regula el tránsito internacional de desechos tóxicos y peligrosos como los correspondientes a los PCBs y su vertido. La Convención de Basel se acordó en 1989 y entró en vigor en Mayo de 1992 (UN 2002).

Respecto a los niveles máximos de PCBs y DL-PCBs permitidos en productos alimenticios, la normativa comunitaria se recoge en el reglamento N° 1881/2006 de la Comisión, “por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios” (EU 2006 b), los niveles máximos autorizados para las Dioxinas y los D-L PCBs en diferentes grupos de alimentos, estableciendo los correspondientes TEF (Tabla 1.3). Asimismo destaca la Recomendación de la Comisión de 16 de noviembre de 2006 (2006/794/CE) relativa al control de los niveles de base de las dioxinas, los PCBs similares a las dioxinas y los PCBs no similares a las dioxinas en los productos alimenticios (EU 2006 a), donde se recogen las recomendaciones sobre la cantidad de muestras de cada tipo de alimento a analizar en los programas de control con periodicidad anual y se refleja la necesidad de analizar los PCBs no similares a las dioxinas cuando sea posible. Se establece una estandarización sobre la forma y contenido del informe de resultados para facilitar la evaluación y comparación de los resultados. Es importante comentar la relevancia que en todo este desarrollo normativo y de programas de control tuvo la crisis de las dioxinas ocurrida en Bélgica en 1999 ya que, probablemente, aceleró todo este proceso.

1.1.2 PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS

La mayoría de los plaguicidas utilizados en el pasado eran compuestos organoclorados. Los plaguicidas son intencionadamente introducidos en el medio ambiente y, en ocasiones, se diseñan como moléculas estables para garantizar su efectividad por periodos largos de tiempo. Estos plaguicidas estables sufren

procesos de reparto en el medio ambiente y, de esta forma, alcanzan compartimentos ambientales muy alejados de los inicialmente considerados como objetivo. Además, algunos plaguicidas organoclorados se han utilizado en grandes cantidades. La gran mayoría de plaguicidas organoclorados como el mirex, toxafeno, aldrin, 2,4,5-T y otros, están prohibidos en los países industrializados, aunque el plaguicida organoclorado más conocido es probablemente el DDT.

DDT

El diclorodifeniltricloroetano, también llamado DDT, es un insecticida de contacto no sistémico y de amplio espectro. Fue sintetizado por primera vez en 1874 por Othmar Zeidler.

El DDT es un compuesto organoclorado de síntesis, tiene alta persistencia y es muy liposoluble, Log Kow = 6.36. Dadas sus características, el DDT tiene más facilidad para traspasar la cutícula de los insectos que la piel de los animales, por lo que se consideró su uso como seguro y específico en gran cantidad de aplicaciones.

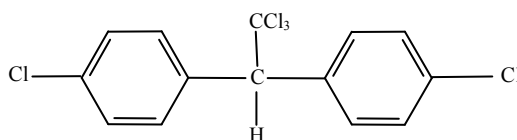


Figura 1.8. Estructura química del DDT.

La actividad insecticida del DDT fue detectada en 1939 por Paul Müller, lo que le valió la concesión del premio Nóbel de Medicina en 1946. Desde 1940 hasta 1970, el DDT fue utilizado de manera masiva a lo largo de todo el mundo, teniendo resultados excelentes en el control de enfermedades como el tifus o la malaria, llegando a aplicarse alrededor de 100000 toneladas en 1963 (Schuurmann 1998).

Metabolismo del DDT

El DDT tiene dos metabolitos principales, el DDD y el DDE. Estos metabolitos se pueden obtener por reacciones fotolíticas del DDT, aunque son mucho más interesantes los procesos de metabolización in vivo.

El DDT sufre metabolización por los microsomas hepáticos. El Citocromo P-450 y otros enzimas microsomales inician el proceso eliminando un átomo de cloro del DDT para obtener DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno) (Figura 1.9.), y la reducción a DDD (1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano) (Figura 1.10). También existen otros metabolitos como el DDA, pero no son relevantes (Roberts 1999).

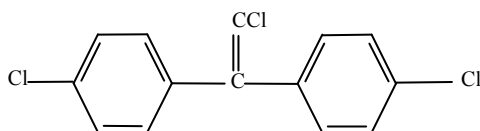


Figura 1.9: DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno)

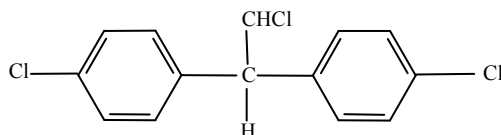


Figura 1.10: DDD (1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano)

Presencia del DDT en el medio ambiente, ecotoxicología

El uso habitual del DDT como insecticida contempla una aplicación directa sobre el medio ambiente y sobre los organismos vivos. Dada su alta persistencia y

elevada lipofilicidad es relativamente habitual que el DDT y sus metabolitos sean encontrados en todos los compartimentos ambientales y en todos los lugares del mundo, desde las latitudes cálidas hasta las áreas polares (Fiedler y Lau 1998). Es interesante indicar que dada la relativamente rápida conversión del DDT en su metabolito DDE, la relación entre las concentraciones entre ambos se puede utilizar como medida temporal de la llegada del DDT al medio (Wright y Welbourn 2002).

La exposición a DDT provoca fragilidad en la cáscara del huevo de muchas aves, tiene una moderada toxicidad aguda en mamíferos, pero exhibe actividad de disruptor endocrino y posible actividad carcinogénica en humanos (UN 2002).

El mecanismo de acción del DDT se centra en el sistema nervioso. Las propiedades enzimáticas y electrofisiológicas de la membrana neuronal son significativamente modificadas y los canales de sodio son alterados, interfiriendo en el mecanismo del transporte activo de los iones Na^+ fuera del axón. Los canales potasio son también alterados. El DDT afecta inhibiendo a las Na^+ -ATPasas y a las Ca^{2+} -ATPasas. Asimismo el DDT inhibe la calmodulina necesaria para el transporte del Ca^{2+} .

El DDE, principal metabolito de DDT, tiene especial relevancia ecotoxicológica ya que es difícil encontrar un compartimento ambiental donde no se encuentre cierta cantidad de DDE. El DDE tiene descrita una potente actividad carcinogénica y de disruptor endocrino.

1.1.3 CONTAMINANTES ORGANOCLORADOS EN EL MAR MEDITERRÁNEO: PCBs Y DDTs

La información disponible sobre la presencia de contaminantes orgánicos persistentes en el Mar Mediterráneo es diversa. Existen muchos artículos de

investigación, revisiones, informes y monografías. En muchos casos, cuando se intenta comparar esta información para establecer relaciones o pautas surgen dificultades, ya que existe mucha información sobre algunos compartimentos ambientales o matrices y poca sobre otros. Asimismo, se han estudiado en profundidad alguno de los focos de emisión identificados, pero poco o nada otras zonas; además, las diferentes metodologías utilizadas no siempre proporcionan datos comparables.

Niveles y transporte en los diferentes compartimentos ambientales

Los PCBs y DDTs son ubicuos en el medio marino, resultado directo de un extensivo uso y una relativa movilidad, controlada por el Log Kow y la volatilidad. El conocimiento de los mecanismos de transporte, así como de las fuentes de organoclorados, es fundamental para identificar los principales riesgos asociados.

Dada la situación geográfica del Mar Mediterráneo, un mar semicerrado con unas riberas muy pobladas y ocupadas por países en diferentes estados de desarrollo, podemos encontrar todo tipo de situaciones respecto al uso de compuestos organoclorados, tanto en el pasado reciente como en la actualidad.

Respecto a los plaguicidas organoclorados la situación es diversa. Hay una clara y marcada tendencia hacia un uso menor de los organoclorados, de manera que la mayoría se han dejado de utilizar, pero anteriormente fueron utilizados de manera masiva en la región. Actualmente, quedan algunos usos para el DDT: se utiliza como precursor en la síntesis del Dicofol, en aplicaciones específicas y, lo que es más difícil de controlar, la existencia de múltiples depósitos obsoletos de DDT junto con otros plaguicidas en cantidades relevantes (UN 2002).

En la región Mediterránea los PCBs fueron fabricados por países como Francia, Italia y España, alcanzando en el periodo 1954-1984 una producción acumulada de 300000 toneladas. En la actualidad continúan estando presentes en prácticamente todos los países de la zona, dado que multitud de equipamientos los contienen. Pese a estas circunstancias y gracias a las medidas de control aplicadas, las emisiones de PCBs al medio han disminuido progresivamente, aunque cabe destacar la generación de focos de emisión en las recientes guerras balcánicas y libanesas, en las que múltiples infraestructuras que contenían PCBs fueron destruidas, liberando al medio cantidades importantes (UN 2002). Como se ha referido previamente, los PCBs y los equipos que los contienen son actualmente objeto de políticas de control, basadas en su inventariado, gestión controlada de los residuos de PCBs y destrucción de los mismos mediante tecnologías “limpias” (UN 2002).

Las fuentes principales de emisión, vectores de transporte y reservorios de contaminantes organoclorados en la región Mediterránea se muestran en la Tabla 1.4. En el caso de la afectación al Mar Mediterráneo los más relevantes son el aporte de los ríos y el lixiviado desde las costas.

La deposición atmosférica es una de las vías de transporte de PCBs y DDTs al medio marino mediterráneo. Es interesante destacar que a partir de los estudios y modelos existentes se define con claridad un gradiente norte-sur con mayores deposiciones al norte, cerca de las costas de los países más industrializados y menores al sur. Además de esta tendencia general, se observa que la máxima deposición se alcanza en el Mar Adriático, seguida por la observada en la mitad norte del Mediterráneo Occidental, en las zonas del Mar Balear, Tirreno y Ligur, alcanzando hasta la costa italiana (Albaigés 2005). También se supone una salida de PCBs a la atmósfera desde la interfase agua-aire en los meses más cálidos del año, cuando la temperatura del agua en superficie es muy alta.

Tabla 1.4 Principales fuentes de emisión, vectores de transporte y reservorios de organoclorados en la Región Mediterránea (Modificado de UN 2002)

<i>Compuesto</i>	<i>Aire</i>	<i>Suelos</i>	<i>Aguas Continentales</i>	<i>Aguas Marinas</i>
DDTs	Uso agrícola Fumigación	Depósitos de DDT Producción de dicofol	Lixiviado de usos agrícolas Producción de dicofol	Aporte de grandes ríos y aportes costeros
PCBs	Emisión de equipamientos y stocks Incineración de lodos de depuradora	Emisión de equipamientos y stocks Aplicación de lodos de depuradora	Escapes de equipamientos	Aporte de grandes ríos y aportes costeros Deposición atmosférica Vertido de lodos de depuradora

Otra de las principales vías de aporte de PCBs y DDTs al medio marino son los ríos y las descargas de aguas residuales al mar. Se observa una situación parecida a la estudiada para los aportes por deposición atmosférica. Las zonas más afectadas son el Mediterráneo Noroccidental en primer lugar, seguido del mar Adriático. Esta situación está claramente relacionada con el hecho de que estas dos zonas recogen hasta el 70% de aportes fluviales a la cuenca. Las afectaciones a los grandes ríos están caracterizadas por las cuencas por donde discurren: afectación urbana e industrial (Ródano), afectación industrial y agrícola (Ebro y Po) o afectación urbana y agrícola (Nilo).

Se han detectado altas concentraciones de plaguicidas y productos industriales en estudios específicos realizados sobre ríos de zonas afectadas por actividades industriales, agrícolas o urbanas (Albaigés 2005). Hay que considerar

que el aporte de contaminantes por los ríos fluctúa de manera estacional según el caudal y las posibles aplicaciones de plaguicidas o vertidos de contaminantes. Además, es fundamental considerar si el transporte se produce en la fase disuelta o asociado a la materia en suspensión. En el caso del río Ebro se observa en periodos de crecidas del caudal un aumento de la concentración de organoclorados (PCBs y DDTs) asociados al material particulado (Gómez-Gutiérrez et al. 2006), pudiendo estar este fenómeno relacionado con la resuspensión de sedimentos contaminados del lecho del río.

En las desembocaduras de los ríos, los medios deltaicos (Ebro, Ródano, Po y Nilo) tienen una especial relevancia en la deposición de los contaminantes hidrofóbicos en las zonas costeras, ya que la interfase agua dulce-agua salada potencia los procesos de sedimentación. De hecho, el 80% de los sedimentos terrestres quedan atrapados en la plataforma continental y solo las partículas más finas son transportadas por las corrientes hacia los sedimentos de aguas profundas.

Aunque existe la eliminación de contaminantes apolares en las capas superficiales del mar por volatilización directa hacia la atmósfera, proceso favorecido por la temperatura, es más importante la adsorción que se produce sobre material particulado de origen biogénico (materia fecal de zooplancton y neuston). Este mecanismo sufre una marcada oscilación estacional en función de los ciclos de producción primaria y de los niveles de biomasa de zooplancton en superficie, con un máximo a finales de invierno y un mínimo a finales de verano (Albaigés 2005). Este mecanismo será especialmente relevante en las aguas sin aporte de sedimentos costeros.

Se pueden establecer dos conclusiones de carácter general sobre la presencia de PCBs en el Mar Mediterráneo (Albaigés 2005):

1-En el agua hay un enriquecimiento superficial acompañado de un descenso rápido en profundidad. Este hecho es coherente con la entrada de PCBs por las aguas superficiales, seguido de un transporte en profundidad asociado al rápido hundimiento de las partículas que sedimentan. Pese a estas condiciones se considera que existe una recirculación en las aguas profundas y en la interfase agua-sedimentos, ya que la tasa de hundimiento de los PCBs en la capa fótica es mayor que el flujo de acumulación en los sedimentos.

2-Los sedimentos costeros contienen el 55% de los PCBs acumulados en los sedimentos marinos, mientras que la plataforma continental contribuye con solo el 15% de la superficie de los fondos marinos.

Presencia de organoclorados en los organismos

Los organismos que habitan en las áreas costeras han sido frecuentemente propuestos para estudiar la contaminación por organoclorados de origen continental, ya que pueden concentrar en sus tejidos los compuestos hidrofóbicos, ya sea por la dieta o directamente mediante la respiración.

En el mar Mediterráneo, junto con el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), especie suspensívora-filtradora, también ha sido muy utilizado el salmonete (*Mullus* sp.), especie que dadas sus características bentónicas y territoriales refleja especialmente la contaminación del compartimento sedimentario (Albaigés 2005). También se ha estudiado la presencia de organoclorados en especies de peces que ocupan otras regiones marinas, pelágicos y migradores, mesopelágicos y especies de profundidad (Tabla 1.5.). Las diferencias de concentración que se han encontrado se han atribuido a los diferentes hábitats donde se alimentan. Se observa que en las zonas costeras es donde hay mayor contaminación, seguidas de los ecosistemas de profundidad. Este hecho está claramente relacionado con la dinámica ya expuesta de los PCBs y DDTs en el medio marino.

Tabla 1.5 Concentraciones (ng/g peso fresco) de compuestos organoclorados en tejidos de peces recogidos en el Mediterráneo Noroccidental, (Modificado de Albaiges 2005).

Especie	Hábitat	Sum DDTs	Sum 7 PCBs
<i>Mullus</i> sp. (mar Ligur)	Costero	17-82	41-147
<i>Mullus</i> sp. (mar Catalán)		4.4-16.8	8.7-20.3
<i>Dicentrarchus</i> sp.		2.6-4.0	4.4-6.2
<i>Lepidorombus</i> sp.	Mesopelágico	0.8±0.2	2.1±0.3
<i>Phycis</i> sp.		0.4±0.1	1.0±0.2
<i>Lepidion</i> sp.	Mar Profundo	6.0-7.1	8.3-9.4
<i>Coryphaenoides</i> sp.		1.9-4.3	2.5-4.6
<i>Bathypterois</i> sp.		5.0-10.2	6.0-10.0
<i>Mora moro</i>		7.4-12.6	9.0-16.2

Sum DDTs=[DDT]+[DDE]+[DDD]
Sum 7 PCBs=[PCB 28]+[PCB 52]+[PCB 101]+[PCB 118]+[PCB 138]+[PCB 153]+[PCB 180]

Bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación en los organismos acuáticos

Los contaminantes orgánicos apolares se pueden acumular en los organismos marinos mediante diferentes mecanismos: vía la absorción directa desde el agua a través de las agallas o la piel (bioconcentración), vía la ingestión de partículas en suspensión o mediante el consumo de fuentes de alimento contaminadas (biomagnificación). Los niveles de contaminantes en los organismos vivos estarán determinados por las cinéticas de absorción y de eliminación. El modelo general de bioacumulación en organismos acuáticos se muestra en la Figura 1.11.

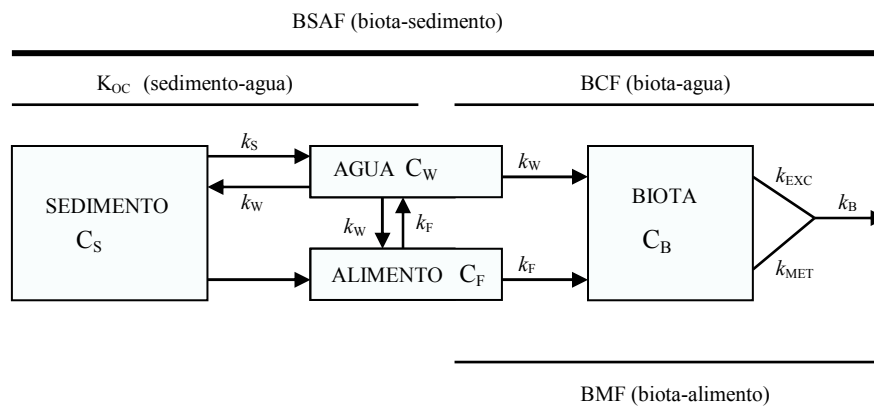


Figura 1.11. Modelo general del proceso de bioacumulación en organismos marinos. K_{OC} : coeficiente de reparto; BCF: factor de bioconcentración; BSAF: factor de acumulación sedimento-biota; BMF: factor de biomagnificación; C: concentración; k constante cinética; Subíndices W, F, B, EXC y MET: agua, alimento, biota, excreción y metabolismo respectivamente. (Modificado de van der Oost et al. 2003)

De acuerdo con este modelo, la concentración del contaminante en la biota (C_B) en función del tiempo (t) se puede expresar como:

$$dC_B/dt = [k_W C_W + k_F C_F] - k_B C_B = [k_W C_W + k_F C_F] - [k_{EXC} + k_{MET}] C_B$$

Donde C_B es la concentración en biota, C_W es la concentración en el agua y C_F es la concentración en el alimento, siendo k_W , k_F , k_B , k_{EXC} y k_{MET} las constantes cinéticas correspondientes a agua, alimento, biota, excreción y metabolismo respectivamente.

La asimilación de contaminantes en los peces puede ser mediante intercambio directo con la fase acuosa ($k_W C_W$) o indirecto mediante el consumo

de alimentos contaminados ($k_F C_F$). Además, puede producirse metabolismo de los contaminantes ($k_{MET} C_B$). La depuración-excreción puede producirse vía eliminación a través de las membranas de las agallas o vía eliminación fecal hacia el agua circundante ($k_{EXC} C_B$).

Bioconcentración

El factor de bioconcentración (BCF) de un compuesto químico es la ratio entre la concentración del mismo en el organismo y en el agua en el equilibrio. Alcanzado el estado estacionario, el BCF puede expresarse como:

$$BCF = k_W / k_B = C_B / C_W$$

El movimiento de los contaminantes está condicionado por la adsorción sobre el material particulado y los sedimentos. La adsorción depende de las características del contaminante y de los sedimentos. Cuando se considera el reparto del contaminante entre el agua y los sedimentos se define mediante el coeficiente de adsorción.

$$K_{OC} = k_W / k_S = C_S / C_W$$

Cuando se supone el equilibrio, el factor de bioconcentración (BCF) y el coeficiente de adsorción se pueden unificar en una sola expresión, definiéndose el factor de acumulación sedimento-biota (BSAF).

$$BSAF = C_B / C_S = BCF / K_{OC}$$

Biomagnificación

La biomagnificación es la ratio entre los contaminantes asimilados desde los alimentos y su eliminación.

$$\text{BMF} = k_F / k_B = F_F (E_F / k_B)$$

F_F representa la cantidad de comida transportada a través de los intestinos por gramo de pez por día y E_F la eficiencia en la asimilación del contaminante desde el alimento.

La biomagnificación es un proceso complejo y se ha sugerido que la posible bioacumulación de un compuesto dado estará muy relacionada con el $\text{Log } K_{OW}$, siendo mayor la tendencia a la bioacumulación a valores más altos de $\text{Log } K_{OW}$.

La expresión más frecuentemente utilizada para el cálculo del BMF es

$$\text{BMF} = C_{\text{lip. dep.}} / C_{\text{lip. alim.}}$$

donde BMF es el ratio entre las concentraciones en base lipídica entre el depredador y su presa o alimento.

1.1.4 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE PCBs Y DDTs

Las especiales circunstancias que rodean el estudio de PCBs y DDTs en cadenas tróficas marinas, con matrices de alta complejidad y niveles de concentración normalmente muy bajos (pg/g), hacen generalmente necesaria la aplicación de sucesivas etapas de extracción, purificación, separación y concentración. Asimismo la técnica de determinación elegida, normalmente cromatografía de gases (GC) acoplada a detección por espectrometría de masas (MS), condicionará parte de la preparación de muestra, ya que es necesario conseguir compatibilidad entre el extracto final y el sistema de GC-MS.

Dadas las características apolares de los PCBs y DDTs, en su extracción se produce la co-extracción de los lípidos, haciendo imprescindible etapas de

purificación o clean-up con objeto de eliminarlos del extracto, ya que son incompatibles con el sistema GC-MS.

La etapa de extracción se puede realizar utilizando solamente disolvente y calor mediante una extracción a reflujo o mediante un sistema soxhlet, o también utilizando sistemas más avanzados como la extracción con disolvente a presión (PLE/ASE) o la extracción asistida por microondas (MAE) (van Leeuwen and de Boer 2008).

El extracto obtenido se concentra en un sistema de rotavapor o de Kuderna Danish y a continuación es sometido a las etapas de purificación (clean-up). Existen métodos destructivos para eliminar los lípidos como la saponificación o la digestión ácida, cuando los analitos de interés resistan esas condiciones de trabajo. Asimismo, existen técnicas no destructivas poco extendidas como la congelación del extracto para la eliminación de los lípidos y otras ampliamente utilizadas como la extracción en fase sólida (SPE), la cromatografía de permeación en gel (GPC) (van Leeuwen and de Boer 2008), o diferentes tipos de cromatografía líquida preparativa (Serrano et al. 2003).

Una vez eliminados la mayoría de lípidos, los extractos son, en ocasiones, sometidos a procesos de fraccionamiento que tienen como objetivo separar los analitos de interés de otros interferentes que pudieran dificultar o incluso imposibilitar la determinación. Esta etapa es imprescindible en la determinación de compuestos Dioxin-Like y se realiza mediante cromatografía líquida sobre diferentes fases estacionarias que retienen los DL-PCBs de manera diferencial al resto. En ocasiones esta fase estacionaria es añadida en la misma columna en la que se realiza la eliminación de los lípidos (Feltz et al. 1995, Concejero et al. 2001, Lundgren et al. 2002).

Las características físico-químicas de los PCBs y de los DDTs hacen posible su determinación por GC ya que son compuestos apolares, volátiles y térmicamente estables. La separación cromatográfica de los PCBs ha sido objeto de estudio intensivo, habiendo métodos de separación para todos los grupos de congéneres con diferentes fases estacionarias y programas de temperaturas (Frame 1997).

Considerando la etapa de determinación, aunque se pueden encontrar trabajos relativamente recientes realizados con detectores de captura de electrones (ECD), actualmente se ha impuesto la espectrometría de masas como sistema de detección, dadas sus características de universalidad, sensibilidad y selectividad. El pronto desarrollo del acoplamiento GC-MS ha posibilitado un gran desarrollo de métodos y aplicaciones aprovechando la mayoría de tipos de detectores de masas disponibles. Los espectrómetros de masas se pueden clasificar según el modo en que separan los iones generados en la fuente de ionización en función de su relación masa/carga (m/z), es decir, en función del analizador de masa que posean. Los diferentes analizadores de masa posibilitarán distintos modos de trabajo, básicamente masas (simple cuadrupolo y tiempo de vuelo) o masas en tándem (triple cuadrupolo, trampa iónica cuadrupolar) (Dass 2007; van Leeuwen and de Boer 2008).

Se pueden encontrar trabajos recientes de determinación de PCBs y DDTs con estos y otros detectores de masas, simple cuadrupolo (Blanes et al. 2009), triple cuadrupolo (Medina et al 2009), trampa iónica (Verenitch et al. 2007) y detectores de alta resolución (Malavia et al 2004). Cada uno de estos detectores aporta unas características diferentes que los hacen más o menos adecuados para según que objetivos (Santos y Galceran 2003). Es necesario un planteamiento previo del trabajo eligiendo, dentro de las posibilidades del laboratorio, el detector más adecuado a cada caso.

Las matrices analizadas en esta investigación son complejas y normalmente con un alto contenido en lípidos. El procedimiento aplicado es el siguiente, la muestra se tritura y se dispersa en sulfato sódico anhidro para llevar a cabo una extracción a reflujo con n-hexano. Después de filtrar y concentrar el extracto mediante un sistema Kuderna-Danish se opta por realizar una digestión ácida del extracto con ácido sulfúrico concentrado y después una cromatografía en fase normal en una columna de sílica o por realizar la cromatografía sin la digestión ácida del extracto, dependiendo de la cantidad de lípidos presentes en el extracto, o de que se busque determinar analitos lábiles en medio ácido.

El extracto así purificado puede ser determinado directamente por GC-MS, ya sea con detectores de simple cuadrupolo o por MS/MS en un sistema de GC ITMS con detector de trampa iónica.

En el caso concreto de la determinación de los Dioxin-Like PCBs se realizará, mediante la metodología desarrollada en la presente tesis, un fraccionamiento adicional en una columna de grafito que permite aislar los PCBs coplanares en una fracción aislada, previo a la determinación por GC ITMS.

1.2 ISÓTOPOS ESTABLES

1.2.1 USO DE LOS ISÓTOPOS ESTABLES PARA EL ESTUDIO DE RELACIONES TRÓFICAS

El análisis de isótopos estables es una herramienta con un gran potencial de aplicación en el estudio de relaciones tróficas, sobretodo en ecosistemas acuáticos. En general, se basa en la premisa de que el depredador contiene más isótopos pesados de N y C (^{15}N y ^{13}C , respectivamente) que sus presas.

La tecnología disponible permite a los investigadores determinar la abundancia natural de los isótopos estables y aplicar esta información a diferentes áreas. Particularmente, la determinación de las relaciones de los isótopos estables de carbono y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$) en organismos vivos, proporciona una herramienta muy potente para la caracterización de la red trófica y facilita asimismo información sobre las fuentes de carbono y nitrógeno que entran en el ecosistema (Michener y Schnell 1994; Smit 2001).

1.2.2 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE LOS ISÓTOPOS ESTABLES

Los isótopos estables de carbono y nitrógeno son habitualmente utilizados en la evaluación y estudio de las interacciones tróficas y, especialmente, en el caso de las redes tróficas acuáticas.

Se definen las relaciones entre los isótopos estables de carbono ^{12}C y ^{13}C y los de nitrógeno ^{14}N y ^{15}N :

$$\delta^{15}\text{N} = \left[\left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} \right) - 1 \right] * 10^3 \quad R = ^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$$

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} \right) - 1 \right] * 10^3 \quad R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$$

siendo “ δ ” una medida de relación entre los isótopos pesados y los ligeros. Los patrones que se utilizan como estándar de referencia son el VPDB (Viena PeeDee Belemnite cretácico) para el $\delta^{13}\text{C}$, y el nitrógeno atmosférico para el $\delta^{15}\text{N}$.

La determinación de relaciones de isótopos estables permite establecer relaciones tróficas, los resultados de $\delta^{15}\text{N}$ permiten ordenar en un esquema de relaciones tróficas presa-depredador a los organismos presentes en un ecosistema, ya que el incremento de la $\delta^{15}\text{N}$ es de un 3‰ por nivel trófico. Mientras que la $\delta^{13}\text{C}$, con un incremento por nivel trófico de 1‰, permite identificar el origen y flujo del carbono en el ecosistema.

Las aplicaciones son diversas: determinar la fuente de alimento, bentónica o pelágica, que utiliza una especie determinada (Sarà et al. 2002), diferenciar entre ejemplares salvajes y cultivados de salmón (Dempson y Power 2004) o subpoblaciones de una especie dada (Borell et al. 2006).

Una de las aplicaciones de los isótopos estables con más potencial en el campo de la investigación de la contaminación ambiental es correlacionar la información sobre la estructura trófica con la información de la presencia de contaminantes en los mismos organismos. Esta metodología ha permitido estudiar de una manera más clara y concluyente los procesos de biomagnificación de contaminantes organoclorados a lo largo de una cadena trófica marina (Hoekstra et al. 2003, Naito et al. 2003, Kidd et al. 2001).

1.3 LA ACUICULTURA MARINA

1.3.1 LA ACUICULTURA MARINA EN EL MUNDO

La acuicultura marina ha tenido un fuerte desarrollo en los últimos años como consecuencia del incremento del consumo de pescado por la población mundial y del descenso de la disponibilidad de stocks salvajes. En la actualidad la producción acuícola es de aproximadamente la mitad del total producido por la pesca extractiva a nivel mundial. China es el principal productor mundial de acuicultura, tanto en volumen de producción como en valor económico producido, ocupando España el 18º lugar respecto a la cantidad producida y el 28º respecto al valor económico generado, según datos de la FAO para el 2007 (FAO 2009).

A nivel mundial la primera especie en cantidad de producción es un alga, la laminaria japonesa (*Undaria pinnatifida*), seguida de un molusco, la ostra japonesa (*Crassostea gigas*), y del primer pez, la carpa plateada

(*Hypophthalmichthys molitrix*). Hay que llegar a los puestos 60° y 85° para encontrar dos de las especies cuya cría está más extendida en España, la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Considerando el valor económico de las especies cultivadas el orden es diferente, siendo las especies más relevantes el langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*), el salmón atlántico (*Salmo salar*) y la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*). En esta clasificación se encuentran en los puestos 31° y 47° las ya citadas dorada y lubina respectivamente, según datos de la FAO para el 2007 (FAO 2009).

1.3.2 LA ACUICULTURA MARINA EN LA UNIÓN EUROPEA

En la Unión Europea (UE) la producción acuícola desempeña un papel muy significativo en el desarrollo social y económico de muchas zonas costeras. España es el estado miembro de la UE con mayor producción en acuicultura, con 281266 Tm en 2007 (21,6% del total de la UE), seguida por Francia con 237653 Tm (18,2%) e Italia con 178992 Tm (13,7%). En relación con el valor de la producción acuícola, el Reino Unido es el principal estado miembro con 742 millones de euros (20,9% del total), seguido por Italia y Francia con 605 millones de euros (17%) cada uno. El valor de la producción en España fue de 307 millones de euros (8,6% del valor total) (Apromar 2009).

En Europa, los principales productos de la acuicultura son los pescados de alto valor comercial y los moluscos. La producción de peces supuso el 48,8% en volumen de producción y el 70,7% en valor de la producción total, mientras que los moluscos supusieron el 51,2 y el 29,6%, respectivamente. En la Tabla 1.6 se muestran las principales especies producidas en la UE mediante acuicultura según datos de la FAO para el 2007.

Tabla 1.6. Principales especies producidas mediante acuicultura en la Unión Europea en 2007, modificado de Apromar 2009.

Espece	Nombre científico	Toneladas
Mejillón mediterráneo	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	209923
Trucha arcoiris	<i>Onchorynchus mykiss</i>	205355
Mejillón común	<i>Mytilus edulis</i>	175880
Salmón atlántico	<i>Salmo salar</i>	141151
Ostra japonesa	<i>Crassostrea gigas</i>	122001
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	84593
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	66361
Almeja japonesa	<i>Ruditapes philippinarum</i>	63858
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i>	57893
Anguila	<i>Anguilla anguilla</i>	8209

La producción total de productos acuáticos (acuicultura + pesca) en la UE alcanzó un máximo en 1988 y desde entonces no ha parado de decrecer a un ritmo aproximado de un 2% anual. La producción acuícola aunque ha crecido no ha sido capaz de compensar la caída de la pesca extractiva. Por otro lado, puede considerarse que la producción acuícola en la UE lleva estancada desde el año 2000 y no está desarrollando todo su potencial para crear riqueza y empleo, esto a pesar de las favorables condiciones físicas y ambientales del entorno, la tecnología punta disponible y la presencia de capital inversor (Apromar 2009).

Estas y otras incertidumbres sobre el sector de la acuicultura en la UE se reflejan en la propuesta de la Comisión Europea titulada “Construir un futuro sostenible para la acuicultura: Nuevo impulso a la estrategia para el desarrollo

sostenible de la acuicultura europea” [COM(2009) 162 final] (EU 2009) que hace hincapié en varios aspectos:

- fomentar la competitividad de la producción acuícola en la UE mediante el desarrollo de un sector de la acuicultura competitivo y diversificado, sustentado por la innovación,
- sentar las bases para un crecimiento sostenible de la acuicultura garantizando un alto nivel de protección al medio natural,
- mejorar la imagen del sector y las condiciones de gestión.

1.3.3 LA ACUICULTURA MARINA EN EL MEDITERRÁNEO ESPAÑOL

La cría de peces en el Mediterráneo español se centra principalmente en dos especies: la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Tanto la dorada como la lubina que llegan al mercado español proceden aproximadamente en un 95% de producción acuícola, mientras el resto procede de pesca extractiva. En el año 2008 en la Comunidad Valenciana se produjo cerca del 40 y el 16%, respectivamente, del total producido de estas especies en el Estado español.

Un factor importante en la acuicultura de dorada y lubina es la producción y disponibilidad de alevines para su engorde. Es importante comentar el descenso que se ha producido en la producción de alevines de dorada en los años 2008-2009, quedando reducida a unos 30 millones de unidades, lo que significa un descenso acumulado del 60% de la producción y es sintomático de un mercado que desde septiembre de 2007 muestra una crisis de precios muy bajos en el pescado de talla comercial. La producción de alevines de lubina, mientras tanto ha

crecido en los últimos años alcanzando una producción de unos 30 millones de unidades (Apromar 2009).

No solo la producción de alevines es fundamental en el desarrollo de la actividad acuícola, la adecuada producción de piensos para las diferentes necesidades del ciclo de producción, desde la larva y alevinaje hasta el engorde final, es de vital importancia. En este sentido cabe destacar que si bien la producción de pienso de características óptimas para cada una de las etapas de crecimiento está resuelta, no lo está tanto la sostenibilidad de la actividad de producción de piensos, ya que la obtención de aceites y harinas de pescado, componentes insustituibles de los formulados y obtenidos en su mayoría de actividades extractivas, es hoy por hoy un asunto controvertido.

Por otro lado, la mejora continua de los índices de conversión (Kg de pescado producido/Kg de pienso utilizado), es motivo de investigación de nuevas técnicas de cría, así como del desarrollo de nuevos formulados con contenidos menores de harinas de pescado y que tienen parcialmente sustituidos los aceites de pescado por aceites vegetales, con una obtención más barata y de menor impacto ambiental.

Las reflexiones respecto a la obtención de piensos no se limitan a la economía o sostenibilidad ambiental en un plazo de tiempo más o menos largo, sino que también es fundamental controlar la calidad de las materias primas que son utilizadas. La presencia de contaminantes bioacumulables en el pienso provocaría la presencia de estos contaminantes en el pescado producido, por lo que es necesario un exhaustivo control en las materias primas utilizadas en la fabricación de piensos así como la trazabilidad de todo el proceso acuícola. Crisis como la llamada “Belga de las Dioxinas” (Dujardin et al. 2001) fue posiblemente

desencadenada por un problema de control sobre las materias primas utilizadas en la fabricación de pienso para pollos y otros animales de granja.

La presencia de organoclorados en peces procedentes de acuicultura ha sido y es un tema que genera gran preocupación. En ello se justifica la necesidad de establecer medidas de control en los piensos utilizados en acuicultura y en las materias primas utilizadas, intentando minimizar la cantidad de los contaminantes presentes: Reglamento N° 1881/2006 de la Comisión (EU 2006 b).

En este contexto y como respuesta a tantas incógnitas destaca el proyecto internacional AQUAMAX (www.aquamaxip.eu) que tiene cuatro objetivos fundamentales:

-Desarrollar nuevos piensos basados en alternativas sostenibles a la harina y aceite de pescado para producir pescado sano y mínimamente contaminado que sea muy nutritivo y aceptable para los consumidores.

-Evaluar los beneficios que para la salud humana tienen estos nuevos piensos, estudiando en detalle el caso de las mujeres embarazadas y los trastornos alérgicos.

-Evaluar la seguridad del pescado criado con los nuevos piensos analizando los efectos tóxicos directos de los contaminantes y el efecto modulador producido por los nutrientes beneficiosos en el pescado.

-Evaluar la percepción del consumidor sobre el pescado cultivado y sobre las nuevas dietas desarrolladas, comunicando de manera adecuada los riesgos y beneficios de consumir pescado cultivado.

Los primeros resultados de este proyecto muestran como las doradas criadas con piensos seleccionados y elaborados con poca carga contaminante exhiben en

consecuencia niveles menores de contaminantes en los tejidos (Nacher et al. 2009).

1.4 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES ORGANOCOLORADOS EN DORADAS SALVAJES Y CULTIVADAS DEL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL

En la presente Tesis Doctoral se pretende estudiar la presencia y la acumulación de compuestos organoclorados en dorada, tanto salvaje como procedente de la acuicultura, estudiando asimismo la presencia de OCs en las fuentes de alimento de ambas. En este sentido es conveniente conocer la especie estudiada (*Sparus aurata*) y los factores biológicos que pudieran ser relevantes para el estudio, así como el medio físico en el cual desarrollan su ciclo vital los ejemplares estudiados.

1.4.1 ZONA DE ESTUDIO

Es necesario comentar brevemente la estructura y circulación de las masas de agua, así como referir los mecanismos de producción primaria que tienen lugar en la zona donde se ha llevado a cabo el muestreo de los estudios presentados, ya que condicionan y ayudan a explicar parte de los resultados.

La cuenca mediterránea está localizada en una zona templada del hemisferio norte, en una banda de latitudes relativamente estrecha (30-45°N). Este factor implica un pequeño gradiente latitudinal y esencialmente un marcado ciclo estacional. En el Mediterráneo la evaporación supera a las precipitaciones y a los aportes de los ríos en alrededor de 1 m/año, por lo que esta considerada una cuenca de concentración (Sabates et al. 2007).

La mediterránea es una cuenca profunda. La plataforma continental acostumbra a ser estrecha y cubre menos del 20% del fondo marino. En la zona Noroccidental del mar Mediterráneo hay dos plataformas relativamente extensas, la del Golfo de León y la del Ebro, ubicada esta última alrededor de la desembocadura del río Ebro. Las zonas costeras del Mediterráneo Noroccidental están consideradas como oligotróficas. Las aguas superficiales solo reciben nutrientes mediante procesos de mezcla en vertical, ascenso local o descargas de aguas continentales.

Hay todo un conjunto de factores que determinan la productividad en el Mediterráneo Noroccidental y en su mayoría están controlados por el ciclo estacional. Las condiciones de la capa superficial del agua oscilan entre un periodo de mezcla completa a otro de marcada estratificación.

En primavera el balance de calor en superficie es positivo dado el aumento de radiación solar, entonces la termoclina empieza a desarrollarse. La temperatura de la superficie del mar es menor que la del aire y la evaporación es baja. A finales de la primavera la termoclina está casi desarrollada y durante el verano la zona de mezcla superficial aumenta en profundidad cuando las temperaturas superficiales comienzan a bajar al final de la estación.

Durante el otoño el balance de calor es negativo y el mar aporta calor a la atmósfera. Esta pérdida de calor es muy efectiva durante los procesos tormentosos. De esta forma la zona de mezcla superficial de agua va perdiendo calor por convección hacia la atmósfera. Este proceso sigue hasta que la termoclina está completamente deshecha; además, el viento consigue generar procesos de mezcla que pueden llegar hasta las capas próximas al fondo de la plataforma (Sabates et al. 2007). En ocasiones, se produce un ascenso de aguas profundas gracias al transporte de Ekman, mediante el cual el agua de superficie

se aleja de la costa por superficie facilitando la aproximación por el fondo y posterior ascenso de aguas profundas ricas en nutrientes.

Tabla 1.7. Resumen de los principales mecanismos de productividad en la zona de la plataforma del Ebro (Mediterráneo Noroccidental) (modificado de Palomera et al 2007).

INVIERNO	PRIMAVERA Y PRINCIPIOS DE VERANO
NOVIEMBRE A MARZO	MAYO A JULIO
Temperatura y salinidad homogéneas	Fuerte termoclina
	Posible aumento de caudal del río
Intensa mezcla vertical (>100m.). Nutrientes disponibles en la superficie de las zonas de plataforma	Mezcla limitada por la termoclina. Nutrientes agotados en superficie
	Formación en superficie de plumas del río. Algunos nutrientes disponibles en superficie en la influencia de las plumas del río
Máximo de clorofila en superficie sobre la plataforma continental	Máximo de clorofila en profundidad por debajo de la termoclina sobre el borde de la plataforma
	Máximo de clorofila en superficie solo en la zona de las plumas del río

La fuerte termoclina que se desarrolla en las aguas de la plataforma del Ebro determina una marcada estacionalidad en la disponibilidad de nutrientes. Las aguas superficiales de la plataforma del Ebro tienen un mecanismo mixto de fertilización, con unos aportes del río Ebro que oscilan entre el 10-25% del total aportado a la zona de plataforma. Este aporte se produce en las aguas superficiales y es especialmente relevante en la estación estratificada cuando el viento no puede mover el agua de profundidad de la plataforma para aportar más nutrientes (Salat et al. 2002). El resto de nutrientes en la columna de agua (90-75%) solo están disponibles en las aguas superficiales después de los procesos de mezcla inducidos por el viento que suelen soplar en el área en invierno. La Tabla 1.7

resume las características de los mecanismos de productividad primaria en las aguas de la plataforma del Ebro (Mediterráneo Noroccidental).

Los mecanismos de productividad primaria expuestos son relevantes ya que determinan el comienzo de disponibilidad de alimentos en los primeros niveles de la red trófica de la plataforma continental en la zona estudiada, condicionando el desarrollo de los demás niveles y aportando una explicación a la marcada estacionalidad de la disponibilidad de alimentos en la zona.

1.4.2 ESPECIE DE ESTUDIO

La dorada (*Sparus aurata* Linné, 1758) es un teleósteo perteneciente a la familia *Sparidae* y orden Perciformes conformado por 29 géneros y unas 100 especies. Es una especie muy común en el Mediterráneo, que se extiende también por el mar Negro, el mar Rojo y las costas orientales del Océano Atlántico, desde Inglaterra hasta las costas de Mauritania.

Se trata de una especie típicamente litoral, euriterma (5-32°C de temperatura) y eurihalina (4-70% de salinidad) que se puede encontrar hasta profundidades de 90 m. Los alevines y juveniles viven próximos a la costa, penetrando frecuentemente en las desembocaduras de ríos y lagunas litorales, sobre todo en primavera y verano, donde encuentran mejores condiciones para su alimentación. En otoño migran hacia mar abierto, en especial los individuos maduros para la reproducción. Se dispersan en zonas costeras, alcanzando fondos marinos comprendidos entre 25 y 50 m en busca de condiciones más estables y temperaturas menos extremas.

Su dieta natural es preferentemente carnívora, depredadora de especies de fondo, en especial moluscos (bivalvos y gasterópodos), crustáceos, vermes y pequeños peces, aunque también puede consumir algas y fanerógamas marinas,

mostrando así una clara flexibilidad trófica en función de las diferentes fuentes de alimento disponibles. Con un crecimiento muy variable en función de su localización, se puede considerar que crecen mucho más rápido en zonas semicerradas y salobres, que en zonas abiertas. En general se la considera una especie de crecimiento rápido en la naturaleza, que puede alcanzar los 300 g en el segundo año y los 600 g en el tercero, pudiendo alcanzar una talla de 700 mm y un peso de 5 Kg. Se captura principalmente en otoño cuando migra de las lagunas costeras hacia el mar.

La dorada es una especie hermafrodita proterándrica. En el mes de septiembre se inicia el desarrollo gonadal, que se prolonga a lo largo de los meses de octubre y noviembre, dependiendo de las condiciones ambientales. Sobre diciembre y enero tiene lugar la freza, que puede abarcar un periodo largo, ya que el desove de cada hembra se produce escalonadamente durante varias semanas; a partir de abril el único estado presente es el de reposo, permaneciendo así hasta el mes de septiembre siguiente. Esta especie efectúa la primera freza a los dos años de edad cuando el animal alcanza un tamaño de 250-300 g de peso total (unos 22 cm de longitud) como macho. Seguidamente se inicia la transformación en hembra. Durante los meses de máxima actividad reproductora (de septiembre a diciembre) el crecimiento se detiene, incluso se pueden producir pérdidas de peso.

La freza es bentónica (entre 5 y 35 m) y se produce cerca de la costa. En aguas del Mar Mediterráneo la época de puesta abarca desde finales de noviembre hasta finales de enero y en la Bahía de Cádiz hasta marzo. Es decir, cuando el fotoperíodo es corto y la temperatura desciende por debajo de los 19°C, interrumpiéndose por debajo de los 14°C. Cada hembra puede llegar a producir hasta un millón de huevos planctónicos por Kg de peso, de un diámetro de 0.8-1 mm. La larva recién eclosionada mide escasamente 1 mm y permanece pelágica durante 2 meses tras los cuales se produce la metamorfosis.

La presente investigación se ha estructurado en diferentes bloques o capítulos, resultado del diferente enfoque de cada parte.

En un primer bloque se exponen los resultados obtenidos del estudio de la presencia y variación estacional de organoclorados en los tejidos de doradas salvajes y cultivadas y la relación de estas variaciones con parámetros ambientales y del ciclo biológico, después se exponen los resultados del estudio concreto de la transferencia maternal de los compuestos organoclorados desde el hígado a los ovocitos durante el proceso de desarrollo gonadal.

En un segundo bloque se expone la metodología desarrollada para la determinación de isótopos estables de nitrógeno y carbono analizando las diferencias encontradas al respecto entre los diferentes tejidos de doradas salvajes y cultivadas, a continuación se aplica esta metodología y se correlaciona con la información sobre la presencia de organoclorados en las doradas salvajes y cultivadas y con sus fuentes de alimento, estudiando los procesos de biomagnificación asociados.

En el tercer y último bloque se expone la metodología analítica desarrollada para la determinación de Dioxin-Like PCBs mediante GC-MS/MS haciendo énfasis en los aspectos de purificación de los extractos y fraccionamiento de los diferentes grupos de PCBs en función del número de átomos de cloro en posición *orto*. La metodología desarrollada responde a la necesidad de determinar la presencia de estos compuestos en los productos de la acuicultura marina, como consecuencia de su potencial toxicidad para los consumidores. El método propuesto, basado en un analizador de trampa de iones, abre la posibilidad de analizar estos compuestos de manera más accesible que con los métodos anteriormente disponibles.

1.5 Referencias

- Abad E, Llerena JJ, Saulo J, Caixach J, Rivera J (2002) Study on PCDDs/PCDFs and co-PCBs content in food samples from Catalonia (Spain). *Chemosphere* 46:1435-1441
- Albaigés J (2005) Persistent Organic Pollutants in the Mediterranean Sea, In: Saliot A, (ed) *The Mediterranean Sea*. Springer, Berlin, p 90-149
- Apromar (2009) *La acuicultura marina de peces en España*. Asociación empresarial de productores de cultivos marinos. Cádiz, España (www.apromar.es).
- Blanes MA, Serrano R, Lopez FJ (2009) Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pollutants in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea and their relationship with environmental and biological factors. *Arch Environ Contam Toxicol* 57:133-144
- Bordajandi LR, Martin I, Abad E, Rivera J, Gonzalez, MJ. (2006) Organochlorine compounds (PCBs, PCDDs and PCDFs) in sea fish and seafood from the Spanish Atlantic Southwest Coast. *Chemosphere*; 64: 1450-1457.
- Borell A, Aguilar A, Tornero V, Sequeira M, Fernandez G, Alis S (2006) Organochlorine compounds and stable isotopes indicate bottlenose dolphin subpopulation structure around the Iberian Peninsula. *Environ Int* 32:516-523
- Borja J, Taleon DM, Auresenia J, Gallardo S (2005) Polychlorinated biphenyls and their degradation. Review. *Process Biochemistry* 40:1999-2013
- Concejero M, Ramos L, Jiménez B, Gómara B, Abad E, Rivera J, González MJ (2001) Suitability of several carbon sorbents for the fractionation of various sub-groups of toxic polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *J Chromatogr A* 917:227-237

-
- Dass C. (2007) Fundamentals of contemporary mass spectrometry. Chapter 4: Tandem mass spectrometry. Wiley interscience series on mass spectrometry.
- Dempson JB, Power M (2004) Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Ecol Freshw Fish* 13, 176-184.
- Domingo JL, Bocio A (2007) Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: A literature review. *Environ Int* 33:397-405
- Dujardin M, Narbonne JF, Alexander S (2001) The Belgian “dioxin” crisis. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 155-159
- Erickson MD (2001) PCB Properties, Uses, Occurrences, and Regulatory History. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p xi-xxx
- EU 1996 Council Directive 96/59/EC of 16 September 1996 on the disposal of polychlorinated biphenyls and polychlorinated terphenyls (PCB/PCT)
- EU 1999 Council Directive 1999/31/EC of 26 April 1999 on the landfill of waste
- EU 2001 COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL, THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE Community Strategy for Dioxins, Furans and Polychlorinated Biphenyls [COM(2001) 593 final]
- EU 2004 COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE COUNCIL, THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE on implementation of the Community Strategy for dioxins, furans and polychlorinated Biphenyls (COM(2001) 593) [COM(2004) 240 final]

- EU 2006(a) COMMISSION RECOMMENDATION (EC) No 794/2006 of 16 November 2006 on the monitoring of background levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs
- EU 2006(b) COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs
- EU 2009 COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL Building a sustainable future for aquaculture A new impetus for the Strategy for the Sustainable Development of European Aquaculture [COM(2009) 162 final]
- FAO (2009) The state of world fisheries and aquaculture (Sofia) 2008. FAO, Fisheries department. Rome.
- Feltz KP, Tillit DE, Gale RB, Peterman PH (1995) Automated HPLC fractionation of PCDDs and PCDFs and planar and nonplanar PCBs on C₁₈-Dispersed PX-21 carbon. *Environ Sci Technol* 29:709-718
- Fiedler H, Lau C (1998) Environmental fate of chlorinated organics. En: Schuurmann G, Markert B (eds) *Ecotoxicology, ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects*. p 317-370
- Frame GM (1997) A collaborative study of 209 PCB congeners and 6 aroclors on 20 different HRGC columns, retention and coelution database. *Fresenius J Anal Chem* 357:701-713
- Freels S, Chary LK, Turyk M, Piorkowski J, Mallin K, Dimos J, Anderson H, McCann K, Burse V, Persky V (2007) Congener profiles of occupational PCB exposure versus PCB exposure from fish consumption. *Chemosphere* 69:435-443
- Glynn AW, Atuma S, Aune M, Darnerud PO, Cnattingius S (2001) Polychlorinated biphenyl congeners as markers of toxic equivalents of polychlorinated biphenyls, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in breast milk. *Environ Research A* 86:217-228

-
- Gómez-Gutiérrez AI, Jover E, Bodineau L, Albaigés J, Bayona JM (2006) Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro River inputs. *Chemosphere* 65:224-236
- Guo YL, Hsu Ch-Ch (2001) Yucheng and Yusho: the effects of toxic oil in developing humans in asia. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 137-141
- Hoekstra PF, O'Hara TM, Fisk AT, Borga K, Solomon KR, Muir DCG (2003) Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort–Chukchi Sea. *Environ Pollut* 124:509–22.
- Holoubek I (2001) Polychlorinated biphenyl (PCB) Contaminated sites worldwide. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 17-26
- James MO (2001) Polychlorinated biphenyls: Metabolism and metabolites. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 35-46
- Kidd KA, Bootsma HA, Hesslein RH, Muir DCG, Hecky RE (2001) Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, east Africa: Importance of trophic level and carbon source. *Environ Sci Technol* 35:14-20
- Larsson C, Ellerichmann T, Huhnerfuss, Bergman A (2002) Chiral PCB methyl sulfones in rat tissues after exposure to technical PCBs. *Environ Sci Technol* 36:2833-2838
- Longnecker MP (2001) Endocrine and other human health effects of environmental and dietary exposure to Polychlorinated biphenyls (PCBs).

- En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 112-118
- Lundgren K, van Bavel B, Tysklind M. Development of a high-performance liquid chromatography carbon column based method for the fractionation of dioxin-like polychlorinated biphenyls. *J Chromatogr A* 2002; 962: 79
- Malavia J, Santos F J, Galceran M T (2004) Gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry versus GC-high-resolution mass spectrometry for the determination of non-ortho-polychlorinated biphenyls in fish. *J Chromatogr A* 1056: 171-178.
- Medina C, Pitarch E, Portoles T, Lopez FJ, Hernandez F (2009) GC-MS/MS multi-residue method for the determination of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human breast tissues. *J Sep Sci* 32:2090-2102
- Michener RH, Schell DM, (1994). Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha, K., Michener, R.H., (Eds). *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications. UK. pp138-157.
- Nácher J, Serrano R, Benedito L, Navarro JC, López FJ, Pérez J, (2009). Effects of fish oil replacement and re-feeding on the bioaccumulation of organochlorine compounds in gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) of market size. *Chemosphere* 76: 811-817
- Naito W, Jin J, Kang YS, Yamamuro M, Manasuga S, Nakanishi J (2003) Dynamics of PCDDs/DFs and coplanar-PCBs in an aquatic food chain of Tokyo Bay. *Chemosphere* 53:347-362.
- Palomera I, Olivar MP, Salat J, Sabates A, Coll M, Garcia A, Morales-Nin B (2007) Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: An ecological review. *Prog Oceanogr* 74:377-396

- Persky VW (2001) Health effects of occupational exposure to PCB. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 99-102
- Roberts T (1999) Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 2: Insecticides and Fungicides. RSC. (USA)
- Sabates A, Olivar M, Salat J, Palomera I, Alemany F (2007) Physical and biological processes controlling the distribution of fish larvae in the NW Mediterranean. Prog Oceanogr 74:355-376
- Safe S (2001) PCB as aryl hydrocarbon receptor agonists, implications for safe risk assessment. En: Robertson LW, Hansen LG (eds) PCBs Recent advances in environmental toxicology and health effects. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA). p 171-177
- Salat J, Garcia M, Cruzado A, Palanques A, Arin L, Gomis D, Guillen J, de Leon A, Puigdefabregas J, Sospedra J, Velásquez Z (2002) Seasonal changes of mass structure and shelf slope exchanges at the Ebro Shelf (NW Mediterranean). Cont shelf res 22:327-348
- Santos FJ, Galceran MT (2003) Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis. J Chromatogr A 1000:125-151
- Sara G, Vizzini S, Mazzola A (2002) The effect of temporal changes and environmental trophic condition on the isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of *Atherina boyery* (Risso 1810) and *Gobius niger* (L. 1758) in a Mediterranean coastal lagoon (Lake of Sabaudia): Implications for food web structure. Marine Ecology 23:1, 352-360
- Schuermann G (1998) Ecotoxic modes of action of chemical substances. En: Schuurmann G, Markert B (eds) Ecotoxicology, ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects. p 665-749

-
- Serrano R, Barreda M, Pitarch E, Hernandez F (2003) Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry *J Sep Sci* 26:75-86
- Smit AJ, (2001). Source identification in Marine Ecosystems. In: Unkovich, M., Pate, J., McNeill, A., Jane Gibbs, D., (Eds). *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 219-245.
- Stapleton HM, Letcher RJ, Baker JE (2001) Metabolism of PCBs by the deepwater sculpin (*Myoxocephalus thompsoni*). *Environ Sci Technol* 35:4747-4752
- UN 2002 Regionally based assessment of persistent toxic substances. Mediterranean Regional Report. UNEP. Switzerland. pp vii, 14-16, 65-67, 115, 119-121.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharma* 13:57-149
- Van Leeuwen SPJ and De Boer J. (2008) Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment. *J Chromatogr A*; 1186:161-182.
- Verenitch S, deBruyn A, Ikonomou M, Mazumder A (2007) Ion-trap tandem mass spectrometry-based analytical methodology for the determination of polychlorinated biphenyls in fish and shellfish, performance comparison against electron-capture detection and high-resolution mass spectrometry detection. *J Chromatogr A* 1142:199-208.
- Wright DA y Welbourn P (2002) *Environmental toxicology*. Cambridge University Press. p 349-407

Yao Y, Takasuga T, Masunaga S, Nakanishi J (2002) Detailed study on the levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in Yusho rice oil. *Chemosphere* 46:1461-1469.

CAPÍTULO 2:

VARIACIÓN ESTACIONAL Y DISTRIBUCIÓN ENTRE TEJIDOS DE CONTAMINANTES ORGANOCOLORADOS EN DORADA (*Sparus aurata*). RELACIÓN CON FACTORES AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS.

2.1 Introducción

2.2 Artículo científico 1

Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pollutants in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the Western Mediterranean Sea and their relationship with environmental and biological factors.

2.3 Artículo científico 2

Maternal transfer of organochlorine compounds to oocytes in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata).

2.4 Discusión de los resultados

2.5 Referencias

2.1 INTRODUCCIÓN

La presencia en el medio marino de contaminantes orgánicos persistentes (POPs), tales como: PCBs, OCs, PCDDs y PCDFs, entre otros, está perfectamente establecida, resultando el medio marino uno de los más afectados por la presencia de estos contaminantes. Albaiges (2005) ha revisado recientemente esta problemática en el caso Mediterráneo.

La presencia de compuestos organoclorados en el medio marino es de gran relevancia, ya que estos compuestos, como el resto de POPs, pueden generar problemas ambientales y ecotoxicológicos de diverso tipo teniendo incluso, como se expuso previamente, implicaciones que llegan hasta la salud humana dada la posible exposición de las personas a niveles relevantes de estos compuestos.

Así pues, determinar la presencia de contaminantes organoclorados como PCBs y OCs, en los diferentes compartimentos ambientales marinos, tanto bióticos como abióticos, continúa siendo de interés y la comparación de series temporales de datos obtenidas durante varios años, permite establecer si los niveles de PCBs y OCs aumentan, disminuyen o se mantienen constantes a lo largo del tiempo para un sistema u organismo dado.

De esta forma, Aguilar y Borell (2005) observan una reducción en la presencia de PCBs y DDTs en el periodo de 1987-2002, en tejido de delfín listado (*Stenella coeruleoalba*), un superdepredador de la cadena trófica marina mediterránea y buen indicador del estado de las aguas abiertas del Mediterráneo. Asimismo, estudios centrados en zonas costeras utilizando mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) muestran descensos en los niveles de PCBs y DDTs (Villeneuve et al. 1999). Pese a estas observaciones, la elevada presencia de POPs en los sedimentos marinos, sobre todo en algunas zonas costeras como han

indicado Gómez-Gutierrez et al. (2007), justifica el interés en el estudio a largo plazo de la presencia y variación de los niveles de POPs en el medio marino Mediterráneo.

Cuando se investiga la presencia de PCBs y DDTs en organismos, una vez conocidos los niveles presentes en la muestra es necesario correlacionar esta información con datos de carácter ambiental y climático, o lo que suele ser más relevante, con el ciclo biológico del organismo estudiado, para poder interpretar la relevancia concreta de esos niveles de contaminantes.

El estudio de los diferentes tejidos de un organismo facilita información sobre la distribución de los contaminantes. En la actualidad, está ampliamente aceptada la observación de que la abundancia de PCBs y DDTs en un tejido dado, está en primer lugar relacionada con el porcentaje de lípidos existente en el tejido u órgano considerado, de esta forma la cantidad de PCBs y DDTs encontrada suele aumentar entre los respectivos tejidos de un organismo, conforme aumenta la cantidad de lípidos. Aunque también se han descrito relaciones entre la polaridad de los lípidos presentes en los diferentes tejidos y la abundancia relativa de POPs, según la cual a mayor polaridad de los lípidos menor abundancia de POPs, ya que estos interaccionan más favorablemente con los triglicéridos que con el colesterol o los fosfolípidos (Ishaq et al. 2000).

En este sentido es necesario conocer en profundidad el organismo, los tejidos y el tipo de lípidos presentes en los mismos, para plantear que tejidos van a ser analizados y según que proceso de tratamiento de la muestra. Se deben definir los tejidos de interés, y la periodicidad del muestreo se planificará a partir del conocimiento del ciclo biológico del organismo investigado.

Para poder interpretar las posibles relaciones entre POPs y lípidos es necesario, en primer lugar, determinar la variación de la cantidad de lípidos

presentes en el tejido a lo largo del tiempo, esta información se suele correlacionar con el ciclo biológico del organismo. Del análisis de las muestras de tejidos se obtienen los niveles de organoclorados presentes y estos datos suelen aportar más información cuando los niveles de organoclorados encontrados se normalizan sobre la cantidad de lípidos presentes en el tejido y se correlacionan con la información biológica disponible.

En el caso de los teleósteos, más allá de la relación primaria entre abundancia de lípidos y mayores niveles de OCs, se pueden observar fenómenos secundarios como la dilución de niveles de OCs cuando la acumulación de lípidos en los tejidos es más rápida que el incremento de OCs, fenómeno observado en las épocas con alta tasa de alimentación (Fu and Wu 2006) o procesos de eliminación de OCs a través de las superficies respiratorias o por excreción fecal, ambos claramente influenciados por la temperatura del agua (Paterson et al. 2007).

Asimismo, se ha sugerido que el posible transporte de los OCs a través de los diferentes tejidos del organismo está desacoplado de la transferencia de lípidos entre los mismos, a lo largo del ciclo biológico anual del organismo, ya que la concentración de los OCs expresada en base lipídica es diferente en los tejidos estudiados (Svendsen et al. 2007).

Especial relevancia tiene el fenómeno de la transferencia maternal, definido en este caso como el transporte de los OCs entre los diferentes tejidos y las gónadas, ya que niveles altos de OCs en los ovocitos podrían ser perjudiciales para el normal desarrollo de las larvas, dada la especial vulnerabilidad de los primeros estadios del desarrollo a los OCs (Stouthart et al. 1998).

De esta forma, los trabajos aquí presentados surgen del interés en determinar los niveles de PCBs y DDTs en dorada (*Sparus aurata*) y se planifican desde la necesidad de conocer los factores que provocan variaciones en los niveles observados de los contaminantes estudiados, tanto en el caso de ejemplares salvajes como de cultivados.

En concreto, el objetivo del artículo “*Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pollutants in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the Western Mediterranean Sea and their relationship with environmental and biological factors*” es establecer las variaciones estacionales de los niveles de PCBs y DDTs en los diferentes tejidos estudiados de doradas salvajes y cultivadas, así como intentar relacionar estas variaciones con factores ambientales y del ciclo biológico de la dorada.

En el caso del artículo “*Maternal transfer of organochlorine compounds to oocytes in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata)*” el objetivo es investigar la transferencia hacia las gónadas de PCBs y DDTs durante la fase reproductiva de las doradas, salvajes y cultivadas, así como intentar establecer los mecanismos que controlan este proceso de transferencia.

2.2 ARTÍCULO 1: *Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pollutants in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the Western Mediterranean Sea and their relationship with environmental and biological factors.*

M.A. Blanes, R. Serrano, F. J. López

Archives of environmental contamination and toxicology (2009) 57:133-144

Arch Environ Contam Toxicol (2009) 57:133–144
DOI 10.1007/s00244-008-9221-7

Seasonal Trends and Tissue Distribution of Organochlorine Pollutants in Wild and Farmed Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean Sea and Their Relationship with Environmental and Biological Factors

M. A. Blanes · R. Serrano · F. J. López

Received: 11 June 2008 / Accepted: 11 August 2008 / Published online: 9 September 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) samples from the Western Mediterranean were investigated. Hexane extracts of white and red muscle, liver, and gills from wild and cultured specimens were purified by normal-phase high-performance liquid chromatography, and selected OCPs and PCBs were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry as indicators of contamination. The limits of detection for the analytical methodology allowed was 0.25 ng/g. Data obtained showed the presence of DDTs and PCBs in the different tissues, with the highest concentration of pollutants being in tissues of higher lipid content. Concentrations of organochlorine compounds in sea bream tissues strongly correlated with seasonal changes and the biological cycle of the species. In general, cultured fish had lower concentrations of contaminants and smaller season variability than wild fish. Trace levels of contaminants were found in fish muscle throughout the year, but always below the guidelines recommended for human consumption.

Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) are ubiquitous environmental organochlorine pollutants (OCs) and are dangerous due to their toxicity and stability with long biological half-lives and high lipid solubility. Both are classified as persistent organic pollutants

(POPs) and are present in the contamination pattern of marine environments worldwide (Hernández et al. 2000; Pandit et al. 2001; UNEP 2003; Yang et al. 2007). The physical-chemical properties of each PCB congener are dependent of the degree of chlorination and the toxicological effects are mainly dependent on the positions occupied by the chlorine atoms (Erickson 2001). The marine environment is one of the media most affected by organochlorines and in the Mediterranean, particularly the coastal marshes. Therefore, inhabiting species are exposed to the possible effects of OCs. Under current conditions, these effects appear to be related to chronic toxicity (Albaiges 2005).

The Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is typically a littoral fish species and normally lives in the marine environment of the continental shelf in the Western Mediterranean Sea and feeds on zoo-benthos close to the shore, mainly bivalves, echinoderms, and crustaceans. The gilthead sea bream is part of the Mediterranean diet and it is the focus of aquaculture in this area.

In the Western Mediterranean, water temperature, salinity, and nutrient concentration in the continental shelf areas are strongly influenced by seasonality (Sabates et al. 2007; Salat et al. 2002). These are the most relevant factors affecting primary production and the biological cycle of the resident species.

Concentrations of PCBs and OCPs frequently show annual variation in different matrixes such as freshwater (Gómez-Gutiérrez et al. 2006), estuarine sediments (Fu and Wu, 2006), and diverse biota. Levels of pollutants in different fish tissues also show variations during the year (Bignert et al. 2007; Greenfield et al. 2005; Svendsen et al. 2007). The analysis of fish tissues for temporal and intratissue variation can provide useful information to characterize the human health risk from dietary intake of organochlorines. Previous studies have shown substantially

M. A. Blanes · R. Serrano (✉) · F. J. López
Research Institute for Pesticides and Water (IUPA), Avda Sos
Baynat, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain
e-mail: serrano@qf.uji.es
URL: www.iupa.uji.es

Abstract

Seasonal trends and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCP) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) samples from the Western Mediterranean were investigated. Hexane extracts of white and red muscle, liver, and gills from wild and cultured specimens were purified by normal phase HPLC, and selected OCP and PCBs were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry as indicators of contamination. The limits of detection for the analytical methodology allowed was 0.25 ng/g. Data obtained showed the presence of DDTs and PCBs in the different tissues, with the highest concentration of pollutants being in tissues of higher lipid content. Concentrations of organochlorine compounds in sea bream tissues strongly correlated with seasonal changes and the biological cycle of the specie. In general, cultured fish had lower concentration of contaminants and smaller season variability than wild fish. Trace levels of contaminants were found in fish muscle throughout the year, but always below the guidelines recommended for human consumption.

Key words: organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, *Sparus aurata*, seasonal trends, tissue distribution, Western Mediterranean Sea.

Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCP) are ubiquitous environmental organochlorine pollutants (OCs) and are dangerous due to their toxicity and stability with long biological half lives and high lipid solubility. Both are classified as Persistent Organic Pollutants (POPs) and are present in the contamination pattern of marine environments worldwide (Hernández et al. 2000; Pandit et al. 2001; Yang et al. 2007, UNEP 2003). The

physical-chemical properties of each PCB congener are dependent of the degree of chlorination and the toxicological effects are mainly dependant on the positions occupied by the chlorine atoms (Erickson 2001). The marine environment is one of the media most affected by organochlorines, and in the Mediterranean, particularly the coastal marshes. Therefore inhabiting species are exposed to the possible effects of OC's. Under current conditions, these effects appear to be related to chronic toxicity (Albaiges 2005).

The Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata*) is typically littoral fish specie and normally lives in the marine environment of the continental shelf in the Western Mediterranean Sea. Feed on zoo-benthos close to the shore, mainly bivalves, echinoderms and crustaceans. Gilthead sea bream itself is part of the Mediterranean diet and it is the focus of aquaculture in this area.

In the Western Mediterranean, water temperature, salinity, and nutrient concentration in the continental shelf areas are strongly influenced by seasonality (Salat et al. 2002, Sabates et al. 2007). These are the most relevant factors effecting primary production and the biological cycle of the resident species.

Concentrations of PCBs and OCPs frequently show annual variation in different matrix such as freshwater (Gómez-Gutiérrez et al. 2006), estuarine sediments (Fu and Wu, 2006) and diverse biota. Levels of pollutants in different fish tissues also show variations during the year (Greenfield et al. 2005; Svendsen et al. 2007; Bignert et al. 2007). The analysis of fish tissues for temporal and intra-tissue variation can provide useful information to characterize human health risk from dietary intake of organochlorines. Previous studies have shown substantially lower concentrations of trace organics in fish when the fillet was analysed alone (Davis et al. 2002). This finding, along with taking into account

seasonal variation in organochlorine pollutants levels, provides valuable information for the evaluation of human health risks (Greenfield et al. 2005).

The marine food web is an effective moving belt for the OC as it involves a wide range of trophic levels which leads to high bioaccumulation and biomagnification along the food chain (Harding et al. 1997; Borga et al. 2001, Kidd et al. 2001; Serrano et al. 2003a; Hoekstra et al. 2003; Serrano et al. 2008 a). As the human population is at the top of the food chain that arises from fisheries and from aquaculture activities, it is a possible route of OC accumulation in human beings. In fact, dietary intake, especially of marine organisms, is the most significant source of OC's for humans (Johansen et al. 1996; Bjerregaard et al. 2001) and as a consequence, OC's have frequently been detected in human tissues and fluids (Johansen et al. 1996; Czaja et al. 1997; Hernández et al. 2002 a, b; Pitarch et al. 2003; Cruz et al. 2003; De Felip et al. 2004; De Saeger et al. 2005; Whitcomb et al. 2005).

In previous studies OCs have been detected in fish feed used in aquaculture and in the cultured fish (Santerre et al, 2000; Easton et al, 2002; Serrano et al, 2003 b; Hites et al, 2004, Antunes and Gil 2004, Maule et al., 2007; Serrano et al. 2008 c). Specifically, DDTs and PCBs have been reported in fish feed used for fish production on the Spanish Mediterranean Coast at concentrations in the $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ range (Serrano et al. 2003 a, 2008 a; Nacher-Mestre et al. unpublished data). Differences between the levels of pollutants in wild and farmed fish have also been pointed out by several authors (Antunes et al., 2004; Serrano et al, 2008 c). These differences have been attributed to the level of contaminants present in the diet and to different feeding characteristics related to intensive culture.

In this article, seasonal variations in levels of PCBs and OCPs in target tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean

were investigated. Liver, white and red muscle, and gills from fish collected during 2004 were analysed using gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) after automated purification of sample extracts by normal phase liquid chromatography (NPLC). As well, lipid content in the tissues studied was measured to determine any relationship with PCBs and OC levels found in tissues in the different seasons.

Material and Methods

Samples

Samples of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) were obtained from populations located off the Castellon Coast (Spanish Mediterranean Coast, around longitude 0°, latitude 40° N) by trawl catch and from sea cage farms located in the same area (Figure 1). They were purchased from local commercial markets, dissected, the target tissues separated, and stored at -20°C until analysis.

Because the fish that were analyzed may have escaped from farms, or were wild fish feeding on residues from farms, additional checks, besides commercial identification, were carried out. Morphology and lipid tissue content were used to confirm the fish origin. Samples of wild and cultured fish were obtained in January, March, May, October, and December of 2004. Weight and length of wild fish sampled were 641±117 g and 34±2 cm, respectively and for cultured fish 646±68 g and 33±2 cm. During summer it was not possible to collect fish samples due to a voluntary fishing prohibition in the area, imposed for biological reasons.

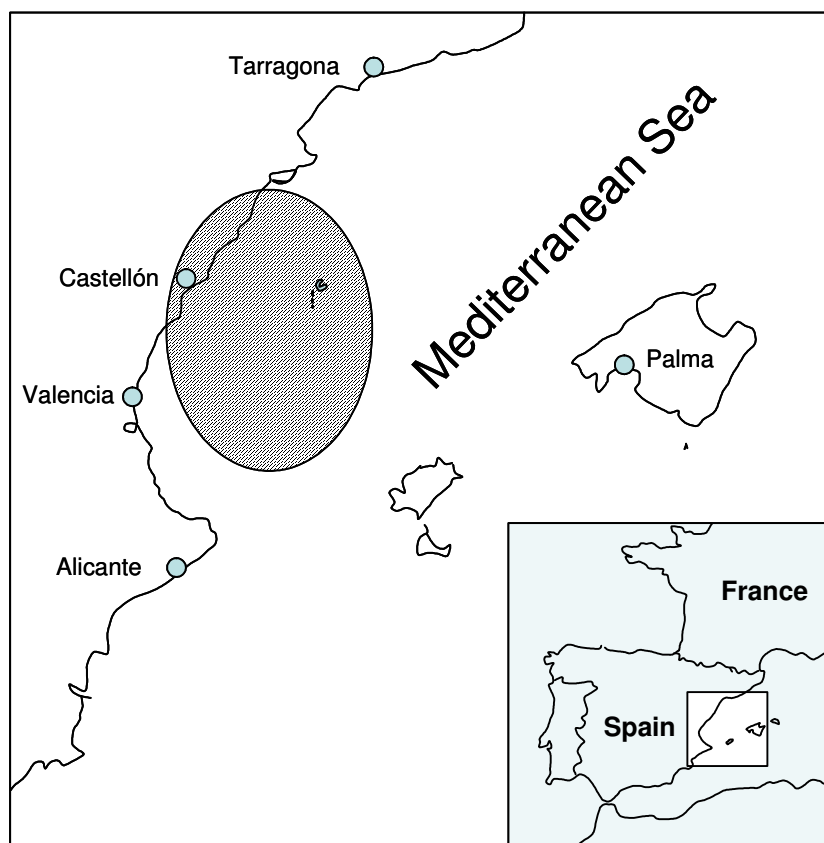


Figure 1. Area of sampling.

Homogeneous composite samples, in triplicate, of each fish tissue (white and red muscle, liver and gills) were prepared from three individual female specimens. Dissected tissues were pooled to obtain homogenous, composite samples. These composite samples were analysed in quintuplicate for each tissue and for each sampling time, both in the case of wild and cultured gilthead sea bream.

Chemicals

DDTs (p,p'-DDT, p,p'-DDE, and p,p'-DDD), HCB, heptachlor, lindane, mirex, metoxychlor, endosulfan (α and β isomers), endosulfan sulphate, endosulfan ether, and PCBs (IUPAC n° 28, 31, 52, 77, 101, 105, 118, 126, 128,

138, 153, 156, 169, 170 and 180) were included in this study. Reference materials of pesticides and metabolites were purchased from Dr Ehrenstorfer (Promochem, Wesel, Germany) with purity 97-99.7%. PCB Mix 20 standard from Dr Ehrenstorfer ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in isooctane) was used for the single quantification of PCBs congeners indicated above. The internal standard 4,4'-DDE D_8 were purchased from Dr Ehrenstorfer ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in acetone) and used as surrogate. Ethyl acetate and n-hexane, ultra-trace quality, were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulphate for pesticide residue analysis (Scharlab, Barcelona, Spain) was dried for 18 hours at 300°C before use.

Analytical methodology

Organochlorine compounds, including pesticides and derivatives, and polychlorinated biphenyls, were analyzed in fish tissues (white and red muscle, liver and gills) following the method described by Serrano et al. (2003b).

Extraction and pre-concentration: Samples were thawed at room temperature. Approximately 8 g of fish tissues were chopped and homogenized in a mortar with the amount of anhydrous sodium sulphate necessary to remove water. Extraction was carried out by refluxing in n-hexane during 4 hours. After filtration ($0.45 \mu\text{m}$), the extracts were pre-concentrated using a Kuderna-Danish apparatus until less than 5 mL remained, avoiding dryness, and the final residue was adjusted to 2 mL under N_2 stream at 40°C with n-hexane.

Clean up: The clean up of fish tissues was performed injecting 1 mL of the hexane extract (4 g sample per mL hexane) into a LC system using a silica gel HPLC column (Serrano et al. 2003b). The LC system used was composed of a LC Pump Master 305 piston pump, Gilson (Middleton, USA), with a column 150 x

3.9 mm i.d. packed with 4 μm silica Novapack (Waters, Mildford, MA, USA). The mobile phase (n-hexane) was set at a flow rate of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The modifier solvent (4 mL ethyl acetate) was introduced into the column at 16 min of elution. Analytes eluted as follows: DDTs, PCBs, mirex, heptachlor, α -endosulfan, HCB and lindane between 0-12 minutes (Fraction A), and β -endosulfan, endosulfan sulphate, endosulfan ether, metoxychlor between 12-18 minutes (Fraction B). The silica gel column was regenerated by a 4 mL ethyl acetate flush step at 20 minutes. The volume of each HPLC fraction collected was adjusted to 1 mL under N_2 stream at 40°C.

GC/MS analysis: Analysis of the fat-free LC fractions was performed by gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS) using a HP 5890 Gas Chromatograph Series II and a quadrupole mass spectrometer HP 5971 Mass Selective Detector, operating in the electron impact ionization mode (EI). The chromatograph was equipped with an autosampler HP 7673. The oven temperature was programmed as follows: 90°C (4 min), 30°C·min⁻¹ to 180°C, 4°C·min⁻¹ to 270°C, 30°C·min⁻¹ to 300°C with a final hold for 3.5 min. Splitless injections (3 mm i.d. glass liner) of 2 μL were performed using a fused silica DB-5MS capillary column coated with cross-linked 5% phenyl methyl siloxane with a length of 30 m x 0.25 mm i.d. and a film thickness of 0.25 μm . Helium was applied as the carrier gas at a flow of 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The injector temperature was 240°C. Detector temperature was 280 °C and the voltage of ion source was 70 eV. Experimental mass spectrometer conditions are listed in Table 1. Extracted ions selected from EI-MS spectra for the quantitative determination and confirmatory purposes are indicated.

Table 1. Experimental conditions of the MS methods used for the determination of PCBs and OCs

Compound	Window group (min)	Rt ^a (min)	Quantification ion	Qualifier ions
Run 1				
HCB	8.50–14.00	8.89	284	249,142
Lindane	8.50–14.00	9.59	219	181,183
Endosulfan ether	8.50–14.00	10.67	241	277,204
Heptachlor	8.50–14.00	11.55	272	274,237
α -Endosulfan	14.00–17.20	14.80	237	207,195
<i>p,p'</i> -DDE	14.00–17.20	15.50	246	318,176
<i>p,p'</i> -DDE-D ₈	14.00–17.20	15.50	254	326
β -Endosulfan	17.20–21.00	17.79	237	207,195
<i>p,p'</i> -DDD	17.20–21.00	18.24	235	237,165
Endosulfan sulfate	17.20–21.00	19.53	272	239,229
<i>p,p'</i> -DDT	17.20–21.00	19.68	235	237,165
Metoxychlor	21.00–30.00	22.10	227	228,207
Mirex	21.00–30.00	23.50	272	274,237
Run 2				
PCB 28	9.00–10.50	10.58	256	186
PCB 31	9.00–10.50	10.58	256	186
PCB 52	10.50–15.85	11.62	292	220,222
PCB 101	10.50–15.85	14.61	326	254,256
<i>p,p'</i> -DDE-D ₈	10.50–15.85	15.50	254	326
PCB 77	10.50–15.85	16.00	292	220,222
PCB 118	15.85–19.90	16.98	326	254,256
PCB 153	15.85–19.90	17.86	360	288,290
PCB 105	15.85–19.90	18.02	326	254,256
PCB 138	15.85–19.90	18.95	360	288,290
PCB 126	15.85–19.90	19.32	326	254,256
PCB 128	15.85–19.90	20.05	360	288,290
PCB 156	19.90–30.00	21.02	360	288,290
PCB 180	19.90–30.00	21.69	396	326,324
PCB 169	19.90–30.00	22.56	360	288,290
PCB 170	19.90–30.00	22.89	396	326,324

The isotopic labelled compound *p,p'*-DDE-D₈ is used as surrogate internal standard

^a Rt: retention time (minutes).

Quantification was performed by external calibration in solvent using 4,4'-DDE D₈ as internal standard. The method was linear from 0.5 to 1000 ng mL⁻¹ with limits of detection (LOD) in samples of 0.25 ng·g⁻¹ fresh weight (0.5 ng·g⁻¹ in the case of endosulfan ether). The limit of quantification (LOQ) was considered as three times the LOD.

Determination of the fat: The total fat content in the sample extracts was determined gravimetrically, evaporating at 95°C until constant weight.

Data analysis: Tissue OC concentrations are expressed on a fresh weight basis (ng·g⁻¹ fresh weight) and on a lipid weight basis (ng·g⁻¹ lipid weight). All of data were transformed to Log₁₀ before statistical analysis to achieve normality.

Data on OCs in each fish tissue during the year and the percentage of lipid content of different tissues were compared by means of ANOVA I and “*a posteriori*” Scheffé’s test (P<0.05). Homoscedasticity of variances was tested by means of Barlett’s test (P<0.05). Linear correlation between lipid content in tissues and total PCBs and DDTs were analysed. All the statistical tests were conducted using STATGRAPHICS plus for Windows version 4.1 (Statistical Graphics Corporation).

Results and Discussion

Environmental factors, lipid level variability and biological cycle

The lipid percentage in different wild gilthead sea bream tissues showed the same marked seasonal variation and profile in all cases (Table 2). The highest lipid levels are found in autumn (Scheffé’s test, p<0.05) before gonad development and the lowest (Scheffé’s test, p<0.05) in spring, after spawning.

The autumn maximum comes after the high summer temperatures, with the associated high food intake and in the earlier stage of gonad development. At this time the lipids are mobilized to gonad development and lipid levels start to decline in red and white muscle and liver (Table 2).

In natural conditions, gilthead sea bream live in waters with temperature ranges from 11°C in winter to 23 °C in late-summer without any apparent problems related to these changes (Gallardo et al. 2003). Temperatures registered during this study varied between 12°C (winter) and 23-24°C (summer-autumn) (Figure 2).

The sea temperature therefore has an important influence on the feeding behaviour of gilthead sea bream, resulting in a reduced feeding rate when temperatures are low; Ibarz et al. (2005) described that gilthead sea bream stop feeding below 12-13 C°. When temperatures rise after the coldest months, food abundance is at its highest as a result of increased primary production after the different winter water-mixing dynamics (Palomera et al. 2007). As a consequence of the rising temperatures and increased food abundance, the food intake of wild gilthead sea bream increases. This period coincides with the generation of fat depots in muscles and liver in preparation for gonad development, as female fish require large quantities of nutrients for transfer to the developing oocytes during maturation (Almansa et al. 2001). The main factor controlling gonad development is photoperiodic. In the sampling area (40° N latitude) there is a maximum of 15 hours of daylight by the end of June and a minimum of 9.3 hours as December ends (Figure 2). Wild gilthead sea bream gonad development begins during September, initiated by the drop in daylight hours (Kissil et al. 2001) and finishes in winter with spawning, which starts around late December to early January in the Western Mediterranean.

Table 2. Percentage of lipids in tissues of gilthead sea

% lipids <i>n</i> = 5	White muscle			Red muscle			Liver			Gills		
	Mean	Std. dev	Group	Mean	Std. dev	Group	Mean	Std. dev	Group	Mean	Std. dev	Group
Wild gilthead sea bream												
Jan	0.021	0.008	A	0.25	0.051	A	1.66	0.364	A	3.22	0.324	A
Mar	0.012	0.004	B	0.09	0.035	B	1.92	0.327	AB	1.13	0.342	B
May	0.013	0.001	B	0.04	0.009	C	1.94	0.257	AB	0.26	0.062	C
Oct	0.535	0.058	C	3.97	0.361	D	4.68	1.900	B	9.83	1.619	D
Dec	0.101	0.027	D	1.48	0.203	E	1.43	0.229	A	8.78	2.377	D
Cultured gilthead sea bream												
Jan	1.82	0.18	A	14.40	0.37	AB	18.41	1.39	A	13.04	2.01	A
Mar	1.53	0.23	A	13.64	1.94	AB	10.29	1.42	B	14.50	1.80	A
May	2.56	0.22	B	20.10	1.02	C	26.33	1.70	C	16.01	1.67	AB
Oct	3.28	0.48	B	15.94	1.53	B	24.25	1.80	C	19.45	1.87	B
Dec	2.78	0.32	B	13.13	1.49	A	15.49	0.91	A	15.73	2.59	AB

Note: Group: Scheffe's test ($p < 0.05$)

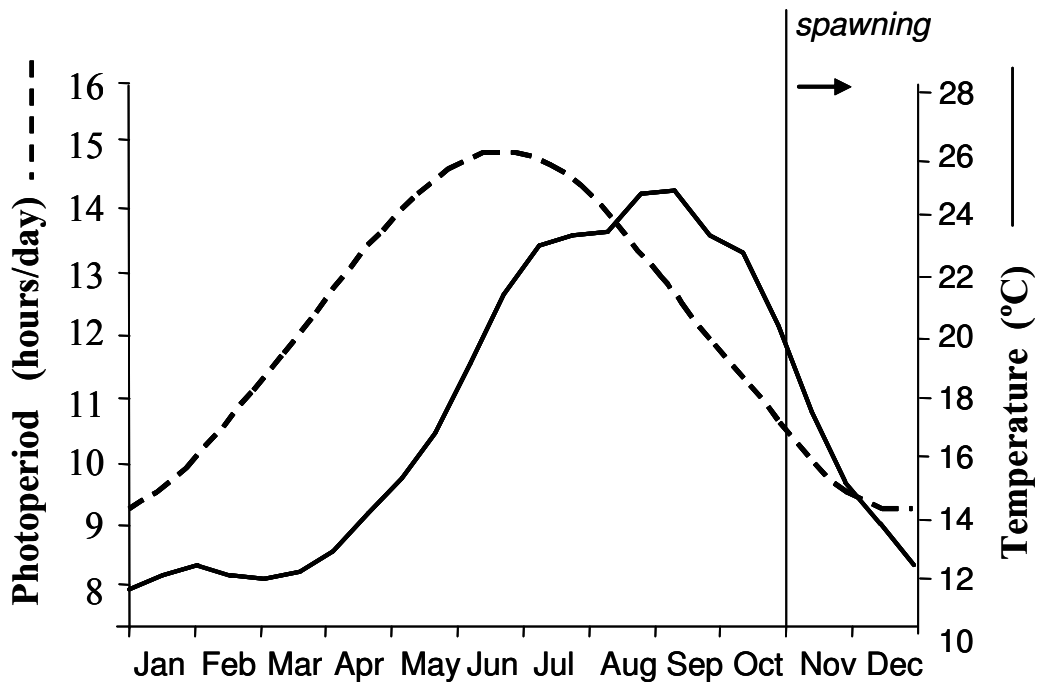


Figure 2. Photoperiod and water temperature during the study year.

As can be expected, seasonal variations in lipid levels are strongly correlated with environmental conditions in the study area (Figure 2). These results are in agreement with other studies at similar latitudes (Grigorakis et al. 2002), and present characteristics which differentiate them from cold water fish (i.e. salmon) which have a more constant profile throughout the year. This fact could be an important aspect to consider when studying differences in pollutants accumulation between aquaculture in cold and temperate waters as temperate fish should present a period of depuration when food intake decreases during winter.

In all cases cultured fish tissues show significantly higher lipid levels (t-Student, $p < 0.05$) than wild fish tissues (Table 2) and the profile of seasonal

variation of lipid levels in tissues was different from that of the wild fish. While wild specimens present the highest values in October, after high feeding activity as a consequence of high summer temperatures and food abundance, cultured fish show a softer profile during the year (Table 2). The higher levels of lipids found in the farmed specimens of gilthead sea bream would be a consequence of the exposure to artificial conditions. In sea cages feed is supplied continuously throughout the year, “*ad libitum*”, without seasonal changes regardless of the fact that the feeding behaviour of gilthead sea bream decreases in winter due to low temperatures with an associated decrease in lipid percentages of tissues (Table 2). That this phenomenon occurs is further supported by the sudden increase of lipid percentages in all tissues of cultured gilthead sea bream in May (Table 2) when sea temperatures rise and farming conditions allow the availability of abundant food, in contrast to the poor feeding possibilities for wild gilthead sea bream in spring.

Lipid metabolism affects the uptake of hydrophobic organic compounds and their storage in fish tissues. Therefore the variable characteristics of temperate environments and associated parameters could be important factors affecting levels of non-polar organic contaminants in tissues of Mediterranean fish.

Organochlorine pollutants in wild gilthead sea bream tissues

The contaminant profile found in wild gilthead sea bream tissues was similar to the pollutant patterns found in studies of similar marine ecosystems (Deudero et al. 2007). Results obtained show the presence at measurable concentrations of p,p'DDE, p,p'DDD and 6 PCBs congeners (PCB IUPAC nº 101, 118, 138, 153, 170, 180). The highest concentrations corresponded to p,p'DDE, the main metabolite of p,p'DDT, and PCB 153, one of the more recalcitrant PCB congener.

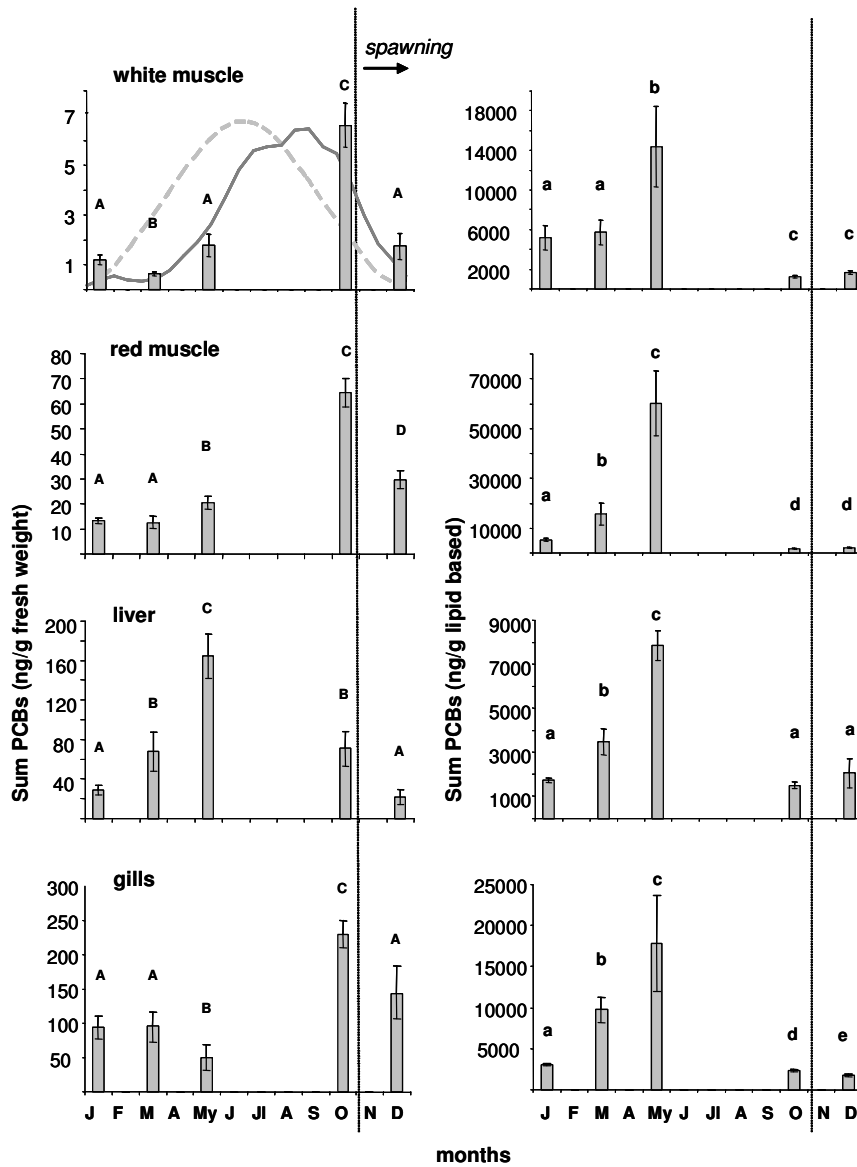
In relation to contaminant levels in the different tissues, the fact that liver and gills showed higher PCBs and DDTs concentrations than red and white muscle appears to be connected with the concentration of fat, with increasing contaminant levels in tissues with higher lipid content (Figures 3, 4). This positive correlation between lipid content and load of lipophilic pollutants in tissues has been described by Garcia et al. 2000 and Monosson et al. 2003.

Differences in tissue pollutant levels are important when attempting to minimize the human health risk associated with ingestion of organochlorine. Organochlorine pollutants levels are the lowest in the carcass or fillet, the part usually consumed by humans, compared to other tissues such as the liver. This fact has been evaluated by other authors (Davis et al. 2002).

The PCBs levels in muscle and gills tissues, expressed in fresh weight (Figure 3) were found to be highest in October when the lipids levels are also at a maximum, while for liver, PCBs levels are highest in May (Figure 3), (Scheffe's test, $p < 0.05$). DDTs and metabolites showed similar tendencies to PCBs in all tissues (Scheffe's test, $p < 0.05$) (Figure 4).

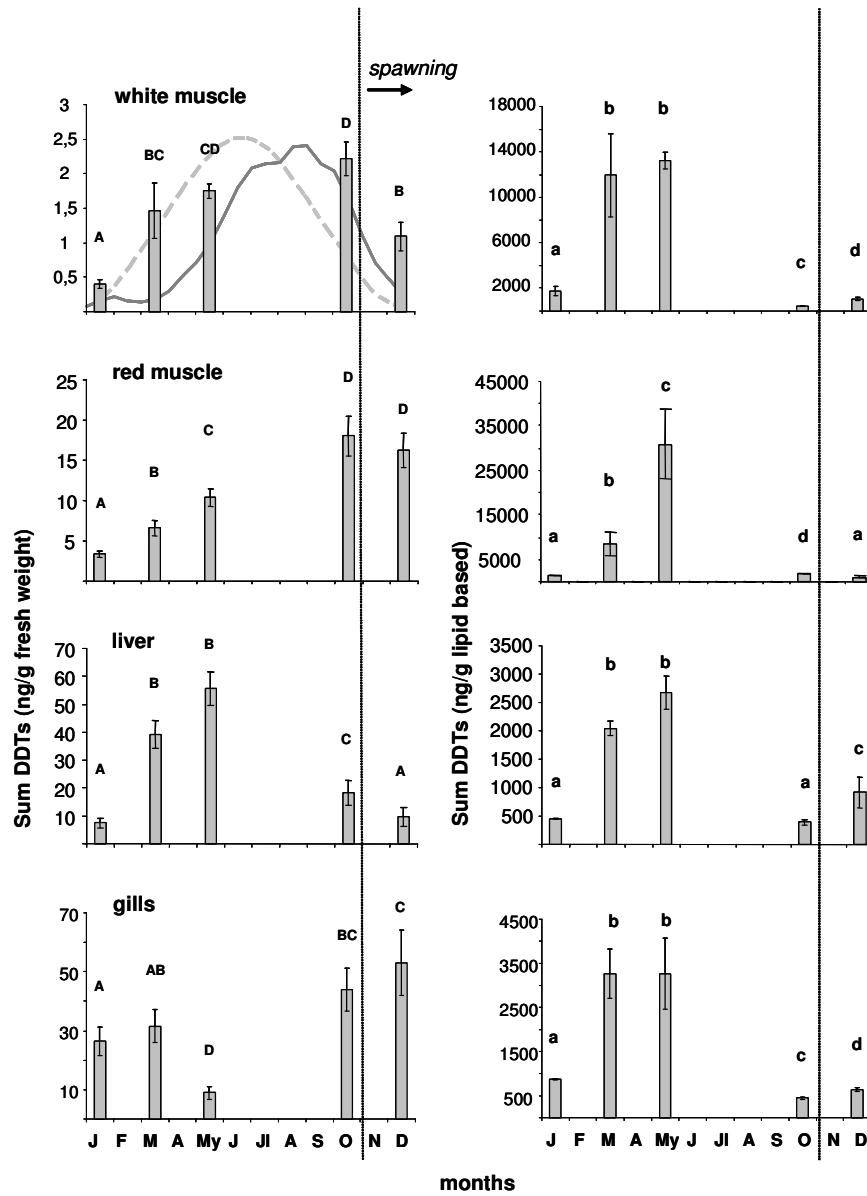
Figure 5 shows the correlation between lipid percentage and total amount of PCBs and DDTs. A linear trend was found in red and white muscle, and gills for PCBs, whereas liver did not show this correlation. For DDTs, there were no cases where there was significant correlation with lipid content.

These results should show that the transfer process of PCBs in fish tissues is partially coupled to the lipid mobilization between the tissues during the biological cycle.



Letters: Differences between months (Scheffe's test, $p < 0.05$)

Figure 3. Mean concentrations expressed on a fresh weight and lipid basis for total PCBs in different tissues of wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during the sampling year. Environmental factors are put on top of the white muscle graphic for comparison.



Letters: Differences between months (Scheffe's test, $p < 0.05$)

Figure 4. Mean concentrations expressed on a fresh weight and lipid basis for total DDTs in different tissues of wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during the sampling year. Environmental factors are put on top of the white muscle graphic for comparison.

The fact that liver did not show correlation between contaminant and lipid content could be explained by the seasonal variation of the hepatosomatic index (HSI), in sea bream. Chaoui et al. (2006) reported that the highest value of HSI is in autumn before spawning and this decreases until spring. In this way, size and weight changes of the liver could introduce a factor that decreases PCBs concentration in this tissue by way of a growth dilution. After spawning when liver reduces in weight and reaches the lowest HSI value, there appears to be a tendency for PCBs concentrations to increase. No correlation for DDTs could be explained because DDTs have one precursor (DDT) that could transform to two derivatives making it difficult to find any relationship with other factors.

Lipid based OC concentrations show a more seasonally related profile than they do when using wet weight data (Figures 3, 4). When the possible influence of lipid abundance is corrected all tissues show a similar seasonal profile of total load of PCBs and DDTs with the highest level for all tissues is in May ($p < 0.05$).

The profile of pollutant loading during the year can be related to the biological cycle. In winter, after spawning, the gilthead sea bream has spent most of its lipid reservoirs on oogenesis, and food intake has decreased due to low temperatures (Ibarz et al. 2005). As well prey abundance is at its lowest in the area at this time and further lipid reduction occurs due to energy needs of the gilthead sea bream. Nevertheless, organochlorine pollutants show higher values when expressed as a lipid based concentration (Figures 3, 4). This phenomenon could be explained by rates of elimination of organochlorines by excretion, mobilization or metabolism, are lower than the rate utilization of lipids. This explains the increase in concentration of organochlorine pollutants in tissues when they are expressed on a lipid basis and is consistent with other observations (Paterson et al. 2007; Svendsen et al. 2007).

In contrast, in the second half of the year (May, October and December) this tendency is reversed and the total levels of PCBs and DDTs decreased (Figures 3,4). As mentioned above, in summer and autumn, the abundance of prey and the higher water temperatures result in higher feeding rates. While this contributes to increased lipid levels in gilthead sea bream tissues, this lipid enrichment rate might be faster than the accumulation rate of organochlorine and this could result in the dilution of PCBs and DDTs concentrations. Fu and Wu (2006) have made this observation in a previous study. Mechanisms of chemical elimination have been described in fish, including faecal egestion, loss across respiratory surfaces and metabolic transformation. These mechanisms are linked to temperature (Paterson et al. 2007) and the elimination rates of organochlorines pollutants are increased with the high water temperatures of summer and autumn which could also explain the lower concentrations.

Additional elimination of PCBs and DDTs could be caused by loss due to maternal depuration. This route of elimination of OCs has been described in some species of marine mammals (Wolkers et al. 2004), fish (Monosson et al. 2003) and humans (Bordajandi et al. 2008). Serrano et al. (2008b) studied the transfer of organochlorine pollutants from liver to oocytes in gilthead sea bream, pointing out an effective way of OCs depuration for *Sparus aurata*.

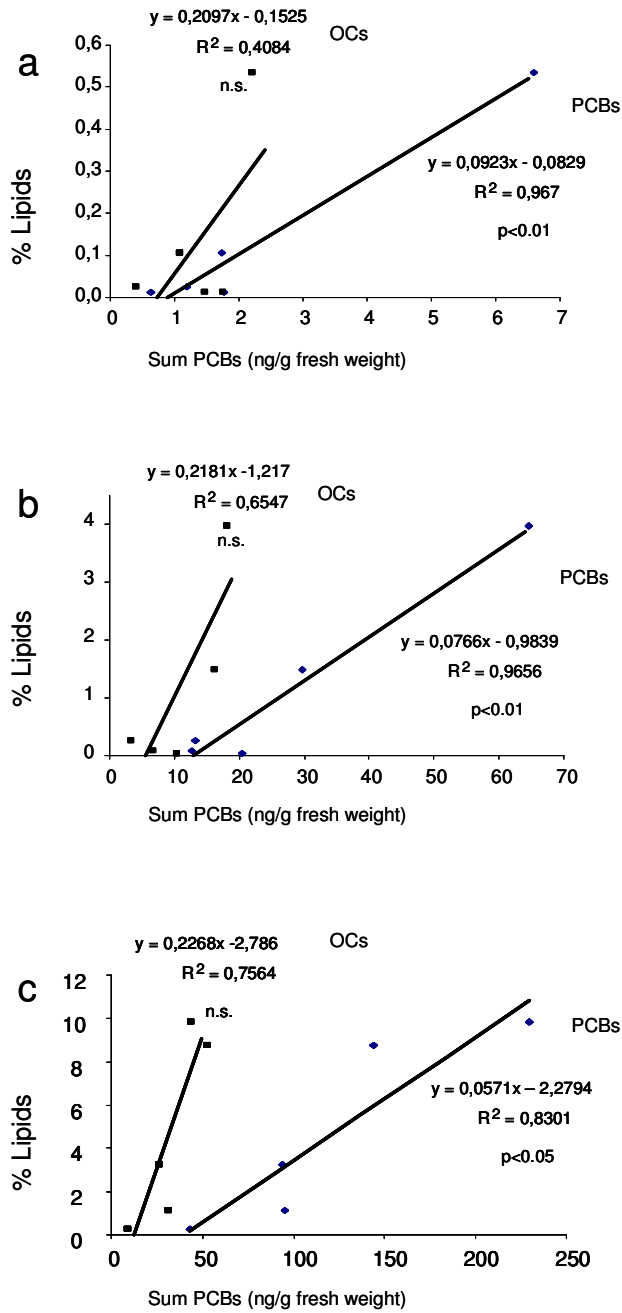
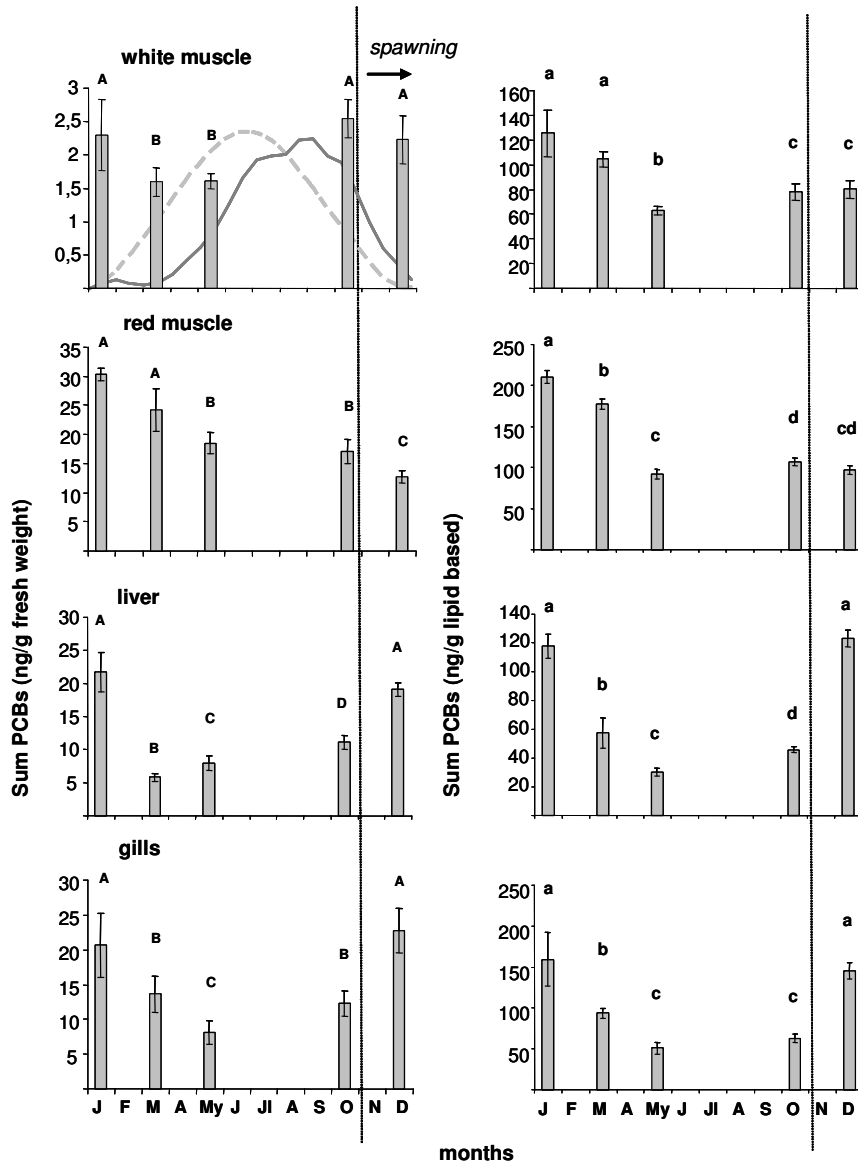


Figure 5. Linear correlation between lipid percentage and total (fresh weight) PCBs and DDTs in white muscle (a), red muscle (b) and gills (c) of wild gilthead sea bream.

Organochlorine pollutants in cultured gilthead sea bream tissues

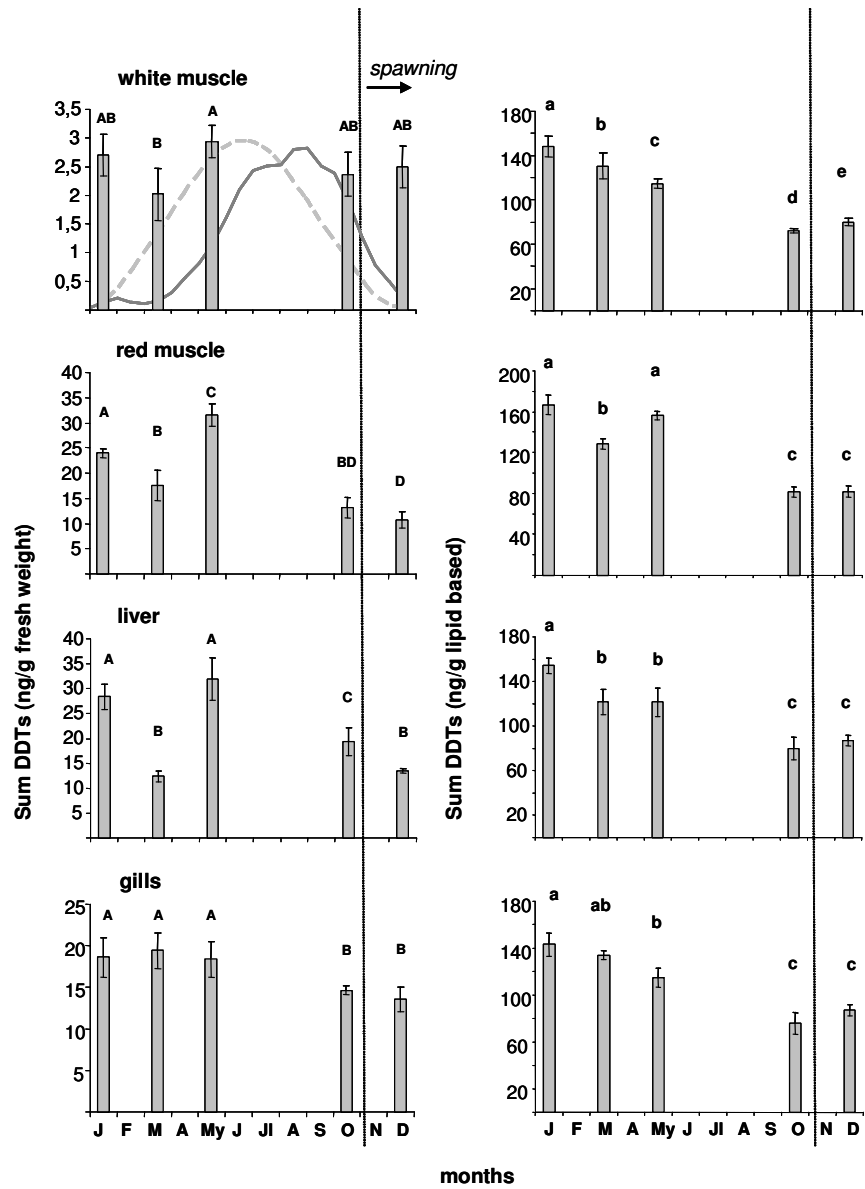
The analysis of tissues from cultured gilthead sea bream showed the same contamination pattern found in wild fish. The ubiquity of PCBs and DDTs explains this fact as diet is the principal source of organochlorine compounds. But the feed for the farmed fish is manufactured from fish caught in the North Atlantic or the oceans off South America and, as a result, the concentration of organochlorine pollutants were generally lower than that found in wild specimens on both a wet weight and lipid weight basis (Figures 3, 4, 6 and 7). The fact that wild fish generally present higher levels of contaminants than cultured fish has been previously observed in sea bream from the Western Mediterranean (Serrano et al. 2008 a, Serrano et al. 2008 c). Although current feed sources allow fish with lower organochlorine compounds than wild stock to be produced, bioaccumulation factors are higher in the sea aquaculture food chain (Nacher-Mestre et al. unpublished data), and any increase in the pollutant content of fish derivatives used for feed manufacture could pose a risk for human consumers. For this reason monitoring programmes for OC levels in aquaculture products are recommended.

The seasonal profile of PCBs, in fresh weight, did not show any clear tendencies (Figure 6). Red and white muscle show a reasonably stable seasonal profile without any strong variation (Scheffe's test, $p < 0.05$). This shows agreement with the lipid content profile in tissues during the year. Liver shows a marked drop in PCBs in March which correlates with the minimum liver lipid percentage at the same time. Contrary to this, variations in the levels of PCBs in gills did not seem related to the mostly stable seasonal lipid percentage profile in this tissue (Table 2).



Letters: Differences between months (Scheffe's test, $p < 0.05$)

Figure 6. Mean concentrations expressed on a fresh weight and lipid basis for total PCBs in different tissues of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during the sampling year. Environmental factors are put on top of the white muscle graphic for comparison.



Letters: Differences between months (Scheffe's test, $p < 0.05$)

Figure 7. Mean concentrations expressed on a fresh weight and lipid basis for total DDTs in different tissues of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during the sampling year. Environmental factors are put on top of the white muscle graphic for comparison.

Figure 7 shows the total load of DDTs and metabolites during the year in the tissues studied. The seasonal profiles for DDTs in fresh weight present slighter variability than the PCBs ones and no tendencies are observed. During the last years the use of DDTs had not been reported near the study area, as it is expected. Moreover, DDTs is the sum of a precursor and two derivatives. These could be explain the almost constant profile detected along the year.

When total PCBs and DDTs results are expressed on a lipid basis (ng/g) to correct for the possible influence of amount of lipid, there was little change in the seasonal profile for all tissues. This low seasonal variation would be produced by the conditions of sea cage culture, since the constant, ready availability of food for the cultured fish minimizes the natural seasonal trends of gilthead sea bream. With feeding constant, the main factor that may affect fish development in confined culture is when the temperature drop to levels that the fish stop feeding and, at worst, develop “winter syndrome” (Ibarz et al. 2007).

Levels of organochlorine pollutants show minor seasonal variations but a general trend is observed for the months of October and December. When total DDTs are expressed in lipid weight, a clear tendency of decreasing levels in all tissues is observed (Figure 7). This fact is also observed in red and white muscle for total PCBs but not for liver and gills (Figure 6). A similar decrease was described in wild gilthead sea bream and the same explanation, that it is due to the higher water temperatures of late summer and autumn providing maximum feeding rates with associated growth rate, may apply. Mechanisms of chemical elimination and their link to temperatures have been described in fish (Paterson et al. 2007) and mentioned above, with the elimination rates of organochlorines pollutants being at a maximum with the higher water temperatures of late summer and autumn.

Conclusions

Levels of organochlorine pollutants presented variations amongst different tissues and seasons. These differences can be linked to the reproductive and feeding cycles of the fish. Cultured gilthead sea bream showed reduced seasonal variation in the concentration of organochlorine pollutants compared to wild specimens as a consequence of culture conditions which minimize natural changes. Organochlorine pollutants levels were generally found to be higher in wild fish than in cultured sea bream from the Western Mediterranean Sea. All samples analyzed in this study showed detectable levels of organochlorine pollutants but these were below the recommended levels for human consumption (UE 2006).

Acknowledgements.

M.A. Blanes is very grateful to the Generalitat Valenciana for his junior research contract.

References

- Albaigés J (2005) Persistent Organic Pollutants in the Mediterranean Sea, In: Saliot A, (ed) The Mediterranean Sea. Springer, Berlin, p 90-149
- Almansa E, Martin MV, Cejas JR, Badia P, Jerez S, Lorenzo A (2001) Lipid and fatty acid composition of female gilthead sea bream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *J Fish Biol* 59:267-286
- Antunes P, Gil O (2004) PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria Aveiro, Portugal. *Chemosphere* 54: 1503-1507.
- Bignert A, Nyberg E, Sundqvist KL, Wiberg K (2007) Spatial variation in concentrations and patterns of the PCDD/F and dioxin-like-PCB content in herring from the northern Baltic Sea. *J Environ Monitor* 9:550-556
- Bjerregard P, Dewailly E, Ayotte P, Parrs T, Ferron L, Mulvad GJ (2001) Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet. *J Toxicol Env Heal A*. 2001:69-81.
- Bordajandi LR, Abad E, Gonzalez MJ (2008) Occurrence of PCBs, PCDD/Fs, PBDEs and DDTs in Spanish breast milk: Enantiomeric fraction of chiral PCBs. *Chemosphere* 70:567-575
- Borga K, Gabrielsen GW, Skaare JU (2001) Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environ Pollut* 113:187-198
- Chaoui L, Kara MH, Faure E, Quignard JP (2006) Growth and reproduction of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Sci Mar* 70:545-552
- Cruz S, Lino C, Silveira MI (2003) Evaluation of organochlorine pesticide residues in human serum from an urban and two rural populations in Portugal. *The Sci Total Environ* 317:23-35

- Czaja K, Ludwicki JK, Goralzyk K, Strucinski P (1997) Organochlorine pesticides, HCB, and PCBs in human milk in Poland. *B Environ Contam Tox* 58:769-775
- Davis JA, May MD, Greenfield BK, Fairey R, Roberts C, Ichikawa G, Stoelting MS, Becker JS, Tjeerdema RS (2002) Contaminant concentrations in sport fish from San Francisco Bay, 1997. *Mar Pollut Bull* 44:1117-1129
- De Felip E, di Domenico A, Miniero R, Silvestroni L (2004) Polychlorobiphenyls and other organochlorine compounds in human follicular fluid. *Chemosphere* 54:1445-1449
- De Saeger S, Sergeant H, Piette M, Bruneel N, Van de Voorde W, Van Peteghem C. (2005) Monitoring of polychlorinated biphenyls in Belgian human adipose tissue samples. *Chemosphere* 58: 953-960.
- Deudero S, Box A, March D, Valencia JM, Grau AM, Tintore J, Calvo M, Caixac J (2007) Organic compounds temporal trends in some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean. *Chemosphere* 68:1650-1659
- Easton MDL, Luszniak D, Von der Geest E (2002) Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed. *Chemosphere* 46: 1053-1074.
- Erickson MD (2001) PCB Properties, Uses, Occurrences, and Regulatory History, In: Robertson LW, Hansen LG (eds) *PCBs Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. The University Press of Kentucky. Kentucky (USA).p xi-xxx
- Fu CT, Wu SC (2006) Seasonal variation of the distribution of PCBs in sediments and biota in a PCB-contaminated estuary. *Chemosphere* 62:1786-1794
- Gallardo MA, Sala-Rabanal M, Ibarz A, Padros F, Blasco J, Fernandez-Borras J, Sanchez J (2003) Functional alterations associated with "winter syndrome" in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 223:15-27

- García LM, Porte C, Albaiges J (2000) Organochlorinated pollutants and xenobiotic metabolizing enzymes in W. Mediterranean mesopelagic fish. *Mar Pollut Bull* 40:764-768
- Gómez-Gutiérrez AI, Jover E, Bodineau L, Albaigés J, Bayona JM (2006) Organic contaminant loads into the Western Mediterranean Sea: Estimate of Ebro River inputs. *Chemosphere* 65:224-236
- Greenfield BK, Davis JA, Fairey R, Roberts C, Crane D, Ichikawa G (2005) Seasonal, interannual, and long-term variation in sport fish contamination, San Francisco Bay. *The Sci Total Environ* 336:25-43
- Grigorakis K, Alexis MN, Taylor KDA, Hole M (2002) Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *Int J Food Sci Tech* 37:477-484
- Harding GC, LeBlanc RJ, Vass WP, Addison RF, Hargrave BT, Pearre Jr S, Dupuis A, Brodie PF (1997) Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the marine pelagic food web, based on a seasonal study in the southern Gulf of St Lawrence, 1976-1977. *Mar Chem* 56:145-179.
- Hernández F, Serrano R, Roig-Navarro F, Martínez-Bravo Y, López FJ (2000) Persistent organochlorines and organophosphorus compounds and heavy elements in common whale (*Balaenoptera physalus*) from the western Mediterranean sea. *Mar Pollut Bull* 40:426-433.
- Hernández F, Pitarch E, Serrano R, Gaspar JV, Olea N (2002a). Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis. *J Anal Toxicol* 26:94-103
- Hernández F, Pitarch E, Serrano R, Guerrero C (2002b). Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 55:715-722

- Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ (2004) Global Assessment of Organic Contaminants in Farmed Salmon. *Science* 303: 226-229.
- Hoekstra PF, O'Hara TM, Fisk AT, Borga K, Solomon KR, Muir DCG (2003) Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environ Pollut* 124:509-522
- Ibarz A, Blasco J, Beltran M, Gallardo MA, Sanchez J, Sala R, Fernandez-Borras J (2005) Cold-induced alterations on proximate composition and fatty acid profiles of several tissues in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249:477-486
- Ibarz A, Beltran M, Fernandez-Borras J, Gallardo MA, Sanchez J, Blasco J, (2007) Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture* 262:470-480
- Johansen HR, Alexander J, Rossland OJ, Planting S, Lovik M, Gaarder PI, Gdynia W, Bjerve KS, Becher G (1996) PCDDs, PCDFs and PCBs in human blood in relation to consumption of crabs from a contaminated fjord area in Norway. *Environ Health Persp* 104:756-764
- Kidd KA, Bootsma HA, Hesslein RH, Muir DCG, Hecky RE (2001) Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, east Africa: Importance of trophic level and carbon source. *Environ Sci Technol* 35:14-20
- Kissil GW, Lupatsch I, Elizur A, Zohar Y (2001) Long photoperiod delayed spawning and increased somatic growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 200:363-379
- Maule AG, Gannam AL, Davis JW (2007) Chemical contaminants in fish feeds used in federal salmonid hatcheries in the USA. *Chemosphere* 67:1308-1315

- Monosson E, Ashley JTF, McElroy AE, Woltering D, Elskus AA (2003) PCB congener distributions in muscle, liver and gonad of *Fundulus heteroclitus* from the lower Hudson River Estuary and Newark Bay. *Chemosphere* 52:777-787
- Palomera I, Olivar MP, Salat J, Sabates A, Coll M, Garcia A, Morales-Nin B (2007) Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: An ecological review. *Prog Oceanogr* 74:377-396
- Pandit GG, Mohan Rao AM, Jha SK, Krishnamoorthy TM, Kale SP, Raghu K, Murthy NBK, (2001) Monitoring of organochlorine pesticide residues in the Indian marine environment. *Chemosphere* 44:301-305
- Paterson G, Drouillard KG, Haffner GD (2007) PCB Elimination by yellow perch (*Perca flavescens*) during an annual temperature cycle. *Environ Sci Technol* 41:824-829
- Pitarch E, Serrano R, López FJ, Hernández F (2003) Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 376:189-197
- Sabates A, Olivar M, Salat J, Palomera I, Alemany F (2007) Physical and biological processes controlling the distribution of fish larvae in the NW Mediterranean. *Prog Oceanogr* 74:355-376
- Salat J, Garcia M, Cruzado A, Palanques A, Arin L, Gomis D, Guillen J, de Leon A, Puigdefabregas J, Sospedra J, Velásquez Z (2002) Seasonal changes of mass structure and shelf slope exchanges at the Ebro Shelf (NW Mediterranean). *Cont shelf res* 22:327-348
- Santerre CR, Ingram R, Lewis G.W, Davis JT, Lane LG, Grodner RM, Wei C.-I, Bush PB, Xu DH, Shelton J, Alley EG, Hinshaw JM (2000) Organochlorines, organophosphates and pyrethroids in channel catfish,

rainbow trout, and red swamp crayfish from aquaculture facilities. *Food Chem Toxicol* 65: 231-235.

Serrano R, Simal-Julián A, Pitarch E, Hernández F, Varó I, Navarro JC (2003a) Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Environ Sci Technol* 37:3375-3381

Serrano R, Barreda M, Pitarch E, Hernández F (2003b) Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 26: 75-86

Serrano R, Blanes MA, Lopez FJ (2008a) Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and stable isotope characterization of the trophic chain. *Sci total environ* 389:340-349

Serrano R, Blanes MA, Lopez FJ (2008b) Maternal transfer of organochlorine compounds to oocytes in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chemosphere* 70:561-566

Serrano R, Barreda M, Blanes MA (2008c) Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean Sea, *Mar Pollut Bull* 56:963-972

Svendsen TC, Vorkamp K, Frederiksen M, Rønsholdt B, Frier J-O (2007) Body burdens of persistent halogenated compounds during different development stages of anadromous brown trout (*Salmo trutta*). *Environ Sci Technol* 41:5980-5985

UE (2006) Regulation (CE) N° 1881/2006 European Commission

UNEP (2003) Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Global Report, UNEP, Switzerland. 81-91 pp.

- Withcomb BW, Schisterman EF, Buck GM, Weiner JM, Greigerstein H, Kostiniak PJ (2005) Relative concentrations of organochlorines in adipose tissue and serum among reproductive age women. *Environ Toxicol Pharmacol* 19: 203-213
- Wolkers H, Lydersen Ch, Kovacs KM, (2004) Accumulation and lactational transfer of PCBs and pesticides in harbour seals (*Phoca vitulina*) from Svalbard, Norway. *Sci Total Environ* 319:137-146
- Yang R, Yao T, Xu B, Jiang G, Xin X (2007) Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau. *Environ Int* 33:151-156.

2.3 ARTÍCULO 2: *Maternal transfer of organochlorine compounds to oocytes in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata).*

Roque Serrano, Miguel A. Blanes, Francisco J. López

Chemosphere 70 (2008) 561-566

Author's personal copy

Available online at www.sciencedirect.com

Chemosphere 70 (2008) 561–566

CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphere

Maternal transfer of organochlorine compounds to oocytes in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

Roque Serrano ^{*}, Miguel A. Blanes, Francisco J. López*Research Institute for Pesticides and Water (IUPA), Avda Vicent Sos Baynat, s/n. University Jaume I, 12071 Castellón, Spain*

Received 9 May 2007; received in revised form 10 July 2007; accepted 13 July 2007

Available online 27 August 2007

Abstract

To investigate the transfer of lipophilic organochlorine compounds to the gonads in gilthead sea bream females, liver and oocytes from wild and farmed females, just before spawning, were analysed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry after clean-up of the fatty extracts by normal phase HPLC. This analytical methodology allowed us to achieve limits of detection of around 0.1 ng/g.

Data obtained show that the chemicals studied are transferred from the liver to oocytes in ratios up to 0.51. In general this means that less than a half of pollutant load is transferred from liver to oocytes. A significant correlation ($p < 0.05$) between $\log K_{ow}$ and ratios (oocytes/liver) was found. Compounds with larger $\log K_{ow}$ present lower lipid-based concentration ratios (oocytes/liver). We have inferred that the reason the fugacity model is not accomplished is specifically dependent on the vitellogenesis process, which involves the transfer of lipids from the liver to oocytes in teleostei. No significant differences (t-Student) have been found between wild and farmed females transfer ratios (oocytes/liver).

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Maternal transfer; Organochlorine compounds; Gilthead sea bream; Wild fish; Farmed fish

1. Introduction

Persistent organic pollutants (POPs) are synthetic chemicals, mainly pesticides and industrial products that have been shown to be toxic to wildlife (Varó et al., 2002; Kaushik and Kaushik, 2007). In spite of prohibitions and restrictions, POPs such as organochlorine compounds (OCs) has already spread worldwide from tropical latitudes to the Arctic and Antarctica (Hernández et al., 2000; Pandit et al., 2001; Hoekstra et al., 2003; Bocquené and Franco, 2005; Yang et al., 2007). From such widespread use concern arises regarding these compounds that is related to their potential to bioaccumulate in marine organisms as a consequence of their long biological half life and high lipo-

solubility (Borga et al., 2001; Kidd et al., 2001; Serrano et al., 2003a; Konwick et al., 2006).

Several authors have pointed out that food intake is the main source of OCs accumulation in marine organisms (Easton et al., 2002; Serrano et al., 2003a; Antunes and Gil 2004; Serrano et al., submitted for publication). The maternal transfer of organochlorine compounds in fish has also been studied as another important source of accumulation (Miller, 1993; Russell et al., 1999; Monosson et al., 2003; Oka et al., 2006). In the present work we have determined that less than a half of pollutant load is transferred from liver to oocytes and a significant correlation ($p < 0.05$) between $\log K_{ow}$ and ratios (oocytes/liver) was found.

Lipids play an important role in both, accumulation of lipophilic compounds in marine organisms (Pastor et al., 1996; Shailaja and Nair, 1997; Serrano et al., submitted for publication) and in the mechanism of reproductive transfer of these pollutants in fish (Miller, 1993; Ungerer and Thomas, 1996).

^{*} Corresponding author. Tel: +34 964 387358; fax: +34 964 387368.
E-mail address: serrano@qfa.uji.es (R. Serrano).
URL: <http://www.iupa.uji.es> (R. Serrano).

Abstract

To investigate the transfer of lipophilic organochlorine compounds to the gonads in gilthead sea bream females, liver and oocytes from wild and farmed females, just before spawning, were analysed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry after clean-up of the fatty extracts by normal phase HPLC. This analytical methodology allowed us to achieve limits of detection of around 0.1 ng/g.

Data obtained show that the chemicals studied are transferred from the liver to oocytes in ratios up to 0.51. In general this means that less than a half of pollutant load is transferred from liver to oocytes. A significant correlation ($p < 0.05$) between log Kow and ratios (oocytes/liver) was found. Compounds with larger Log Kow present lower lipid-based concentration ratios (oocytes/liver). We have inferred that the reason the fugacity model is not accomplished is specifically dependent on the vitellogenesis process, which involves the transfer of lipids from the liver to oocytes in teleostei. No significant differences (t-Student) have been found between wild and farmed females transfer ratios (oocytes/liver).

Keywords: Maternal transfer; Organochlorine compounds; Gilthead sea bream; Wild fish; Farmed fish

1. Introduction

Persistent organic pollutants (POPs) are synthetic chemicals, mainly pesticides and industrial products that have been shown to be toxic to wildlife (Varó et al., 2002 and Kaushik and Kaushik, 2007). In spite of prohibitions and

restrictions, POPs such as organochlorine compounds (OCs) has already spread worldwide from tropical latitudes to the Arctic and Antarctica (Hernández et al., 2000, Pandit et al., 2001, Hoekstra et al., 2003, Bocquené and Franco, 2005 and Yang et al., 2007). From such widespread use concern arises regarding these compounds that is related to their potential to bioaccumulate in marine organisms as a consequence of their long biological half life and high liposolubility (Borga et al., 2001, Kidd et al., 2001, Serrano et al., 2003a and Konwick et al., 2006).

Several authors have pointed out that food intake is the main source of OCs accumulation in marine organisms (Easton et al., 2002, Serrano et al., 2003a, Antunes and Gil, 2004 and Serrano et al., (submitted for publication)). The maternal transfer of organochlorine compounds in fish has also been studied as another important source of accumulation (Miller, 1993, Russell et al., 1999, Monosson et al., 2003 and Oka et al., 2006). In the present work we have determined that less than a half of pollutant load is transferred from liver to oocytes and a significant correlation ($p < 0.05$) between log Kow and ratios (oocytes/liver) was found.

Lipids play an important role in both, accumulation of lipophilic compounds in marine organisms (Pastor et al., 1996, Shailaja and Nair, 1997 and Serrano et al., (submitted for publication)) and in the mechanism of reproductive transfer of these pollutants in fish (Miller, 1993 and Ungerer and Thomas, 1996).

Moreover, early life stages of many species exhibit great sensitivity to contaminants (Bansal et al., 1980 and Russell et al., 1999) and, consequently, knowledge of the exposure to pollutants during gonadal recrudescence is of ecotoxicological concern.

In the present paper, we have determined the concentrations of organochlorine pesticides (OCPs), including metabolites, and polychlorinated

biphenyls (PCBs), in the liver, the main target organ of lipid storage in teleostei, and in gonads from the gilthead sea bream females prior to spawning. Ratios between oocytes and liver OCs concentrations have been determined and related to pollutant physico-chemical characteristics. We have also compared the results obtained for wild and farmed females.

2. Material and Methods

2.1. Sample collection

Samples of wild and cultured gilthead sea bream females (*Sparus aurata*) came from populations located off the Castellón Coast (Spanish Mediterranean Coast) either from trawl catch or from sea-cage farms located in the same area. They were purchased from local commercial markets, dissected and the target tissues separated and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Table 1 shows the description of the specimens analysed.

Samples were collected in November 2003. Three composite samples were made up from five individual specimens obtained from the same fish seller in each case (see Table 1) that were pooled to obtain homogeneous composite samples of liver and oocytes ($n = 5$). Each composite sample were analysed in sextuplicate. The development stage of oocytes was checked to ensure selection of females just before spawning (oocyte diameter around 1 mm).

2.2. Analytical methodology

Organochlorine compounds, including pesticides and derivatives (DDTs - *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD-, HCB, heptachlor, heptachlor epoxide, lindane, mirex, metoxychlor, endosulfan (α and β isomers), endosulfan sulphate and

endosulfan ether), and the polychlorinated biphenyls usually used as indicators (IUPAC N° 28, 52, 101, 118, 138, 153, 170, and 180), were determined in liver and oocytes following the method described by Serrano et al. (2003b).

Table 1. Description of gilthead sea bream females analysed

	Weight (g)		Hepatosomatic index (HSI)		Gonadosomatic index (GSI)	
	Wild	Farmed	Wild	Farmed	Wild	Farmed
Mean	5076	698	1.7	0.8	7.4	1.6
SD	511	30	0.1	0.1	0.1	0.3
RSD %	10	4	7	11	2	16

SD were calculated from the three mean values obtained after analysis of composite samples in sextuplicate.

Date of sampling: November 2003.

In brief, extraction from tissues was carried out by refluxing ca. 8 g homogenized, thawed sample in n-hexane for 4 h. Clean up of sample extracts was performed by HPLC, injecting 1 mL hexanic extract (4 g sample per mL) into an HPLC system using a silica-gel column.

Analysis of the fat-free LC fractions collected was performed by gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) using an ion trap mass analyzer, under conditions shown in Table 2 (more details reported in Serrano et al., 2003b).

The analytical method applied showed excellent sensitivity and selectivity, as a consequence of the use of tandem mass spectrometry. It was satisfactorily validated by recovery experiments down to 5 ng/g. Lower spiked levels were not checked due to the presence of DDTs and PCBs in the “blank” samples and the background levels found in all samples analyzed.

Table 2. Experimental conditions of the MS/MS methods used for the determination of PCBs and OCs

Compound	Parent ion	Time (min)	Window	Mass range	Voltage (V)	Rt _a (min)	Extracted ions selected
HCB	288 _b	3.50	10	170–295	3.50	7.31	214, 249
HCB- ¹³ C ₆ ^d	288 _b	3.50	10	170–295	3.50	7.31	220, 225
Lindane	219	7.50	5	140–225	1.05	7.85	181, 183
Endosulfan ether	241	8.40	8	165–245	1.56	8.84	204–208, 237–241
Heptachlor	337	9.25	8	200–345	1.50	9.56	265
Heptachlor epoxide	355	11.30	8	175–360	1.60	11.80	265
α-Endosulfan	241	12.65	8	165–245	2.50	12.99	170, 172, 204–208
<i>p,p'</i> -DDE	250 _c	13.60	8	145–260	3.00	13.82	176
<i>p,p'</i> -DDE-D ₈ ^d	250 _c	13.60	8	145–260	3.00	13.82	183, 184
β-Endosulfan	241	14.60	8	165–245	2.50	15.02	170, 172, 204–208
<i>p,p'</i> -DDD	235	15.20	8	160–240	1.30	15.44	165, 199
Endosulfan sulphate	289	16.47	8	175–295	1.60	16.63	217, 219, 251–255
<i>p,p'</i> -DDT	235	16.75	8	160–240	1.70	16.83	165, 199
Metoxychlor	227	18.00	4	110–230	1.50	19.21	152, 169
Mirex	272	20.00	8	200–280	1.50	20.5	237
PCB 28	258	3.50	4	140–262	2.00	9.16	186
PCB 52	292	9.80	4	180–295	1.50	10.09	220, 222
PCB 101	326	11.50	4	170–330	2.00	12.85	254, 256
PCB 118	326	11.50	4	170–330	2.00	15.09	254, 256
PCB 153	360	15.60	8	200–380	1.75	15.93	288, 290
PCB 138- ¹³ C ₁₂ ^d	372	15.60	8	200–280	1.75	16.99	302, 337, 372, 374
PCB 138	360	15.60	8	200–380	1.75	16.99	288, 290
PCB 170	396	18.50	8	220–402	2.25	19.35	322, 324, 326
PCB 180	396	18.50	8	220–402	2.25	19.66	322, 324, 326

The isotopic labelled compounds used as surrogate internal standards (modified from Serrano et al., 2003b) are shown in italic letters.

a Rt: retention time.

b The total m/z range selected to carry out fragmentation (283–293) covers the individual parent ions of HCB (284) and HCB ¹³C₆ (290).

c The total m/z range selected to carry out fragmentation (245–255) covers the individual parent ions of *p,p'* DDE (246) and *p,p'* DDE D₈ (254).

d Isotopically labelled compounds used as surrogate internal standards.

However, the powerful analytical characteristics of GC–MS/MS together with the efficiency of the HPLC clean up in removing fat, allowed us to detect the analytes at concentrations as low as 0.1 ng/g (estimated as the limit of detection), except for endosulfan ether (0.2 ng/g). The limit of quantification was estimated as three times the detection limit (i.e. nine times the background noise in the chromatograms), resulting in values of 0.3 ng/g, except for endosulfan ether (0.6 ng/g). All analytes detected in the samples were confirmed by tandem mass spectrometry.

Quantification of samples was carried out by means of external calibration applying the internal standard method. Results were not corrected as all recoveries were between 70–110%. For internal standard calculations and quality control, 50 ng of isotopically labelled standards were added to the standards and to the samples before extraction as surrogates. Labelled standards used were HCB- $^{13}\text{C}_6$ (for the determination of HCB, lindane, endosulfan ether, heptachlor, heptachlor epoxide, and α -endosulfan); *pp'*-DDE- D_8 (for DDTs, β -endosulfan, endosulfan sulfate, metoxychlor, and mirex), and PCB138- $^{13}\text{C}_{12}$ (for PCBs).

2.3. Determination of fat

The total fat content in the sample extracts was determined gravimetrically after evaporation at 95 °C to constant weight.

2.4. Data analysis

OC concentrations in liver and oocytes has been expressed on a fresh weight and lipid weight basis (ng/g fresh weight and ng/g lipid weight). Data were converted to Log (ng/g lipid weight +1) to correct for the dependence between arithmetic means and standard deviations. Homoscedasticity of variances was tested by means of Barlett's test ($P < 0.05$). Concentration in liver and oocytes and

the ratios (oocytes/liver concentrations) in wild and cultured fish were compared by t-Student test. All the statistical tests, including regression calculations, were conducted using STATGRAPHICS Version 7.0 (Statistical Graphics Corporation) and MS EXCEL 2000 (Microsoft).

3. Results and discussion

3.1. Concentrations of OCPs and PCBs

Fig. 1 shows the OCPs and PCBs concentrations determined in liver and oocytes from wild and farmed females, expressed as ng/g fresh weight and lipid basis. The contamination profile in the samples was similar to that previously found in gilthead sea bream from western Mediterranean coastal regions (Serrano et al., submitted for publication). The highest concentrations corresponded to the sum of DDTs (especially pp' DDE) and the biphenyls with a higher degree of chlorine substitution (PCBs number 118, 138, 153, 180).

All substances quantified in female livers were also quantified in the oocytes. Most of the pollutants presented significantly higher concentrations in liver than in oocytes (t-Student $p < 0.01$).

Three analytes, pp'-DDT, PCB 28 and PCB 52 were detected below the limit of quantification in wild specimens, and were not used in transfer ratio calculations. PCBs congeners 138 and 153 (six chlorinated biphenyls), and 170 and 180 (seven chlorinated biphenyls) presented the highest concentrations in the samples analysed, coinciding with the congeners with higher retention in aquatic organisms (Niimi, 1996). As can be observed in Fig. 1, the normalization of concentrations for lipid weight generally did not correct the trends observed in fresh weight data.

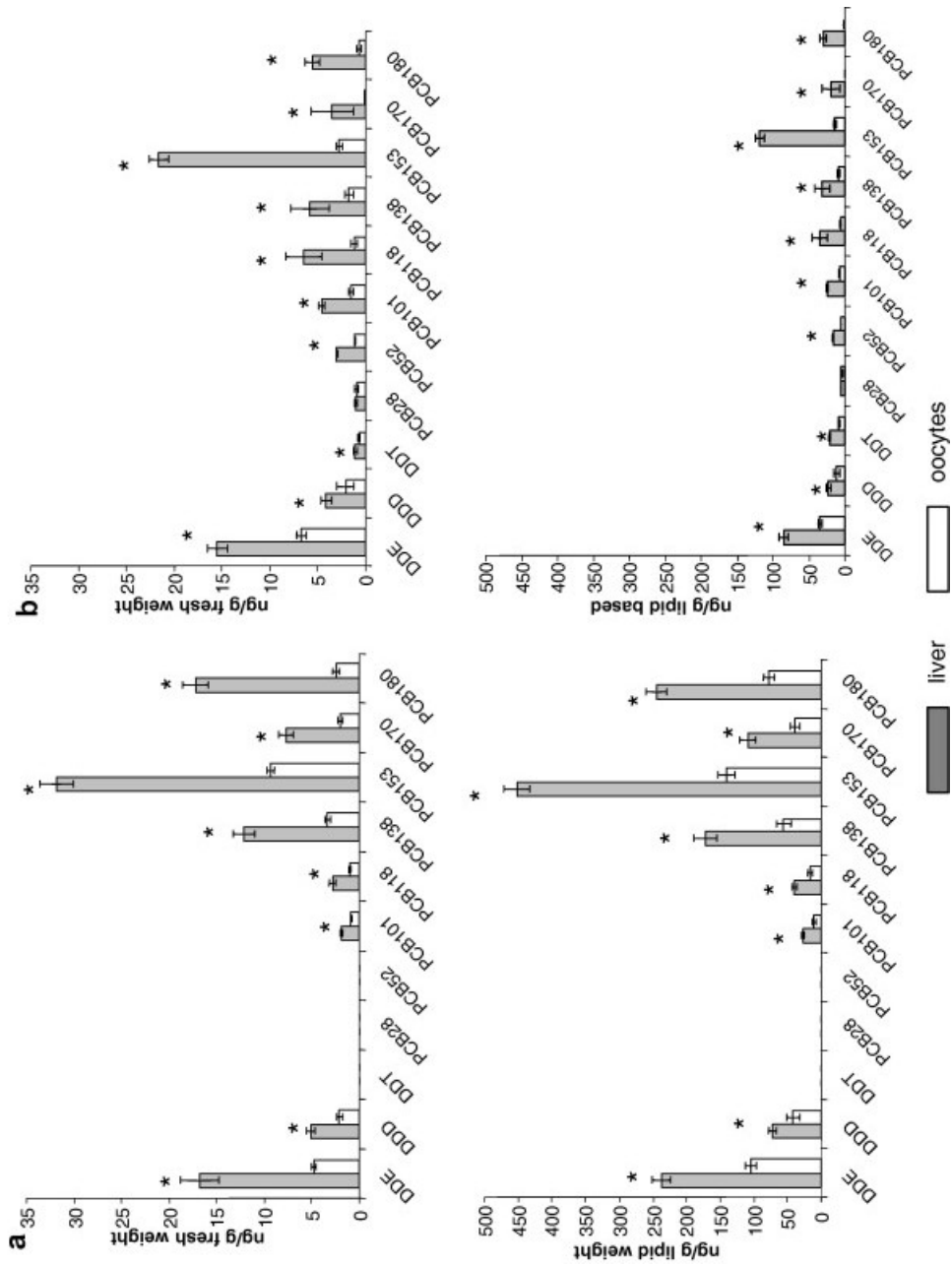


Fig. 1. Mean concentrations expressed as fresh weight and lipids basis for organochlorine compounds and polychlorinated biphenyls in wild (a) and farmed b) gilthead sea bream. *: significant differences between oocyte and liver concentrations (t-Student, $p < 0.01$).

3.2. Maternal transfer of PCBs and OCPs

Liver is the main target organ of lipid storage in some fish and plays an important role in vitellogenesis. For this reason, we investigated the transfer of the pollutants from liver to oocytes in gilthead sea bream females. We have calculated the proportion of each chemical present in the liver and in the oocytes of each female, using lipid-basis concentrations. The mean lipid-basis concentration ratios (oocytes/liver) are presented in Table 3. Data obtained show that chemicals studied are transferred from the liver to oocytes in ratios up to 0.51, what means that, in general, less than a half of pollutants load is transferred from liver to oocytes. Only PCB28 in farmed specimens showed a ratio close to 1.

The fugacity model has previously been used to describe the transfer of hydrophobic pollutants in eggs (Russell et al., 1999 and Kadokami et al., 2004), which predicts that the lipid-based concentration ratio between egg/female should be, theoretically, 1.0. Nevertheless, in fish ratios ranges from 0.5 to 2.5 or significantly smaller than 1.0 have been reported (Russell et al., 1999).

Our results indicated that for PCB 28, with three chlorine atoms, this ratio was not significantly different from 1.0, which is in accordance with the fugacity model. Nevertheless, PCBs with more chlorine atoms presented decreased transfer ratios (oocyte/liver), significantly lower than 1.0 (t-Student, $p < 0.01$) (Table 3). These results suggest a relationship between transfer ratios (oocyte/liver) and the physicochemical characteristics of the studied compounds. In this sense, we have studied the possibility of correlation between transfer ratios and octanol-water partition coefficients. Log Kow values were obtained from literature, using the mean value of five coefficients determined by different methods (Ballschmiter et al., 2005). Results obtained showed a significant correlation ($p < 0.05$) between log Kow and ratios (oocytes/liver) (Fig. 2), with smaller concentrations ratios

(oocytes/liver) for compounds with larger Log Kow. This fact suggests a relation between physico-chemical characteristics of PCBs and the process of transference from the liver to the oocytes. This relationship has been previously described in fish by Russell et al. (1999) and a similar behaviour has been reported by Kadokami et al. (2004) for dioxins and dibenzofuranes (PCDDs/DFs) in frog.

Table 3. Mean ratios (oocytes/liver) of lipid based concentrations for each compound studied for wild and farmed gilthead sea bream females and Log Kow

Compound	Wild		Farmed		Log Kow
	Ratio oocytes/liver	RSD %	Ratio oocytes/liver	RSD %	
pp'-DDE	0.28	13	0.43	10	6.7
pp'-DDD	0.41	20	0.51	15	6.1
pp'-DDT	–	–	0.31	11	6.5
PCB28	–	–	0.94	15	5.6
PCB52	–	–	0.37	8	5.8
PCB101	0.44	15	0.33	14	6.3
PCB118	0.34	18	0.18	16	6.7
PCB138	0.28	14	0.30	12	6.8
PCB153	0.29	7	0.12	14	6.8
PCB170	0.27	16	0.03	13	7.4
PCB180	0.25	11	0.02	12	7.3

DDE = dichloro-diphenyldichloroethylene;

DDD = dichlorodiphenylethane;

DDT = dichlorodiphenyltrichloroethane;

PCB = polychlorinated biphenyls.

Ratios were calculated using the compounds that were quantified.

t-Student test found significant differences ($p < 0.01$) between ratios and 1.0 in all cases, except PCB 28.

t-Student test did not found differences between wild and farmed females.

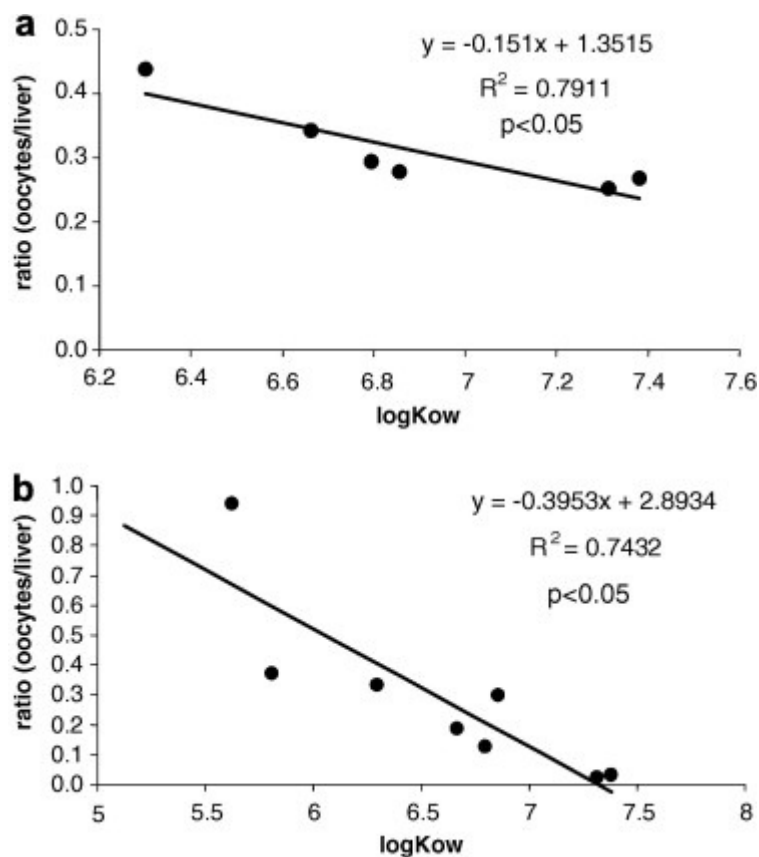


Fig. 2. Correlation (Pearson's coefficient) between octanol-water coefficients of PCBs (Log Kow) and lipid-based concentration ratios (oocyte/liver) in wild (a) and farmed (b) females (mean values from three samples composed by five specimens each one). Quantified PCBs in liver and oocytes were considered (IUPAC N° 28, 52, 101, 118, 138, 153, 170, and 180 in farmed fish, only the last six in wild fish).

Taking into account that PCBs with a higher degree of chlorination present higher bioaccumulation factors (BMFs) in different species (Niimi, 1996), we inferred the reason the fugacity model is not accomplished, is specifically

dependent on the vitellogenesis process, which transfers lipids from the liver to oocytes in teleostei.

In the process of vitellogenesis, lipids are transferred from the liver to the oocytes by means of vitellogenin, a lipophosphoprotein with different degrees of phosphorylation, that is synthesized in the liver. Other components of the yolk are also transferred from the liver. This process leads to gonad recrudescence (Hoar, 1983; Serrano, 1990).

Ungerer and Thomas (1996) reported that in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*), *o,p'* DDT is transported from liver to oocytes by means of lipoproteins, mainly very low density lipoproteins (VLDL), and oocyte uptake of triglyceride-rich VLDL is a major mechanism of accumulation in ovaries.

In light of our results, the decrease of transfer ratios when the degree of chlorination increases, could be explained by physico-chemical characteristics affecting the binding of lipophilic pollutants in lipoproteins during the synthesis of vitellogenin in the liver.

In regards to DDTs, *p,p'*DDE was found at high concentrations up to 240 ng/g lipid weight in wild specimens and ratios (oocyte/liver) obtained for DDTs ranged between 0.31 and 0.51, similar to that obtained by other authors in oviparous species (Kadokami et al., 2004).

3.3. Comparison between wild and farmed specimens

Unfortunately, it was impossible obtain cultured and wild females with similar range of weights, as cultured females with weights higher than 1 kg are use to reproductive purposes and not are commercially available. Then, the high difference in the weight of the specimens analysed must be taken into account in

the discussion of the results obtained and conclusions inferred from the comparison of the data obtained must be taken with caution.

In this work, wild gilthead sea bream females presented higher organochlorine concentrations than cultured specimens, as has been reported previously by Serrano et al (submitted for publication). The organochlorine compounds that presented at higher concentrations were pp'-DDE and PCB 153 in both wild and farmed specimens. For transfer ratios (oocytes/liver), no significant differences (t-Student) have been found between the wild and farmed female specimens analysed, in spite of differences in weight, hepatosomatic index and gonadosomatic index. While it is possible to expect that farmed fish may exhibit differences in vitellogenesis and the associated process of pollutants transfer to that of wild fish because of the different feeding characteristics on farms, we found this was not the case with no significant differences in transfer ratios.

Acknowledgments

We thank the Generalitat Valenciana (Conselleria de Cultura y Educación, Project GV 00-019-2) for financial support of this study. M.A. Blanes is very grateful to Generalitat Valenciana for his junior research contract.

References

- Antunes and Gil, 2004 P. Antunes and O. Gil, PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria Aveiro, Portugal, *Chemosphere* 54 (2004), pp. 1503–1507.
- Ballschmiter et al., 2005 K. Ballschmiter, D. Klinger, S. Ellinger and R. Hackenberg, High-resolution gas chromatography retention data as a basis for estimation of the octanol–water distribution coefficients (Kow) of PCB: the effect of experimental conditions, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005), pp. 1859–1870.
- Bansal et al., 1980 S.K. Bansal, S.R. Verma, A.K. Gupta and R.C. Dalela, Predicting long term toxicity by sub acute screening of pesticides with larvae and early juveniles of four species of freshwater major carp, *Ecotox. Environ. Safe.* 4 (1980), pp. 224–231.
- Bocquené and Franco, 2005 G. Bocquené and A. Franco, Pesticide contamination of the coastline of Martinique, *Mar. Pollut. Bull.* 51 (2005), pp. 612–619.
- Borga et al., 2001 K. Borga, G.W. Gabrielsen and J.U. Skaare, Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain, *Environ. Pollut.* 113 (2001), pp. 187–198.
- Easton et al., 2002 M.D.L. Easton, D. Luszniak and E. Von der Geest, Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed, *Chemosphere* 46 (2002), pp. 1053–1074.
- Hernández et al., 2000 F. Hernández, R. Serrano, A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo and F.J. López, Persistent organochlorines and organophosphorus compounds and heavy metals in common whale (*Balaenoptera physalus*) from the western Mediterranean Sea, *Mar. Pollut. Bull.* 40 (2000), pp. 426–433.

- Hoar, 1983 W.S. Hoar, General Comparative Physiology (third ed.), Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey (1983).
- Hoekstra et al., 2003 P.F. Hoekstra, T.M. O'Hara, A.T. Fisk, K. Borga, K.R. Solomon and D.C.G. Muir, Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas, Environ. Pollut. 124 (2003), pp. 509–522.
- Kadokami et al., 2004 K. Kadokami, M. Takeishi, M. Kuramoto and Y. Ono, Maternal transfer of organochlorine pesticides, polychlorinated dibenzo p-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs to their eggs, Chemosphere 57 (2004), pp. 383–389.
- Kaushik and Kaushik, 2007 P. Kaushik and G. Kaushik, An assessment of structure and toxicology correlation in organochlorine pesticides, J. Hazard. Mater. 143 (2007), pp. 102–111.
- Kidd et al., 2001 K.A. Kidd, H.A. Bootsma, R.H. Hesslein, D.C.G. Muir and R.E. Hecky, Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, East Africa: importance of trophic level and carbon source, Environ. Sci. Technol. 35 (2001), pp. 14–20.
- Konwick et al., 2006 B.J. Konwick, A.W. Garrison, M.C. Black, J.K. Avants and A.T. Fisk, Bioaccumulation, biotransformation and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout, Environ. Sci. Technol. 40 (2006), pp. 2930–2936.
- Miller, 1993 M.A. Miller, Maternal transfer of organochlorine compounds in salmonides to their eggs, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50 (1993), pp. 1405–1413.
- Monosson et al., 2003 E. Monosson, J.T.F. Ashley, A.E. McElroy, D. Woltering and A.A. Elskus, PCB congener distributions in muscle, liver and gonad of *Fundulus heteroclitus* from the lower Hudson River Estuary and Newark Bay, Chemosphere 52 (2003), pp. 777–787.

- Niimi, 1996 A.J. Niimi, Evaluation of PCBs and PCDD/Fs retention by aquatic organisms, *Sci. Total Environ.* 192 (1996), pp. 123–150.
- Oka et al., 2006 M. Oka, T. Arai, Y. Shibata and N. Miyazaki, Reproductive transfer of organochlorines in viviparous surf perch, *Ditrema temmincki*, *Environ. Pollut.* 142 (2006), pp. 383–387.
- Pandit et al., 2001 G.G. Pandit, A.M. Mohan Rao, S.K. Jha, T.M. Krishnamoorthy, S.P. Kale, K. Raghu and N.B.K. Murthy, Monitoring of organochlorine pesticide residues in the Indian marine environment, *Chemosphere* 44 (2001), pp. 301–305.
- Pastor et al., 1996 D. Pastor, J. Boix, V. Fernández and J. Albaigés, Bioaccumulation of organochlorine contaminants in three estuarine fish species (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax*), *Mar. Pollut. Bull.* 32 (1996), pp. 257–262.
- Russell et al., 1999 R.W. Russell, F.A.P.C. Gobas and G.D. Haffner, Maternal transfer and in ovo exposure of organochlorines in oviparus organisms: a model and field verifications, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999), pp. 416–420.
- Serrano, 1990 Serrano, R., 1990. Efecto de la Manipulación Ambiental y Hormonal sobre la Calidad de la Progenie en Lubina (*Dicentrarchus labrax*). PhD Thesis. Col·leció Tesis Doctorals en Microfitxes. Publicacions de la Universitat de Valencia. Valencia. Spain (in Spanish).
- Serrano et al., 2003a R. Serrano, A. Simal-Julian, E. Pitarch, F. Hernández, I. Varo and J.C. Navarro, Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003), pp. 3375–3381.
- Serrano et al., 2003b R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch and F. Hernández, Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas

- chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 26 (2003), pp. 75–86.
- Serrano et al., (submitted for publication) Serrano, R., Barreda, M., Blanes, M.A., submitted for publication. Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.*
- Shailaja and Nair, 1997 M.S. Shailaja and M. Nair, Seasonal differences in organochlorine pesticide concentrations of zooplankton and fish in the Arabian Sea, *Mar. Environ. Res.* 44 (1997), pp. 263–274.
- Ungerer and Thomas, 1996 J.R. Ungerer and P. Thomas, Role of very low density lipoproteins in the accumulation of o,p'-DDT in fish ovaries during gonadal recrudescence, *Aquat. Toxicol.* 35 (1996), pp. 183–195.
- Varó et al., 2002 I. Varó, R. Serrano, E. Pitarch, F. Amat, F.J. López and J.C. Navarro, Bioaccumulation of chlorpyrifos through an experimental food chain Study of protein HSP 70 as biomarker of sublethal stress in fish, *Arch. Environ. Cont. Tox.* 42 (2002), pp. 229–234.
- Yang et al., 2007 R. Yang, T. Yao, B. Xu, G. Jiang and X. Xin, Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau, *Environ. Int.* 33 (2007), pp. 151–156.

2.4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los objetivos de los trabajos expuestos fueron establecer las variaciones estacionales de los niveles de PCBs y DDTs en los diferentes tejidos de doradas salvajes y cultivadas e intentar relacionar estas variaciones con factores ambientales y del ciclo biológico, como la abundancia de lípidos, investigando en concreto la transferencia hacia las gónadas de PCBs y DDTs durante la fase reproductiva procurando esclarecer los mecanismos que controlan este proceso de transferencia.

La técnica instrumental empleada para la determinación de los compuestos considerados (PCBs y DDTs) fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Dada la gran abundancia de lípidos en los tejidos analizados fueron necesarias etapas previas de extracción y purificación, debido a la incompatibilidad de los lípidos con el sistema cromatográfico.

De esta forma se obtuvieron resultados de especial interés, ya que si bien existe amplia documentación sobre la presencia de organoclorados en especies marinas, no abundan los estudios en los cuales se investigue en una misma especie las variaciones estacionales de los niveles de contaminantes en los diferentes tejidos y las posibles causas. El trabajo sobre organismos vivos añade complejidad a la investigación, haciendo imprescindible el conocimiento del ciclo biológico-reproductivo de la especie y de las influencias climáticas que pueda haber, siendo necesario planificar el muestreo teniendo en cuenta estas variables.

Previamente al estudio de la variación estacional de los niveles de clorados en los tejidos, es necesario indicar que el perfil lipídico en los tejidos estudiados de doradas salvajes y cultivadas es significativamente diferente. El muestreo realizado ha aportado resultados sobre el porcentaje de lípidos a lo largo del año,

permitiendo trazar perfectamente el ciclo biológico y reproductivo de las doradas. En el caso de las doradas salvajes se observa el ciclo natural y sin alteración (Tabla 2-**artículo 1**), con un máximo otoñal posterior a la etapa de máxima disponibilidad de alimento y consecuente ingesta y anterior al desarrollo gonadal y ovogénesis. Las doradas cultivadas, con una disponibilidad continua y sobreabundante de alimento muestran un perfil lipídico más estable. En el apartado de resultados y discusión del **artículo 1** se discuten más extensamente estos y otros aspectos.

Llegados a este punto, es necesario discutir la relevancia de expresar los resultados de las concentraciones de PCBs y DDTs en peso fresco o en peso lipídico. Expresar los resultados en peso fresco diferenciando tejidos aporta información útil para aplicaciones como la salud pública, pudiendo calcular la posible ingesta humana de organoclorados, siendo necesario considerar que tejidos se consumen y cuales son habitualmente desechados (Greenfield et al. 2005), en general se observa la tendencia ya indicada de mayores niveles de clorados en los tejidos con mayor cantidad de lípidos. Asimismo conviene considerar las posibles variaciones estacionales de los niveles de clorados presentes, ya que en nuestro estudio se observan niveles 5-8 veces superiores (considerando los resultados en peso fresco) en otoño respecto a enero-marzo en el caso de las doradas salvajes, mientras que para las cultivadas las diferencias son mínimas (Figuras 3,4 y 6,7-**artículo 1**).

Por otro lado, los resultados expresados en peso lipídico son datos fundamentales para estudiar procesos de bioacumulación, biodepuración, transporte entre tejidos y transferencia maternal de los contaminantes a los ovocitos.

Parte de la variación observada de los niveles de PCBs y DDTs en los tejidos de las doradas salvajes está en principio relacionada con los diferentes niveles de lípidos presentes (Figuras 3,4-**artículo 1**). La Figura 5-**artículo 1** muestra las correlaciones obtenidas para las doradas salvajes al representar los porcentajes de lípidos presentes en los tejidos frente a los resultados de concentraciones de PCBs y DDTs. Se observa que para los músculos rojo y blanco y para las agallas los niveles de PCBs están parcialmente correlacionados con los niveles de lípidos, en el caso del hígado no se observa correlación positiva. Por el contrario, los niveles de DDTs no muestran correlación con los niveles de lípidos para ningún órgano. Asimismo no se ha observado ninguna relación entre los PCBs y DDTs y los niveles de lípidos en las doradas cultivadas, esto puede ser debido a la menor variación estacional de los niveles de lípidos y de clorados que se observa en estas doradas (Figuras 6,7-**artículo 1**).

Cuando se transforman los resultados de los niveles de organoclorados en peso fresco a base lipídica, los resultados para las doradas salvajes (Figuras 3,4-**artículo 1**) muestran un nuevo perfil estacional para todos los tejidos menos el hígado, que prácticamente muestra el perfil obtenido anteriormente en peso fresco. Es destacable este comportamiento particular del hígado, posiblemente relacionado con los cambios del tamaño del órgano comentados por Chaoui et al. (2006) como variaciones estacionales del índice hepatosomático (HSI).

Dado que las variaciones estacionales de los niveles de organoclorados no se minimizan cuando son expresadas en base lipídica, se puede plantear que los lípidos y los organoclorados están parcialmente desacoplados en el transporte y los demás procesos en los que están involucrados.

En este sentido, los perfiles estacionales obtenidos en base lipídica para los PCBs en los tejidos estudiados de las doradas salvajes muestran una estructura

claramente similar para todos ellos con unos niveles crecientes en la primera mitad del año, un máximo en mayo y menguantes en la segunda mitad del año (Figuras 3,4-**artículo 1**). Este perfil de contaminantes a lo largo del año está muy relacionado con el ciclo biológico.

Se plantea la hipótesis de que estas variaciones tienen su origen básicamente en que durante la primera mitad del año, la tasa de consumo de lípidos es superior a la tasa de eliminación de organoclorados, mientras que durante la segunda mitad del año la tasa de enriquecimiento de lípidos es mayor que la de acumulación de organoclorados. La primera mitad del año se inicia justo después del gran esfuerzo del desove, por lo tanto con unos niveles de lípidos menguados, con escasas fuentes de alimento y en unas condiciones de temperatura del agua que ralentizan todos los procesos metabólicos, en estas circunstancias las tasas de eliminación de organoclorados por excreción, movilización o metabolismo son menores que la tasa de utilización de lípidos, esto provoca un incremento de la concentración de PCBs y DDTs en los tejidos cuando la concentración se expresa en base lipídica, esta observación ha sido previamente descrita (Paterson et al. 2007; Svendsen et al. 2007). Por el contrario, durante la segunda parte del año la tendencia es la opuesta y los niveles de PCBs y DDTs respecto del contenido de lípidos decrecen. Durante este periodo, la temperatura del agua aumenta así como la disponibilidad de alimento, lo que se traduce en una mayor tasa de alimentación. En consecuencia los niveles de lípidos en los tejidos aumentan rápidamente y este enriquecimiento puede ser más rápido que la tasa de acumulación de organoclorados, lo que resulta en una dilución de los niveles de PCBs y DDTs cuando se expresan en base lipídica, esta observación ha sido planteada con anterioridad (Fu and Wu 2006). Adicionalmente, los mecanismos de eliminación descritos en los peces como la eliminación fecal, pérdida respiratoria y transformación metabólica, aumentan cuando la temperatura del

agua es más alta en verano y otoño, (Paterson et al. 2007), lo que contribuye a explicar parte del descenso de las concentraciones.

Este planteamiento se fundamenta en el ciclo biológico de la dorada y en las condiciones ambientales en las que vive; por otro lado, es coherente con el hecho de que la fracción lipídica de los niveles tróficos de los que se alimenta la dorada deben estar menos contaminados que la misma dorada, ya que en la red trófica marina los organoclorados se acumulan conforme se va incrementando el nivel trófico (Kidd et al. 2001, Naito et al 2003, Hobson et al. 2002).

En el caso de las doradas cultivadas el perfil estacional de organoclorados que se observa es más suavizado, con menos variaciones que el de las doradas salvajes Figuras 6,7 (**artículo 1**) y sin una tendencia significativa ni en peso fresco ni en peso lipídico, consideramos que es consecuencia de las condiciones de cultivo, con una disponibilidad de alimento continua.

Hay que señalar que existe una vía de eliminación de organoclorados no indicada hasta ahora que puede llegar a ser relevante, la transferencia maternal. En los mamíferos se produce mediante la lactancia, encontrándose en la leche materna cantidades relevantes de PCBs y DDTs, en humanos (Bordajandi et al. 2008) y mamíferos marinos (Wolkers et al. 2004). En los organismos ovíparos, como las aves, los organoclorados se pueden encontrar en los huevos (Jiménez et al. 2007) y en los peces la transferencia maternal esta vinculada al proceso de desarrollo gonadal y ovogénesis (Monosson et al 2003).

Si bien la transferencia maternal es una vía de eliminación de organoclorados para la madre, también es un aporte de contaminantes que puede llegar a ser significativo para la cría o embrión. Dado que esta es una etapa crítica del desarrollo con una mayor vulnerabilidad del organismo, es fundamental conocer cuantitativa y cualitativamente dicho proceso de transferencia.

En el caso de los peces, el muestreo tiene complejidades añadidas, en la dorada no se aprecia un desarrollo gonadal importante durante la mayor parte del año (**artículo 1**), siendo bastante difícil obtener ovocitos en un estadio de desarrollo adecuado para realizar los ensayos. Este trabajo (**artículo 2**) se centra en la transferencia desde el hígado a los ovocitos, ya que en los teleósteos es en el hígado donde se acumulan las reservas de lípidos durante parte del año, para llegado el momento utilizar estos lípidos en el desarrollo gonadal y generación de los ovocitos. Este estudio se ha realizado sobre doradas salvajes y cultivadas.

El objetivo fue evaluar la transferencia de organoclorados a los ovocitos en desarrollo, para ello se determinaron individualmente una serie de organoclorados (Tabla 2-**artículo 2**), en el hígado y en los ovocitos de doradas salvajes y cultivadas. Los compuestos encontrados, todos PCBs y DDTs se expresaron en peso fresco y en peso lipídico (Figura 1-**artículo 2**). Para evaluar la posible transferencia de organoclorados desde el hígado a los ovocitos se determinaron los ratios de transferencia en peso lipídico de los PCBs y DDTs encontrados. Los resultados obtenidos para los ratios de transferencia muestran claramente que no todos los compuestos se transfieren en igual cantidad y que en general la transferencia no alcanza el 50% (Tabla 3-**artículo 2**).

Estos resultados son relevantes, ya que muestran que la transferencia de los organoclorados desde el hígado a los ovocitos es un transporte parcialmente regulado. Dado que los ratios de transferencia son diferentes para cada uno de los PCBs estudiados, se planteó la posible relación con sus propiedades físico químicas. Al correlacionar los ratios de transferencia de los PCBs con sus coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$), se obtuvieron correlaciones significativas (Figura 2-**artículo 2**), siendo la transferencia menor cuanto mayor es el $\log K_{ow}$.

Así pues, se plantea la hipótesis de que las propiedades físico-químicas de los PCBs afectan a su interacción con las lipoproteínas implicadas en la síntesis de la vitelogenina en el hígado y posterior transporte de la misma a los ovocitos.

Es destacable que el resultado para las doradas cultivadas no difiere del obtenido para las doradas salvajes, no afectando en este sentido las diferentes condiciones de cría y alimentación.

2.5 REFERENCIAS

- Aguilar A, Borrell A, 2005. DDT and PCB reduction in the western Mediterranean from 1987 to 2002, as shown by levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Mar Environ Res* 59: 391-404.
- Albaigés J, 2005 Persistent Organic Pollutants in the Mediterranean Sea, In: Saliot A, (ed) *The Mediterranean Sea*. Springer, Berlin, p 90-149
- Bordajandi LR, Abad E, Gonzalez MJ, 2008. Occurrence of PCBs, PCDD/Fs, PBDEs and DDTs in Spanish breast milk: Enantiomeric fraction of chiral PCBs. *Chemosphere* 70:567-575
- Chaoui L, Kara MH, Faure E, Quignard JP, 2006. Growth and reproduction of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Sci Mar* 70:545-552
- Fu CT, Wu SC, 2006. Seasonal variation of the distribution of PCBs in sediments and biota in a PCB-contaminated estuary. *Chemosphere* 62:1786-1794
- Gomez-Gutierrez A, Garnacho E, Bayona JM, Albaiges J, 2007. Assesment of the Mediterranean sediments contamination by persistent organic pollutants. *Environ Pollut* 148:396-408
- Greenfield BK, Davis JA, Fairey R, Roberts C, Crane D, Ichikawa G, 2005. Seasonal, interannual, and long-term variation in sport fish contamination, San Francisco Bay. *The Sci Total Environ* 336:25-43
- Hobson KA, Fisk A, Karnovsky N, Holst M, Gagnon JM, Fortier M, 2002. A stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) model for the North Water food web: implications for evaluating trophodynamics and the flow of energy and contaminants. *Deep sea Research II* 49:5131-5150
- Ishaq R, Karlson K, K, Näf C, 2000. Tissue distribution of polychlorinated naphthalenes (PCNs) and non-ortho chlorinated biphenyls (non-ortho CBs)

- in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from Swedish waters. *Chemosphere* 41:1913-1525
- Jimenez B, Merino R, Abad E, Rivera J, Olie K, 2007. Evaluation of organochlorine compounds (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) in two raptor species inhabiting a Mediterranean island in Spain. *Env Sci Pollut Res* 14, Special Issue 1:61-68
- Kidd KA, Bootsma HA, Hesslein RH, Muir DCG, Hecky RE, 2001. Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, east Africa: Importance of trophic level and carbon source. *Environ Sci Technol* 35:14-20
- Monosson E, Ashley JTF, McElroy AE, Woltering D, Elskus AA, 2003. PCB congener distributions in muscle, liver and gonad of *Fundulus heteroclitus* from the lower Hudson River Estuary and Newark Bay. *Chemosphere* 52:777-787
- Naito W, Jin J, Kang YS, Yamamuro M, Manasuga S, Nakanishi J, 2003. Dynamics of PCDDs/DFs and coplanar-PCBs in an aquatic food chain of Tokyo Bay. *Chemosphere* 53:347-362.
- Paterson G, Drouillard KG, Haffner GD, 2007. PCB Elimination by Yellow Perch (*Perca flavescens*) during an Annual Temperature Cycle. *Environ Sci Technol* 41:824-829
- Stouthart XJHX, Huijbregts MAJ, Balm PHM, Lock RAC, Wendelaar Bonga SE, 1998. Endocrine stress response and abnormal development in carp (*Cyprinus carpio*) larvae after exposure of the embryos to PCB 126. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 321-329.
- Svendsen TC, Vorkamp K, Frederiksen M, Rønsholdt B, Frier J-O, 2007. Body burdens of persistent halogenated compounds during different development stages of anadromous brown trout (*Salmo trutta*). *Environ Sci Technol* 41:5980-5985

- Villeneuve JP, Carvalho FP, Fowler SW, Cattini C, 1999. Levels and trends of PCBs, chlorinated pesticides and petroleum hydrocarbons in mussels from the NW Mediterranean coast: comparison of concentrations in 1973/1974 and 1988/1989. *Sci Total Environ* 237/238:57-65
- Wolkers H, Lydersen Ch, Kovacs KM, 2004. Accumulation and lactational transfer of PCBs and pesticides in harbour seals (*Phoca vitulina*) from Svalbard, Norway. *Sci Total Environ* 319:137-146

CAPÍTULO 3:

BIOMAGNIFICACIÓN DE CONTAMINANTES ORGANOCOLORADOS EN CADENAS TRÓFICAS MARINAS.

3.1 Introducción

3.2 Artículo científico 3

Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the Western Mediterranean.

3.3 Artículo científico 4

Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (Sparus aurata) and stable isotope characterization of the trophic chains.

3.4 Discusión de los resultados

3.5 Referencias

3.1 INTRODUCCIÓN

En muchos casos el estudio directo de la presencia de contaminantes en el medio marino, tales como metales pesados o compuestos orgánicos persistentes, aporta gran cantidad de información. Sin embargo, se debe señalar que en el estudio de esta información, cuando se quiere evaluar la posible acumulación de contaminantes en los organismos y se pretende conocer la existencia y magnitud de procesos de bioacumulación, existe un problema de contextualización de los datos en un esquema de relaciones tróficas correcto que permita conocer la ubicación de un organismo frente a los demás en la red trófica.

Así pues, conocer las fuentes de alimento de un organismo y las proporciones de estas en la dieta total, ha sido un problema presente en múltiples disciplinas de estudio ambiental. Al principio se utilizaban técnicas como el estudio del contenido estomacal o de restos no digeridos para conocer la alimentación del organismo estudiado, pero esto solo aportaba un dato instantáneo y puntual que además de ser difícil de obtener no era necesariamente representativo.

Actualmente el estudio de los isótopos estables, principalmente de carbono y nitrógeno, es ampliamente utilizado para conocer las relaciones tróficas en los ecosistemas acuáticos. Se basa en la premisa de que el depredador contiene más isótopos pesados de N y C (^{15}N y ^{13}C , respectivamente) que sus presas, las cuales tienen una proporción superior de los isótopos más ligeros (^{14}N y ^{12}C , respectivamente). El estudio de estos facilita también información sobre las fuentes de carbono y nitrógeno que entran en el ecosistema (Michener y Schell 1994; Smit 2001), ya que cada fuente de carbono y/o nitrógeno tiene una relación de isótopos estables característica.

De esta forma el estudio de las relaciones entre isótopos estables tiene múltiples aplicaciones en estudios de dieta y red trófica y se puede aplicar para elucidar las diferentes características tróficas, o lo que es lo mismo la posición trófica que presentan los ejemplares salvajes y cultivados, puesto que estos últimos surgen de una red trófica artificial, derivada de las actividades de la acuicultura marina.

Las diferencias entre las relaciones de isótopos estables pueden ser atribuidas a diferentes causas. El contenido en lípidos del tejido afecta claramente al valor de $\delta^{13}\text{C}$, mientras que el efecto sobre $\delta^{15}\text{N}$ depende del tejido y del contenido en lípidos (Lorrain et al. 2002; Soritopoulos et al. 2004). El enriquecimiento isotópico también depende de la tasa de intercambio del tejido en estudio y puede variar dependiendo del tipo de tejido (Lorrain et al. 2002; Bodin et al. 2006).

Aplicada a la elucidación de relaciones tróficas, la determinación de isótopos estables constituye una herramienta versátil que permite definir el esquema de relación trófico, entre diferentes organismos y establecer los flujos de carbono y nitrógeno (Kaehler et al. 2000; Darnaude et al. 2004). Ya que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y de $\delta^{15}\text{N}$ permiten ordenar en un sistema de referencia cartesiano los diferentes grupos de muestras, haciendo más fácil la comprensión de las relaciones que a nivel trófico existen entre las mismas.

Hay que destacar que es en la investigación de la presencia de contaminantes en los organismos o sedimentos donde la determinación de isótopos estables alcanza una de sus aplicaciones más relevantes, ya que permite correlacionar globalmente los niveles de contaminantes junto con las posiciones en la red trófica de organismos (Hoekstra et al. 2003; Naito et al. 2003; Kidd et al. 2001).

De esta forma se puede realizar un estudio general que incluya una especie como la dorada (*Sparus aurata*) objeto de producción acuícola, con ejemplares procedentes de cría y de pesca extractiva y también las fuentes habituales de alimento de cada uno de los grupos. Si se determinan las concentraciones de PCBs y DDTs en todas las muestras y paralelamente se obtienen las relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno en las mismas, se tiene una gran cantidad de información que convenientemente correlacionada, permite establecer un esquema relacional adecuado para el cotejo de los resultados sobre la presencia de organoclorados en las doradas, así como la relación de estos niveles de PCBs y DDTs con la posición trófica relativa de las doradas salvajes frente a las cultivadas y de ambas considerando sus respectivas fuentes de alimento.

Los trabajos que se presentan en este capítulo surgen con un doble propósito, por un lado establecer una metodología adecuada para la determinación de isótopos estables de carbono y nitrógeno en muestras marinas y procedentes de la acuicultura. Por otro lado, aplicar esta técnica a muestras reales sobre las que también se determinan compuestos organoclorados tales como los PCBs y DDTs para poder referenciar los niveles de contaminantes encontrados en un marco de relaciones correcto desde el punto de vista trófico, tanto en el caso de ejemplares salvajes como de cultivados.

En concreto, el objetivo del artículo “*Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) tissues from the Western Mediterranean*” ha sido desarrollar una metodología analítica adecuada para la determinación de isótopos estables de carbono y nitrógeno en diferentes muestras de tejidos de doradas salvajes y cultivadas, estableciendo el tratamiento de muestra óptimo en muestras con diferentes contenidos de lípidos, así como establecer una comparativa de los resultados.

En el caso del artículo “*Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (Sparus aurata) and stable isotope characterization of the trophic chains*” el objetivo ha sido determinar los niveles de contaminantes organoclorados en doradas salvajes y cultivadas así como en el pienso utilizado en la cría de las doradas cultivadas y en algunas de las presas de las doradas salvajes. Con el objeto de caracterizar las cadenas tróficas a las que pertenecen y poder relacionar los niveles de contaminación con su posición trófica.

3.2 ARTICULO 3: *Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (Sparus aurata) from the Western Mediterranean.*

R. Serrano, M.A. Blanes, L. Orero

Chemosphere 69 (2007) 1075-1080

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Chemosphere 69 (2007) 1075–1080

CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphere

Stable isotope determination in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean

R. Serrano ^{a,*}, M.A. Blanes ^a, L. Orero ^b^a Research Institute for Pesticides and Water (IUPA), Avda Sos Baynat, s/n., University Jaume I, 12071 Castellón, Spain^b Central Service of Scientific Instrumentation, Avda Sos Baynat, s/n., University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

Received 26 February 2007; received in revised form 3 April 2007; accepted 6 April 2007

Available online 25 May 2007

Abstract

Stable isotopes of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) have been determined in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) samples of white and red muscle, liver, gills and gonads. First, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were determined in samples with and without lipid removal to check the possible effect of lipid content on the stable isotope values of the different tissues studied. Differences were found for $\delta^{13}\text{C}$ in all tissues studied apart from white muscle of wild fish, the tissue with the lowest lipid content. For $\delta^{15}\text{N}$ values no differences were found in wild fish tissues. Liver from farmed fish showed lower $\delta^{15}\text{N}$ value after lipid removing. Further conclusions were based on results obtained from lipid-free samples. $\delta^{13}\text{C}$ of cultured fish tissues showed a mean depletion of $2.9 \pm 0.4\%$ compared to wild specimens, suggesting different sources of carbon in the diet, probably due to the feed used during sea-cage culture. Cultured gilthead sea bream tissues were significantly more enriched in nitrogen than wild specimens by an average of $1.5 \pm 0.2\%$ in white muscle, indicating a slight increase in the trophic level. Determination of stable isotope signatures of gilthead sea bream tissues allows clear discrimination between wild and cultured sea bream, and characterisation of differences in diet and feeding conditions in any tissue studied.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Stable isotopes; Gilthead sea bream; Western Mediterranean; Marine aquaculture; Wild fish; Farmed fish

1. Introduction

Marine aquaculture has seen strong development in the last few decades as a consequence of increased fish consumption by the world population and decreasing wild stocks. Fish culture has also increased in the western Mediterranean, where it is mainly focused on two species: gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish culture operates in parallel to traditional fisheries and nowadays both cultured and wild fish are important components of the Mediterranean diet.

Different aspects of the operation of sea-cage marine farms have caused considerable concern including coastal environmental impact (Iwama, 1991; Wu, 1995; Vizzini

and Mazzola, 2004) and escapes of cultured specimens to the environment (Dempson and Power, 2004). Fish from sea-cage and land-based farm productions show significant organoleptic differences in many species (Prescott and Bell, 1992; Webster et al., 1993; Sylvia et al., 1995). Differences between the organoleptic characteristics of wild and farmed gilthead sea bream due to the different volatile aroma compounds and fatty acid profiles of the fish muscle have been reported (Grigomakis et al., 2003). On the other hand, differential bioaccumulation of lipophilic pollutants, such as organochlorine compounds, has been found between wild and farmed fish (Easton et al., 2002; Antunes and Gil, 2004). It is known that factors such as lipid level in the diet (Hemre and Sandness, 1999) and ration level (Johansson et al., 1995; Hillestad et al., 1998) increase the body lipid composition and can consequently account for the different fat content and other related differences observed between wild and farmed specimens.

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387358; fax: +34 964 387368.
E-mail address: serrano@qfa.uji.es (R. Serrano).
URL: www.iupa.uji.es (R. Serrano).

Abstract

Stable isotopes of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) have been determined in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) samples of white and red muscle, liver, gills and gonads. First, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values were determined in samples with and without lipid removal to check the possible effect of lipid content on the stable isotope values of the different tissues studied. Differences were found for $\delta^{13}\text{C}$ in all tissues studied apart from white muscle of wild fish, the tissue with the lowest lipid content. For $\delta^{15}\text{N}$ values no differences were found in wild fish tissues. Liver from farmed fish showed lower $\delta^{15}\text{N}$ value after lipid removing. Further conclusions were based on results obtained from lipid-free samples. $\delta^{13}\text{C}$ of cultured fish tissues showed a mean depletion of 2.9 ± 0.4 ‰ compared to wild specimens, suggesting different sources of carbon in the diet, probably due to the feed used during sea-cage culture. Cultured gilthead sea bream tissues were significantly more enriched in nitrogen than wild specimens by an average of 1.5 ± 0.2 ‰ in white muscle, indicating a slight increase in the trophic level. Determination of stable isotope signatures of gilthead sea bream tissues allows clear discrimination between wild and cultured sea bream, and characterisation of differences in diet and feeding conditions in any tissue studied.

Key words: stable isotopes; gilthead sea bream; western Mediterranean; marine aquaculture; wild fish; farmed fish.

Introduction

Marine aquaculture has seen strong development in the last few decades as a consequence of increased fish consumption by the world population and decreasing wild stocks. Fish culture has also increased in the Western Mediterranean, where it is mainly focused on two species: gilthead sea bream

(*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish culture operates in parallel to traditional fisheries and nowadays both cultured and wild fish are important components of the Mediterranean diet.

Different aspects of the operation of sea-cage marine farms have caused considerable concern including coastal environmental impact (Iwama, 1991; Wu, 1995; Vizzini and Mazola, 2004) and escapes of cultured specimens to the environment (Dempson and Power, 2004). Fish from sea cage and land-based farm productions show significant organoleptic differences in many species (Prescott and Bell, 1992; Webster et al., 2003; Sylvia et al., 1995). Differences between the organoleptic characteristics of wild and farmed gilthead sea bream due to the different volatile aroma compounds and fatty acid profiles of the fish muscle have been reported (Grigorakis et al., 2003). On the other hand, differential bioaccumulation of lipophilic pollutants, such as organochlorine compounds, has been found between wild and farmed fish (Easton et al., 2002; Antunes and Gil, 2004). It is known that factors such as lipid level in the diet (Hemre and Sandnes, 1999) and ration level (Johansson et al., 1995; Hillestad et al., 1998) increase the body lipid composition and can consequently account for the different fat content and other related differences observed between wild and farmed specimens.

Stable isotope analysis represents a powerful tool to study feeding relationships in aquatic environments, based on the assumption that a predator contains heavier N and C isotopes (^{15}N and ^{13}C , respectively) than what it feeds on. It is also accepted that the source of C is reflected in changes of ^{13}C value (Michener and Schell, 1994; Smit, 2001). Therefore, this technique should be applied to elucidate the different characteristics that arise as a consequence of culture conditions between wild and farmed fish. And in fact, stable isotopes have

been used to distinguish between wild and farmed salmon (Dempson and Power, 2004).

The variations among the stable isotope signatures of the different tissues can be attributed to different causes. Tissue lipid content clearly affects its $\delta^{13}\text{C}$ isotopic ratio, while the effect on $\delta^{15}\text{N}$ depends on tissue and lipid content (Lorrain et al., 2002; Soritopoulos et al., 2004). Isotopic enrichment also depends on tissue turnover rates, and can vary among a given type of tissue (Lorrain et al., 2002; Bodin et al, 2006).

We hypothesise that fish produced by marine aquaculture facilities present different feeding relationships to wild population. This can be characterized by the stable isotope technique, which provides information about their trophic position and the origin of the differences found between them.

The last technological advances have given to scientists the possibility of the measurement of natural abundance of stable isotopes and its application in different scientific areas. Particularly, the determination of Carbon and Nitrogen stable isotope ratios in live organisms provides a powerful tool to the characterization of web food steps and give us information about sources of natural carbon and nitrogen entering in the ecosystem (see Michener and Schnell, 1994; Smit, 2001).

In the present study, the effect of lipid removal on nitrogen and carbon stable isotope ratios in fish tissues is determined to eliminate lipid content as a factor influencing in the results. Following this we determined $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in lipid free samples of white and red muscle, liver, gills and gonads of wild and farmed specimens of gilthead sea bream to elucidate the different feeding and trophic characteristics between natural and cultured specimens. The data obtained in this study are useful for improving both the knowledge about feeding and about

the trophic consequences of fish production in captivity. This information may provide a baseline for future studies and models of feeding relationships within the new food chain that arise from marine aquaculture activities.

2 Material and Methods

2.1 Sample collection

Real world samples of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) came from populations located off the Castellón coast (Spanish Mediterranean coast) (Figure 1) either by trawl catch, or from sea cage farms located in the same area. They were purchased from local commercial markets, dissected, the target tissues separated, and stored at -20 °C until analysis.

As consequence of the possible interaction between farms and environment, as escaped specimens from farms, or wild fish feed residues from farms, additional checking besides commercial identification was carried out. Morphology and lipid tissues content were used to confirm the fish origin.

Samples were collected in October 2005. Composite samples were made up from six individual specimens (female specimens around 500 g) that were pooled to obtain homogeneous composite samples of each tissue studied. These samples were analysed in sixuplicate for each tissue with and without lipid extraction.

2.2 Sample preparation

Lipids were extracted, and determined by gravimetry, from a half of each sample by refluxing ca. 8 g homogenized unfrozen sample in n-hexane during 4 hours. Then all samples, with and without lipids, were dried at a constant temperature of approximately 60°C for 48 hours. The samples were ground to an ultra-fine powder using mill Super JS (Moulinex, France).

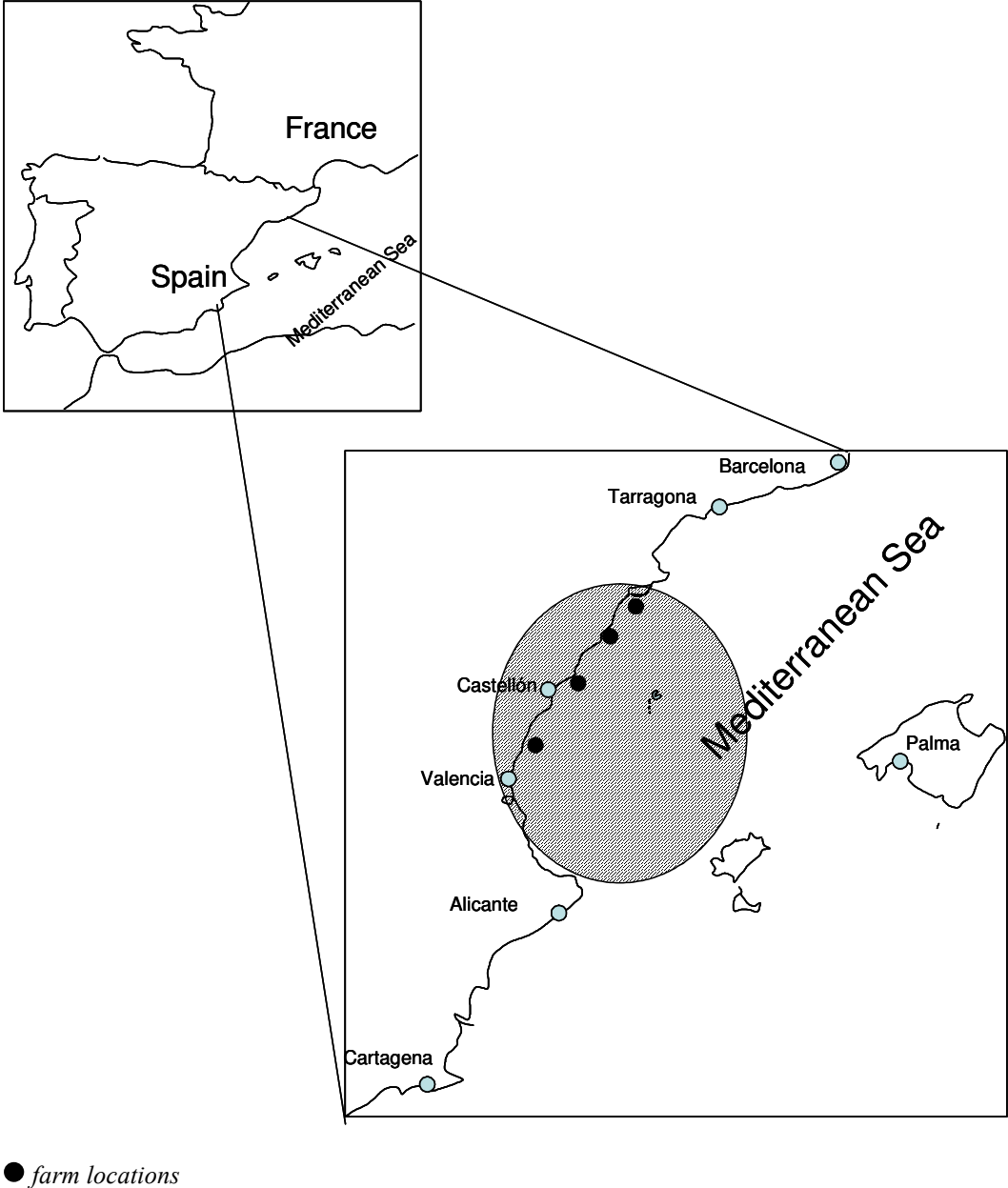


Figure 1. Area of sampling for wild and farmed fish.

2.3 Isotope analysis

For stable isotope analysis, approximately 1 and 0.1 mg of homogeneous dried material was weighed into 5 x 9 mm tin capsules for the determination of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ respectively. Samples were analysed for stable isotope ratios of carbon and nitrogen using an isotope ratio mass spectrometer Micromass Isoprime with an elemental analyzer EuroEA 3000.

Isotope ratios are expressed in conventional δ notation in per thousand (‰) relative to universal standard:

$$\delta X_{\text{sample}} = \left[\left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

All results are reported with respect to VPDB (cretaceous Vienna PeeDee Belemnite) for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$. The analytical precisions were ± 0.20 and ± 0.25 ‰ for nitrogen and carbon, estimated from the standards IAEA-N1 and USGS 24 (graphite) respectively, which were analyzed together with the samples.

2.4 Statistical Analysis

$\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values for tissues before and after lipid removal were compared by means of the t-Student test. Data of stable isotopic composition on different tissues after lipid removal were analysed by means of ANOVA I and “*a posteriori*” Scheffe’s test ($P < 0.05$). Homoscedasticity of variances was tested by means of Bartlett’s test ($P < 0.05$). Precisions between replicates were calculated as

standard deviation, if another parameter is not indicated. All the statistical tests were conducted using STATGRAPHICS Version 7.0 (Statistical Graphics Corporation).

3 Results

Isotopic ratios for C and N were measured in five sea bream tissues (white and red muscle, liver, gills and gonads), before and after removal of lipids from wild and farmed specimens (Figures 2 and 3, respectively).

3.1 Effect of lipids on stable isotope composition

Table 1 presents the lipid content of the different tissues analysed. As can be observed, the values were significantly higher in farmed fish than in wild specimens, in all tissues studied. It is remarkable that liver from farmed fish presented 5 fold differences from the liver content of wild fish.

No significant differences were observed in $\delta^{15}\text{N}$ values between tissues with and without lipids from wild specimens (Figure 2). In regard to $\delta^{13}\text{C}$ values, liver, red muscle and gills showed significant differences (Student test, $p < 0.05$) for wild sea bream, when lipids were removed. Regards cultured sea bream tissues, liver presented differences in the nitrogen stable isotope ratio between the samples with and without lipids (t-Student test, $p < 0.01$) (Figure 3). The same results were observed for carbon, presenting lower $\delta^{13}\text{C}$ values in all tissues studied except for gonads when the lipids were removed (Student test, $p < 0.05$ for white muscle, $p < 0.01$ for the others tissues) (Figure 3).

3.2 Variability of stable isotope composition in tissues

Carbon and nitrogen stable isotope ratios showed significant differences between the tissues analyzed from wild specimens. Both red and white muscle

exhibited the highest $\delta^{15}\text{N}$ values, followed by gills, liver and gonads (ANOVA, $p < 0.05$). Carbon isotopic ratios showed the lowest value for liver (-17.99 ± 0.4 ‰), and increases in gonads, gills, red muscle and white muscle presented values up to -16.23 ± 0.09 ‰ for white muscle (see Figure 2). The same profile was observed for farmed fish.

3.3 Comparison between wild and farmed specimens

In general, tissues from farmed fish presented higher enrichment than wild fish (see Figures 2 and 3). Table 2 presents the differences between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of farmed and wild fish tissues. Nitrogen stable isotope ratios from farmed fish tissues presented mean enrichment of 1.5 ± 0.2 ‰ in comparison to wild specimens. For $\delta^{13}\text{C}$ values, the mean enrichment was 2.9 ± 0.4 ‰.

4 Discussion

Differences between wild and cultured fish have been studied by several authors focussing on biochemical composition (Youngston et al., 1991; Grigorakis et al., 2003; Glover et al., 2004) and lipophilic contaminants (Easton et al., 2002; Antunes and Gil, 2004). As well differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values have been found between wild and cultured fishes (Dempson and Power, 2004).

In our work, the effect of lipid extraction on stable isotope ratios was studied using wild and farmed specimens collected after spawning, when they exhibit high lipid contents. Results obtained show that lipid-free samples of tissues from wild fish presented carbon stable isotope values higher than untreated samples (Figure 2). This fact can be explained by the lower $\delta^{13}\text{C}$ values of lipids (Pinnegar and Pollunin, 1999), and has been pointed out by other authors in crustaceans and fish (Lorrain et al., 2002; Soritopoulos et al., 2004; Bodin et al., 2006). The differences observed ranged between 0.08 and 0.82 ‰ and were statistically significant for red muscle, liver and gill (Figure 2), the tissues with

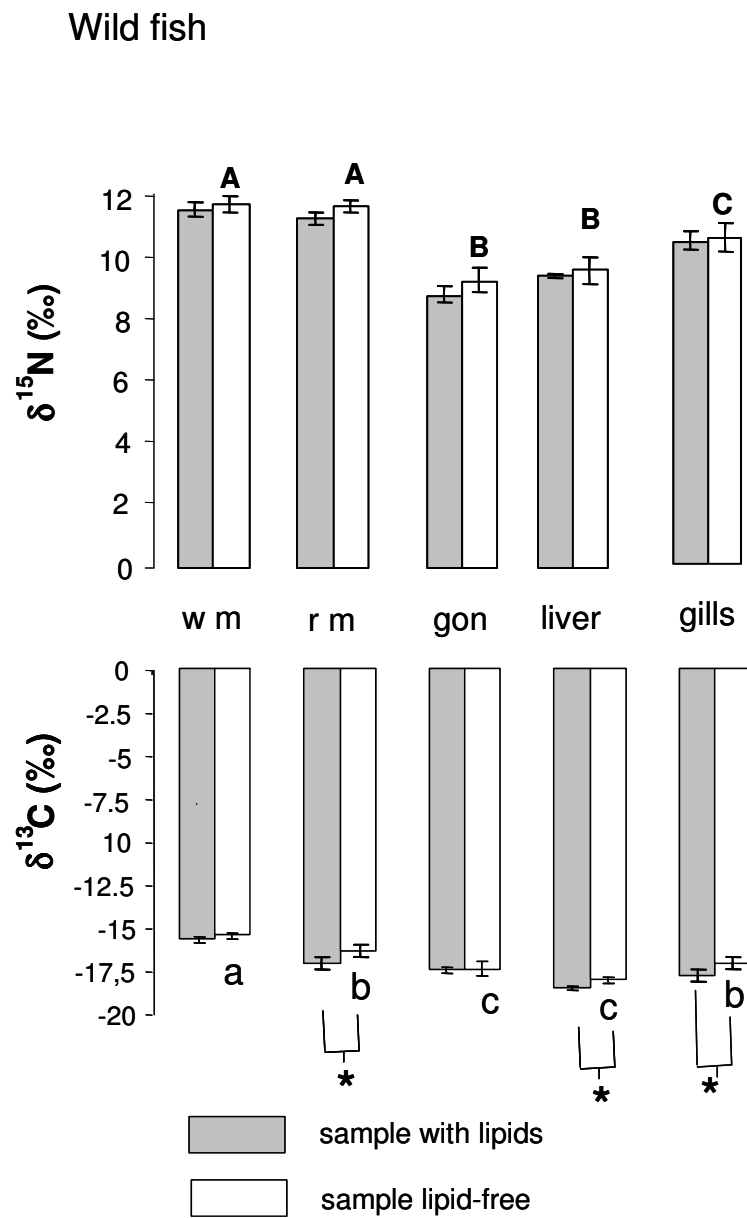
the highest lipid content (Table 1). Likewise, tissues from farmed fish exhibited high lipid contents, and this fact is reflected in the depletion of $\delta^{13}\text{C}$ values after lipid removal (Figure 3).

Table 1. Mean \pm standard deviation of lipid contents (% fresh weight basis) in the different tissues analysed from wild and farmed female specimens of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) collected in October (before spawning)

Tissue	Wild fish		Farmed fish	
	Mean	Standard deviation	Mean	Standard deviation
White muscle	1.03	0.06	3.3	0.5
Red muscle	4.0	0.4	16	2
Liver	5	2	24	2
Gills	10	2	19	2

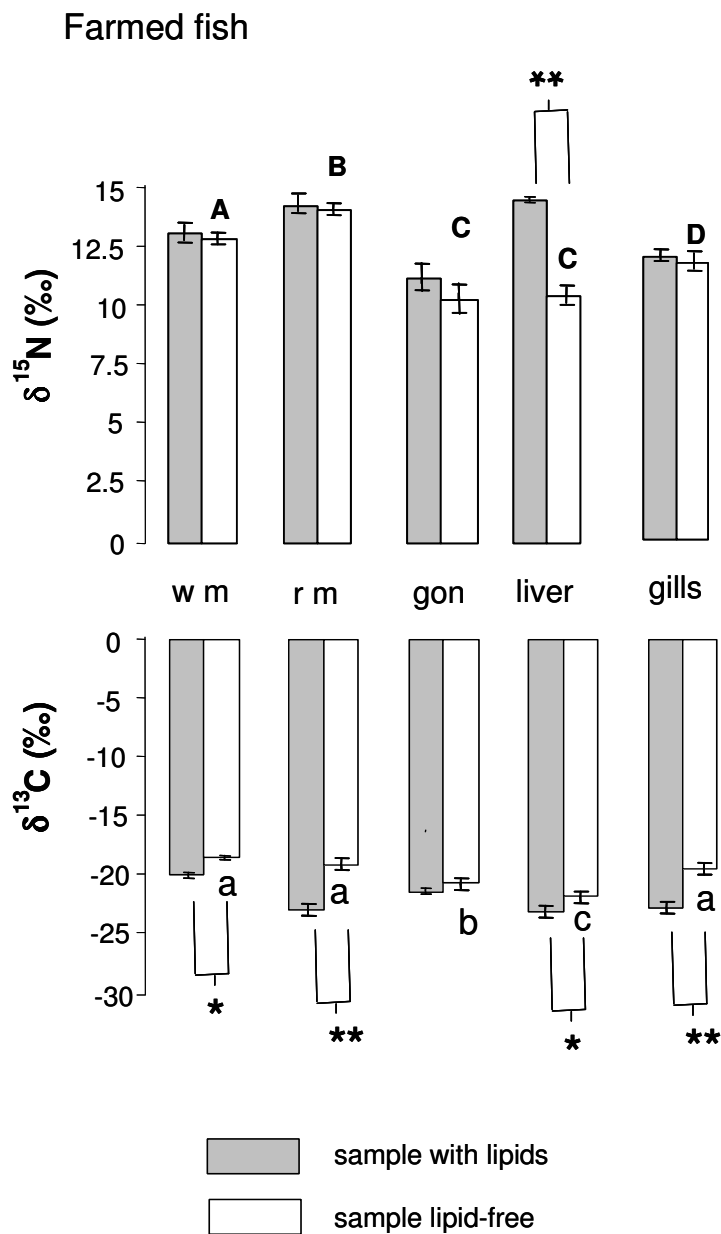
The effect of lipid extraction on $\delta^{15}\text{N}$ remains unclear due to few studies dealing with it and the inconclusive results obtained in marine organisms (Soritopoulos et al., 2004; Bodin et al., 2006; Sweeting et al., 2007).

No significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ values were determined in the tissues from wild specimens after lipids removal. Nevertheless, $\delta^{15}\text{N}$ values are affected by the very high amount of lipids in these samples, which could be attributed in this case to the leaching of proteins linked to lipids as a consequence of the extraction process (Soritopoulos et al., 2004). The extraction method applied was based on hexane reflux, commonly used (Serrano et al., 2003) and apparently should not affect protein fraction. In this case, the dependence of $\delta^{15}\text{N}$ to lipid extraction could be related to the unusual high levels of lipids found in farmed fish tissues.



*: $p < 0.05$ Student test; letters: $p < 0.05$ ANOVA, Scheffe's test

Figure 2. Stable nitrogen and carbon isotope ratios of white and red muscle, gonads, liver, and gills samples from wild gilthead sea bream, with and without lipid removal. Barrs represent \pm standard deviation.



*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ Student test; letters: $p < 0.05$ ANOVA, Scheffe's test

Figure 3. Stable nitrogen and carbon isotope ratios of white and red muscle, gonads, liver and gills samples from farmed gilthead sea bream, with and without lipid removal. Barrs represent \pm standard deviation.

In regards to fractionation of stable isotopes in wild fish tissues studied, $\delta^{13}\text{C}$ values for white muscle, the least fatty tissue, were the highest in both lipid-free and untreated tissue. Other tissues studied presented lower carbon isotope ratios and differed greatly in lipid content in comparison to white muscle. In teleosts, generally the liver serves as the storage depot and the red muscle lateral line stores more lipid than the dorsal muscle (Pinnegar and Pollunin, 1999). The results obtained in this paper for wild specimens are in accordance with this tissue lipid pattern.

As Pinnegar and Polunin (1999) have pointed out, $\delta^{13}\text{C}$ values observed in different fish tissues may be largely attributable to the relative abundance of lipids, since tissues differed greatly in lipid content. Isotopic enrichment also depends on tissue turnover rates, and can vary among a given organism's different tissues (Lorrain et al., 2002; Bodin et al., 2006).

Table 2. Enrichment values (mean \pm standard deviation in ‰) of carbon and nitrogen stable isotopic ratios ($\Delta\delta^{13}\text{C}$ and $\Delta\delta^{15}\text{N}$) in tissues from farmed female specimens of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by comparison with wild specimens

	Liver	White muscle	Red muscle	Gills	Gonads
$\Delta\delta^{13}\text{C}$	3.5 \pm 0.5	2.9 \pm 0.1	3.0 \pm 0.4	2.3 \pm 0.5	2.8 \pm 0.5
$\Delta\delta^{15}\text{N}$	1.3 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3	2.0 \pm 0.6	1.4 \pm 0.9	1.4 \pm 0.6

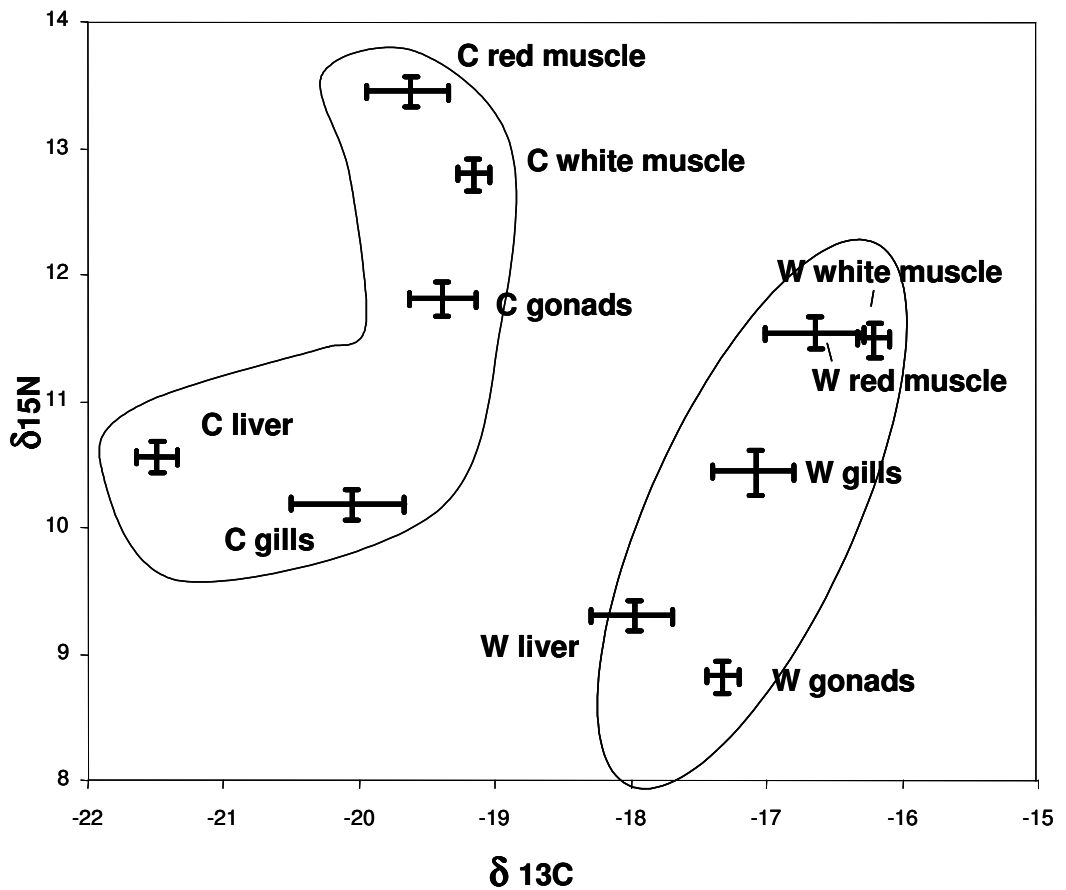
As can be seen, the special characteristics of samples from cultured fish make it necessary to take into account possible effects of very high lipid contents on the results obtained from samples with lipids. Nevertheless, in all cases the

stable isotope ratios discriminate clearly between wild and farmed fish, as can be observed in Figure 4. Enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ values for farmed fish tissues in respect to wild fish had a mean of 1.5 ± 0.2 ‰ for the different tissues analysed (Table 2). $\delta^{15}\text{N}$ values are assumed to be 3.0-3.4 ‰ per trophic level and unaffected by the size of animals or their environment (Minagawa and Wada, 1984; Serrano et al., 2003), thus providing a continuous measure of trophic position. Therefore, the difference observed between farmed and wild fish suggest the farmed fish have a higher position in the food chain compared to the wild population.

The feed used in the farms on the Western Spanish Mediterranean coast is made up of fish (clupeids or close families) landed on the South American coast (Chile, Peru). These fish are processed (chopped and dried) and mixed with fish oils to provide enrichment in essential fatty acids (mainly $\omega 3$). The characteristics of the feed fish supplied to farmed fish during their growth could explain the increase in their trophic level in respect to wild gilthead sea bream. Raw material for manufactured fish feed (fish meal and fish oil from pelagic oceanic species) comes from fish higher up the food chain than the usual prey of wild sea bream (mainly bivalves, echinoderms and crustaceans). This increases, in the view of the results, the $\delta^{15}\text{N}$ of farmed fish in comparison to wild specimens.

On the other hand, $\delta^{13}\text{C}$ of cultured fish showed a mean depletion of 2.9 ± 0.4 ‰ with respect to wild fish (Table 2). Stable carbon isotope signatures enrich by less than 1 ‰ per trophic level, and fractionation is often negligible (Vander Zanden and Rasmussen, 2001). As such, $\delta^{13}\text{C}$ values are more indicative of habitat or carbon source (Hecky and Hesslein, 1995). As discussed above for the nitrogen isotope, the cause of the difference between sea-cage reared fish and wild specimen's $\delta^{13}\text{C}$ values could be explained by the different source of carbon, based on South American oceanic fish species, in the diet of farmed fish, in

comparison to the natural prey of gilthead sea bream along the rocky shores of the western Mediterranean.



W: wild; C: culture; bars: standard deviation

Figure 4. Distribution of carbon and nitrogen stable isotope ratios (average, $n=6 \pm$ standard deviations) among wild and farmed fish tissues.

Besides the evident utility of the stable isotopes determination in ecology studies, other scientific areas as the aquaculture is a research branch that

nowadays increase the use of stable isotope studies to different applications, as the discrimination between wild and farmed specimens (Dempson and Power, 2004) and the study of the impact of cage culture to the environment (Dolenec et al, 2007). Likewise, the study of the environmental pollution uses the stable isotopes to define trophic levels and sources of carbon and nitrogen (Ruus et al, 2006).

As conclusions, first, we have found that relatively high lipid contents could affect the values of carbon and nitrogen isotope stable ratios. Results obtained from lipid-free samples showed that $\delta^{13}\text{C}$ of cultured fish tissues are lower than wild specimens ratios, as consequence probably to the different sources of carbon in the diet. Cultured gilthead sea bream tissues were significantly more enriched in nitrogen than wild in white muscle, indicating a slight increase in the trophic level. Determination of stable isotope signatures of gilthead sea bream tissues allows clear discrimination between wild and cultured sea bream, and characterisation of differences in diet and feeding conditions in any tissue studied.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using the isotope ratio mass spectrometer, Micromass Isoprime, and the elemental analyzer EuroEA 3000.

M.A. Blanes is very grateful to Generalitat Valenciana for his junior research contract.

References

- Antunes, P., Gil, O., 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria Aveiro, Portugal. *Chemosphere* 54, 1503-1507.
- Bodin, N., Le Loc'h, F., Hily, C., 2006. Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustaceans tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* doi: 10.1016/j.jembe.2006.09.008.
- Dempson, J.B.; Power, M., 2004. Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Ecol. Freshw. Fish* 13, 176-184.
- Dolenec, T., Lojen, S., Kniewald, G., Dolenec, M., Rogan, N., 2007. Nitrogen stable isotope composition as a tracer of fish farming in invertebrates *Aplysina aerophoba*, *Balanus perforatus* and *Anemonia sulcata* in central Adriatic. *Aquaculture* 262, 237-249.
- Easton, M.D.L., Luszniak, D., Von der Geest, E., 2002. Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed. *Chemosphere* 46, 1053-1074.
- Glover, K.A., Hamre, L.A., Skaala, O., Nilsen, F., 2004. A comparison of sea louse (*Lepeophtherius salmonis*) infection levels in farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks. *Aquaculture* 232, 41-52.
- Grigorakis, K., Taylor, K.D.A., Alexis, M.N., 2003. Organoleptic and volatile aroma compounds comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*): sensory differences and possible chemical basis. *Aquaculture* 225, 109-119.
- Guiguer, K.R.R.A., Reist, J.D., Power, M., Babaluk, J.A., 2002. Using stable isotopes to confirm the trophic ecology of Arctic charr morphotypes from Lake Hazen, Nunavut, Canada. *J. Fish Biol.* 60, 348-362.
- Hecky, R.E.; Hesslein, R.H., 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. *J. North American Benthol Soc.* 14, 631-653.

- Hemre, G.I., Sandness, K., 1999. Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquacult. Nutr.* 5, 9-16.
- Hillestad, M., Johnsen, F., Austreng, E., Asgard, T., 1998. Long-term effects of dietary fat level and feeding rate on growth, feed utilization and carcass quality of Atlantic salmon. *Aquacult. Nutr.* 4, 89-97.
- Iwama, G.K., 1991. Interactions between aquaculture and the environment. *Crit. Rev. Env. Contr.* 21, 177-216.
- Johansson, L., Kiessling, A., Asgard, T., Berglund, L., 1995. Effects of ration level in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum), on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition. *Aquacult. Nutr.* 1, 59-66.
- Lorrain, A., Paulet, Y-M., Chauvaud, L., Savoye, N, Donval, A, Saout, C., 2002. Differential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 275, 47-61.
- Michener, R.H.; Schell, D.M. 1994. Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha, K., Michener, R.H., (Eds). *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science*. Blackwell Scientific Publications. UK. pp138-157.
- Minagawa, M., Wada, E., 1984. Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 48, 1135-1140.
- Pinnegar, J.K., Polunin, N.V.C., 1999. Differential fractionation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ among fish tissues: implications for the study of trophic interactions. *Funct. Ecol.* 13, 225-231.
- Prescott, J., Bell, J.D., 1992. Sensory evaluation of Australian snapper (*Pagrus auratus*) raised in captivity. *Asian Food.* 7, 111-113.
- Ruus, A., Berge, J.A., Bergstad, O.A., Knutsen, J.A., Hylland, K., 2006. Disposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and

- polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in two Norwegian epibenthic marine food webs. *Chemosphere* 62, 1856-1868.
- Serrano, R., Simal-Julián, A., Pitarch, E., Hernández, F., Varó, I., Navarro, J.C., 2003. Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3375-3381.
- Smit, A.J., 2001. Source identification in Marine Ecosystems. In: Unkovich, M., Pate, J., McNeill, A., Jane Gibbs, D., (Eds). *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 219-245.
- Soritopoulos, M.A., Tonn, W.M., Wassenaar, L.I., 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecol. Freshw. Fish* 13, 155-160.
- Sweeting, C.J., Barry, J., Barnes, C., Polunin, N.V.C., Jennings, S., 2007. Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340, 1-10.
- Sylvia, G., Morrisey, M.T., Graham, T., Garcia, S., 1995. Organoleptic qualities of farmed and wild salmon. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 4, 51-64.
- Vander Zanden, M.J., Rasmussen, J.B., 2001. Variation in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ trophic fractionation: implications for aquatic food web studies. *Limnol. Oceanogr.* 46, 2061-2066.
- Vizzini, S.; Mazzola, A., 2004. Stable isotope evidence for the environmental impact of a land-based fish farm in the western Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 61-70.
- Webster, C.D., Tidwell, J.H., Goodgame, L.S., 1993. Growth, body composition and organoleptic evaluation of channel catfish fed diets containing different percentages of distillers' grains with solubles. *Prog. Fish-Cult.* 55, 95-100.

Wu, R.S.S., 1995. The environmental impact of marine fish culture: towards a sustainable future. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 159-166.

Youngson, A.F.; Martin, S.A.M.; Jordan, W.C.; Verspoor, E., 1991. Genetic protein variation in Atlantic salmon in Scotland: comparison of wild and farmed fish. *Aquaculture* 98, 231-242.

3.3 ARTICULO 4: *Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (Sparus aurata) and stable isotope characterization of the trophic chains.*

Roque Serrano, Miguel A. Blanes, Francisco J. López

Science of the total environment 389 (2008) 340-349

Author's personal copy

SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT 389 (2008) 340–349

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/scitotenv

Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and stable isotope characterization of the trophic chains

Roque Serrano*, Miguel A. Blanes, Francisco J. López

Research Institute for Pesticides and Water (IUPA). Avda Sos Baynat, s/n. University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2007

Received in revised form

14 September 2007

Accepted 14 September 2007

Available online 22 October 2007

Keywords:

Organochlorine compounds

Gilthead sea bream

Sparus aurata

Farmed fish

Wild fish

Stable isotopes

ABSTRACT

Organochlorine pollutants (pesticides and polychlorinated biphenyls) were analysed in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues (white muscle and liver) from the Western Mediterranean (Spain) and in their diets. Determination was carried out by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry after clean up of the fatty extracts by normal phase HPLC, with detection limits around 0.1 ng/g. Carbon and nitrogen stable isotope ratios were also determined in the samples.

Organochlorine compounds concentration was found to be uniform throughout the year in farmed fish, in both white muscle and liver. In contrast, wild fish showed contamination profiles that reflect environmental factors and the biological cycle. Although biomagnification factors for white muscle and liver were found to be 2.4 and 3.0, respectively for farmed fish, and 0.15 and 0.54 for wild specimens, wild fish presented higher levels of organochlorine contaminants than farmed fish.

Nitrogen stable isotopes determination in muscle from wild and farmed sea bream during the year gave us a profile related to the biological cycle. $\delta^{15}\text{N}$ mean values from farmed fish were 2.0‰ higher than from wild fish throughout the year that corresponding to close to one trophic step. $\delta^{13}\text{C}$ values were stable during the year, and also more enriched in the case of farmed fish.

The low levels of contaminants found in the feed supplied to farmed fish explain the organochlorine concentrations in their tissues which remain below wild fish, in spite of the intensive culture conditions and higher trophic level of cultured specimens.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, in the Western Mediterranean fish culture operates in parallel to traditional fisheries, as a consequence of the increase in fish consumption and decrease of wild stocks, remaining unchanged fisheries capacity. In this area, aquaculture activities are mainly focused on two species: gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

Both cultured and wild fish are important components of the Mediterranean diet.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) are non-polar, highly lipophilic and ubiquitous environmental pollutants. Both are classified as Persistent Organic Pollutants (POPs) and are present in the contamination pattern of marine environments world-wide (Hernández et al., 2000; Pandit et al., 2001; Hoelstra et al., 2003; Bocquenet

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387 358; fax: +34 964 387 368.

E-mail address: serrano@qfa.uji.es (R. Serrano).

URL: <http://www.iupa.uji.es> (R. Serrano).

Abstract

Organochlorine pollutants (pesticides and polychlorinated biphenyls) were analysed in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues (white muscle and liver) from the Western Mediterranean (Spain) and in their diets. Determination was carried out by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry after clean up of the fatty extracts by normal phase HPLC, with detection limits around 0.1 ng/g. Carbon and nitrogen stable isotope ratios were also determined in the samples.

Organochlorine compounds concentration was found to be uniform throughout the year in farmed fish, in both white muscle and liver. In contrast, wild fish showed contamination profiles that reflect environmental factors and the biological cycle. Although biomagnification factors for white muscle and liver were found to be 2.4 and 3.0, respectively for farmed fish, and 0.15 and 0.54 for wild specimens, wild fish presented higher levels of organochlorine contaminants than farmed fish.

Nitrogen stable isotopes determination in muscle from wild and farmed sea bream during the year gave us a profile related to the biological cycle. $\delta^{15}\text{N}$ mean values from farmed fish were 2.0‰ higher than from wild fish throughout the year that corresponding to close to one trophic step. $\delta^{13}\text{C}$ values were stable during the year, and also more enriched in the case of farmed fish.

The low levels of contaminants found in the feed supplied to farmed fish explain the organochlorine concentrations in their tissues which remain below wild fish, in spite of the intensive culture conditions and higher trophic level of cultured specimens.

Keywords: Organochlorine compounds; Gilthead sea bream; *Sparus aurata*; Farmed fish; Wild fish; Stable isotopes

1. Introduction

Currently, in the Western Mediterranean fish culture operates in parallel to traditional fisheries, as a consequence of the increase in fish consumption and decrease of wild stocks, remaining unchanged fisheries capacity. In this area, aquaculture activities are mainly focused on two species: gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Both cultured and wild fish are important components of the Mediterranean diet.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and organochlorine pesticides (OCPs) are non-polar, highly lipophilic and ubiquitous environmental pollutants. Both are classified as Persistent Organic Pollutants (POPs) and are present in the contamination pattern of marine environments world-wide (Hernández et al., 2000, Pandit et al., 2001, Hoekstra et al., 2003, Bocquené and Franco, 2005 and Yang et al., 2007). Organochlorine compounds are dangerous pollutants due to their potential toxicity and chemical stability, long biological half life and high liposolubility. This leads to high biomagnification in the food chain, and involves a wide range of trophic levels (Borga et al., 2001, Kidd et al., 2001, Serrano et al., 2003a, Hoekstra et al., 2003 and Bordajandi et al., 2006).

Fish consumption is a possible source of accumulation of organochlorine compounds (OCs) in humans. In fact, dietary intake, especially of marine organisms, is considered the most important source of OCs in humans (Bjerregard et al., 2001, Johansen et al., 2004 and Tsukino et al., 2006) and, as a consequence, OCs are frequently detected in human lipid tissues and fluids (Hernández et al.,

2002a, Hernández et al., 2002b, Hernández et al., 2002c, Pitarch et al., 2003, De Felip et al., 2004, Tsukino et al., 2006 and Muñoz de Toro et al., 2006).

Previous works have detected these pollutants in fish feed used in aquaculture and in cultured fish (Santerre et al., 2000, Easton et al., 2002, Serrano et al., 2003a, Hites et al., 2004, Antunes and Gil, 2004 and Maule et al., 2007). Specifically, fish feed used in fish production on the Spanish Mediterranean Coast has been analysed by Serrano et al. (2003a) who found DDTs and PCBs at the ng/g concentration level. Moreover, differences between the levels of pollutants in wild and farmed fish have been pointed out by several authors (Santerre et al., 2000, Antunes and Gil, 2004 and Serrano et al., submitted for publication). These differences have been attributed to the level of contaminants present in the diet and different feeding characteristics due to the intensive culture in the farms. Fish are cultured in sea-cages sited close to the coastline and a calculated amount of feed is supplied to ensure the maximum growth rate, which has as a consequence of increased tissues lipid content.

Stable isotope analysis represents a powerful tool to study trophic interactions (Michener and Schell, 1994, Smit, 2001, Guiguer et al., 2002 and Sweeting et al., 2007) and can be used to elucidate the different link interactions of the marine aquaculture trophic chain (Serrano et al., 2007). $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ provide information on the source of carbon in the diet and trophic position, assuming that a predator contains heavier isotopes than what it feeds on.

In the present study, we have determined the levels of PCBs and OCPs in liver and white muscle from wild and cultured sea bream from the Western Mediterranean region over one year. In addition, PCBs and OCPs in fish feed used in farms and natural diets (composed mainly by bivalves and crustaceans from Western Mediterranean shores) of gilthead sea bream have been determined

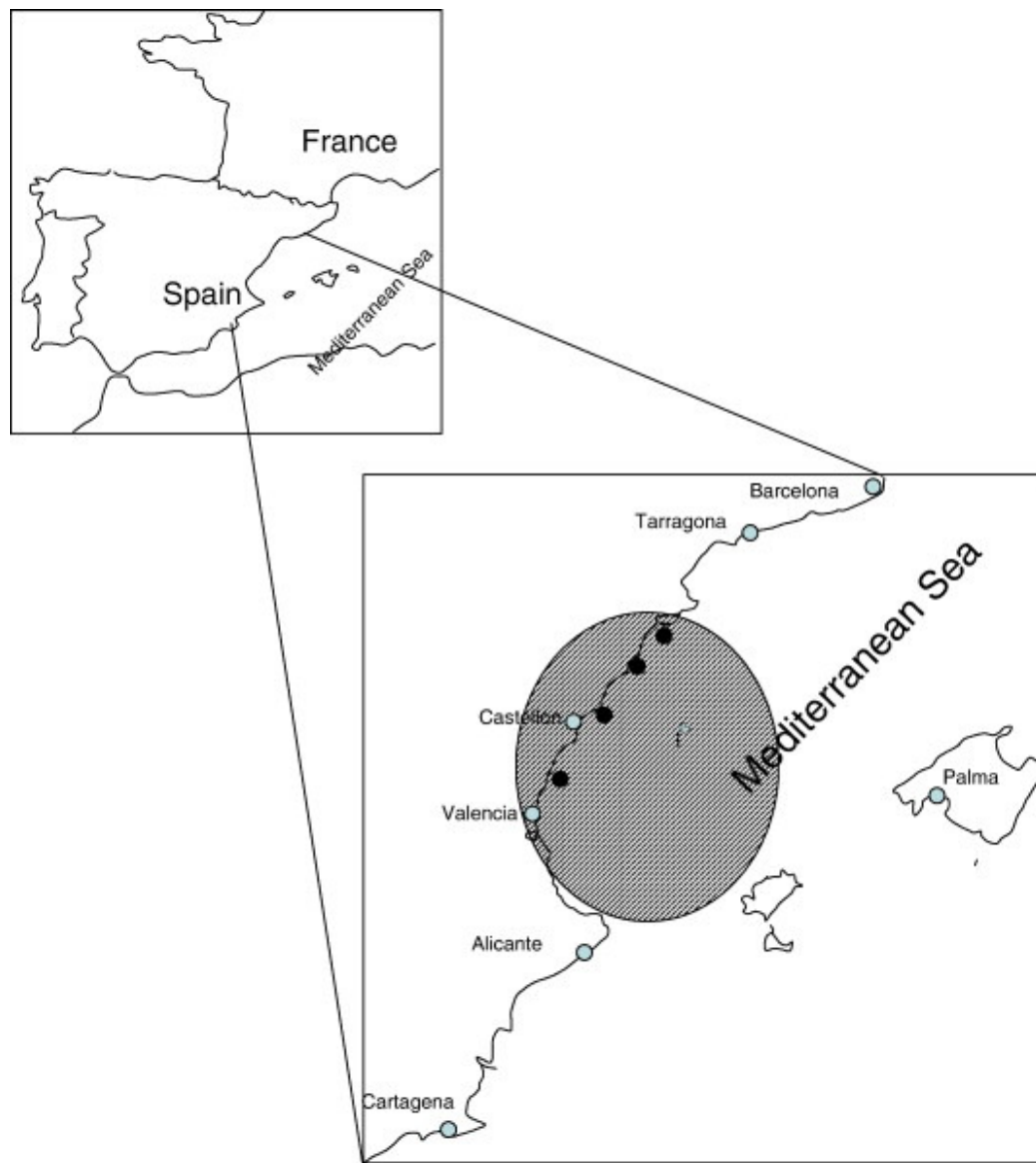
as well as the stable isotope ratios of carbon and nitrogen ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in white muscle samples from wild and farmed specimens of gilthead sea bream over the same period. Likewise, isotopic ratios for C and N were measured in fish feed and natural prey.

Biomagnification of organochlorine pollutants in aquaculture facilities has been studied and compared with the pollutant load present in wild specimens from the same area. Moreover, carbon and nitrogen stable isotope ratios have been studied to obtain information about the trophic position of farmed and wild fish, which could provide information about the possible effect of intensive culture on feeding features and on differential organochlorine accumulation.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Real world samples of wild and cultured gilthead sea bream (*S. aurata*) came from populations located off the Castellón Coast (Spanish Mediterranean Coast) (Fig. 1) either by trawl catch or from sea-cage farms located in the same area. They were purchased from local commercial markets in January, March, May, October and December 2005 (mean weight \pm standard deviation of wild specimens: 619 ± 91 g, length: 34 ± 1 cm; farmed specimens: 608 ± 40 g and 33 ± 1 cm). Collection of wild fish samples was not feasible during summer due to a voluntary prohibition on trawling in the area during this period. Samples of molluscs (*Donax trunculus*) and crustaceans (*Liocarcinus depurator*, *Squilla mantis*) collected in the study area were also purchased from the commercial markets. All the specimens were collected in the study area during October 2005.



● *Farms location*

Fig. 1. Area of sampling for wild and farmed fish.

Samples were dissected, the target tissues separated, and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Fish feed was obtained from batch supplies from fish farms sited in the study area during 2005. Homogenous composite samples (in triplicate) of each fish tissue studied were prepared from six individual specimens. These samples were analysed in quintuplicate for OCs. For the mollusc and crustaceans, triplicate composite samples of each specie (6–10 specimens for each sample) were analysed. Homogenised fish feed sample were analysed in triplicate. Stable isotope analyses were carried out in triplicate, after lipid extraction, for all samples.

2.2. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls analysis

OCs, including pesticides and derivatives (DDTs-*p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD-, HCB, heptachlor, heptachlor epoxide, lindane, mirex, metoxychlor, endosulfan (α and β isomers), endosulfan sulphate and endosulfan ether) and the PCBs usually used as indicators (IUPAC Nos. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) (Dr S. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Germany), were determined in fish feed, white muscle and liver, following the method described by Serrano et al. (2003b). This method was also applied to the analysis of the natural diet of Western Mediterranean sea bream composed mainly of bivalves and crustaceans inhabiting the ecosystem (*D. trunculus*, *L. depurator*, *S. mantis*).

In brief, extraction of muscle, liver, crustacean (whole body) and edible part of mollusc samples was carried out by refluxing ca. 8 g homogenised unfrozen sample in n-hexane during 4 h. Clean up of extracts was performed by HPLC by injecting 1 mL hexanic extract (4 g sample per mL) into an HPLC system using a silica-gel column. Analysis of the fat-free LC fractions collected was performed

by gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) using an ion trap mass analyzer.

The analytical method applied showed excellent sensitivity and selectivity as a consequence of the use of tandem mass spectrometry. It was satisfactorily validated by recovery experiments down to 5 ng/g. Lower spiked levels were not checked due to the presence of DDTs and PCBs in the “blank” samples and to the background levels found in all samples analysed. However, the powerful analytical characteristics of GC–MS/MS together with the efficiency of the HPLC clean up in removing fat, allowed us to detect the analytes at concentrations as low as 0.1 ng/g (estimated as limit of detection, except for endosulfan ether, 0.2 ng/g). The limit of quantification was estimated as three times the detection limit (i.e. nine times the background noise in the chromatograms), resulting in values of 0.3 ng/g, except for endosulfan ether (0.6 ng/g) (see Serrano et al., 2003b).

In regard to fish feed, an additional clean up step with concentrated sulphuric acid was required prior to normal phase HPLC clean up as a consequence of its high lipid content (around 20% fresh weight) (Serrano et al., 2003b). Therefore, only DDTs, mirex, heptachlor and PCBs were quantified in fish feed. Limits of detection were below 1 ng/g, except for heptachlor and *p,p'*-DDD. Analytes lost or destroyed in the acid treatment were analysed applying only normal phase HPLC clean up, with limits of detection around 10 ng/g, due to the lower amount of sample processed.

Quantification of analytes was carried out with external calibration, using the internal standard method. For this, 50 ng of isotopically labelled standards was added before extraction as surrogates, which will be use also for quality control. Labelled standards used were HCB-¹³C₆ (for the determination of HCB, lindane,

endosulfan ether, heptachlor, heptachlor epoxide, and α -endosulfan); *pp'*-DDE-D₈ (for DDTs, β -endosulfan, endosulfan sulfate, metoxychlor, and mirex), and PCB138-¹³C₁₂ (for PCBs) (Dr S. Ehrenstorfer, Promochem, Wesel, Germany).

Biomagnification factors (BMF) were calculated as the ratio between lipid-based concentrations of OCs in fish tissues and in the diets (Serrano et al., 2003a) using data obtained in October before spawning. Organochlorine load in sea bream natural diet was calculated as the mean of loads determined in each prey.

2.3. Isotopic analysis

Lipids were extracted from samples by refluxing ca. 8 g homogenised unfrozen sample in n-hexane for 4 h. Then, samples without lipids were dried at a constant temperature of approximately 50 °C for 48 h. The samples were ground to an ultra-fine powder using mill Super JS (Moulinex, France).

For stable isotope analysis, approximately 1 and 0.1 mg of lipid-free homogeneous material was weighed into 5 × 9 mm tin capsules for the determination of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$, respectively. Stable isotope ratios of carbon and nitrogen were determined using an Isotope ratio mass spectrometer Micromass Isoprime with an elemental analyzer EuroEA 3000.

Isotope ratios are expressed in conventional δ notation in per mil (‰) relative to universal standard:

$$\delta X_{\text{sample}} = \left[\left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right] \times 1000$$

All results are reported with respect to VPDB (cretaceous Vienna PeeDee Belemnite) for $\delta^{13}\text{C}$ and atmospheric nitrogen for $\delta^{15}\text{N}$. The analytical precisions were ± 0.20 and $\pm 0.25\%$ for nitrogen and carbon, estimated from the standards IAEA-N1 and USGS 24 (graphite) respectively, which were analysed together with the samples.

Enrichment values of carbon and nitrogen stable isotopic ratios were calculated as the difference between consumer and feed (cultured fish – fish feed and wild fish – natural preys).

2.4. Determination of fat

The total fat content in the sample extracts was determined gravimetrically after evaporation at 95 °C to constant weight.

2.5. Statistical analysis

Levels of organochlorine pesticides and PCBs in wild and farmed fish were compared by means of t-Student's test ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Concentrations of these pollutants during the year and $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data on seasonal stable isotopic composition were compared by means of ANOVA I and a posteriori Scheffe's test ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Homoscedasticity of variances was tested by means of Bartlett's test ($p < 0.05$). All the statistical tests were conducted using STATGRAPHICS Version 7.0 (Statistical Graphics Corporation).

3. Results

3.1. Organochlorine pesticides and PCBs

The analysis of fish feed used in fish farms during the study period gave us a mean total load of organochlorine pollutants of 12.0 ± 0.6 ng/g fresh weight (62.9 ± 0.9 ng/g lipid weight). The total load of organochlorine in natural sea bream prey (mean value of bivalve and crustacean contents) was found to be 10.3 ± 1.1 ng/g fresh weight (689 ± 7 ng/g lipid weight).

Fig. 2 shows the total load of organochlorines in white muscle and liver of farmed and wild specimens of sea bream. Differences in concentration levels and trends during the year can be observed. The organochlorine pollutants concentration in white muscle from wild fish presents a continuous increase from the lowest level in January to a maximum in October, before the spawning season. On the other hand, levels in farmed fish muscle remain almost constant throughout the year. As it can be observed, the pollutants load in white muscle is higher in wild specimens than in farmed fish in October (t-Student's test, $p < 0.01$). In contrast to the liver, the profile observed in white muscle is skewed to May, with the maximum of the year measured in this month. In this tissue, the content of organochlorine pollutants is, in general, higher than in farmed specimens, which exhibit a constant profile throughout the year as does the muscle tissue.

Table 1 shows the main ingredients and chemical composition of feed supplied to the farmed fish studied in this paper. As can be observed, fish oil and meal are included (30.15 g/kg) in fish feed used in Western Mediterranean farms.

Table 2 shows the total load of organochlorine contaminants in fish tissues, fish feed and natural preys in October, before spawning, when lipid content in fish

tissues is highest. Also shown are the biomagnification factors (BMF) calculated for white muscle and liver of cultured and wild fish. As can be observed, BMF are higher in cultured specimens than in wild fish. These results suggest that biomagnification of organochlorines from the diet is higher in farmed fish.

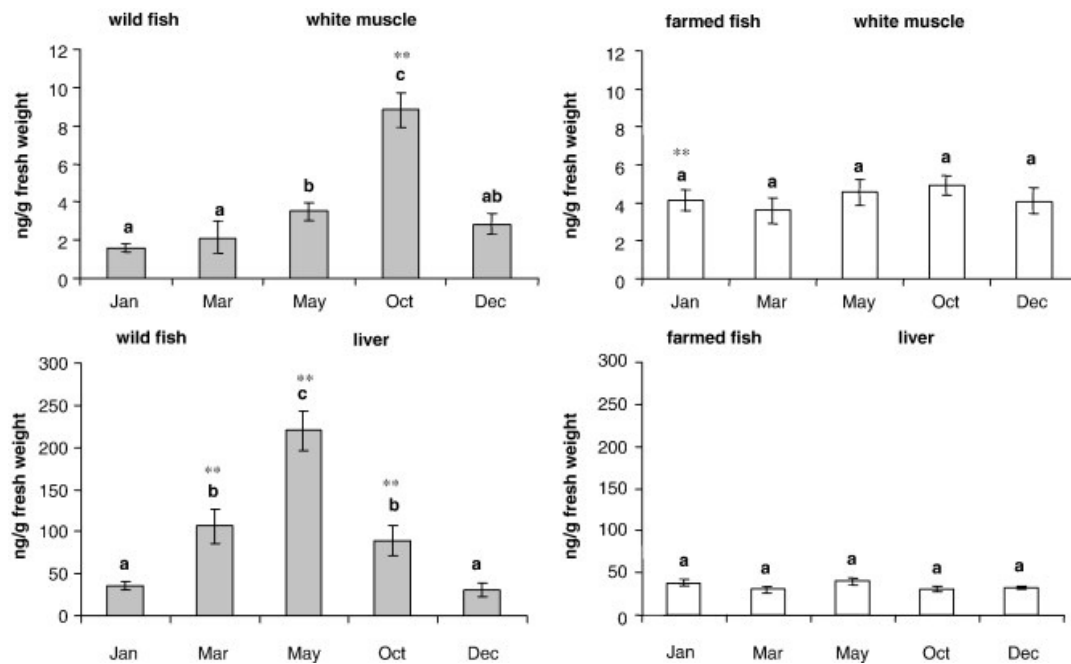


Fig. 2. Total load of organochlorine pollutants in white muscle and liver from farmed and wild fish gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during the year (mean \pm SD). **Differences between wild and farmed fish (t-Student's test, $p < 0.01$, $n = 3$). Letters: Differences between months (ANOVA I, Scheffe's test, $p < 0.05$, $n = 3$).

3.2. Stable isotopic composition

Results obtained for nitrogen isotopic composition in white muscle showed a continuous decrease for $\delta^{15}\text{N}$ values from January, with minimum values in May. This behaviour was similar for both wild and farmed specimens (Fig. 3 and Fig. 4).

On the other hand, $\delta^{13}\text{C}$ values obtained for white muscle in wild specimens remained constants, without any trend through the year (Fig. 3), whereas farmed specimens presented slightly lower $\delta^{13}\text{C}$ values in winter (Fig. 4).

In regard to $\delta^{13}\text{C}$ values, these remain constant in wild specimens during the year (Fig. 3). Farmed specimens present slightly lower $\delta^{13}\text{C}$ values in winter (Fig. 4).

Table 1. Main ingredients and chemical composition of feed supplied to farmed fish during the time of sampling

Ingredients	g/kg
Fish meal	15
Fish oil	15.15
Fish soluble protein	5
Corn gluten	40
Soybean meal	14.3
Extruded wheat	4
<hr/>	
Proximate composition	%
Dry matter (DM, %)	93.42
Protein	48.98
Fat	22.19
Ash	6.54

Table 2. Total load of organochlorine contaminants in fish tissues, fish feed and natural preys, and biomagnification factors of organochlorine compounds for white muscle and liver of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

	Farmed fish		Wild fish	
	Mean	CV	Mean	CV
	ng/g lipid weight	%	ng/g lipid weight	%
White muscle	152.3	13	104.4	12
Liver	190.3	10	372.3	11
Feed	Mean	CV	Mean	CV
	ng/g lipid weight	%	ng/g lipid weight	%
Fish feed	62.9	5		
<i>L. depurator</i>			1048.6	8
<i>S. mantis</i>			796.9	9
<i>D. trunculus</i>			220.7	8
Natural preys			688.7	62
BMF		CV		CV
		%		%
White muscle	2.4	14	0.15	63
Liver	3.0	11	0.54	65

BMF: Biomagnification factors calculated from October data.

CV: coefficient of variation.

Data from October (before spawning).

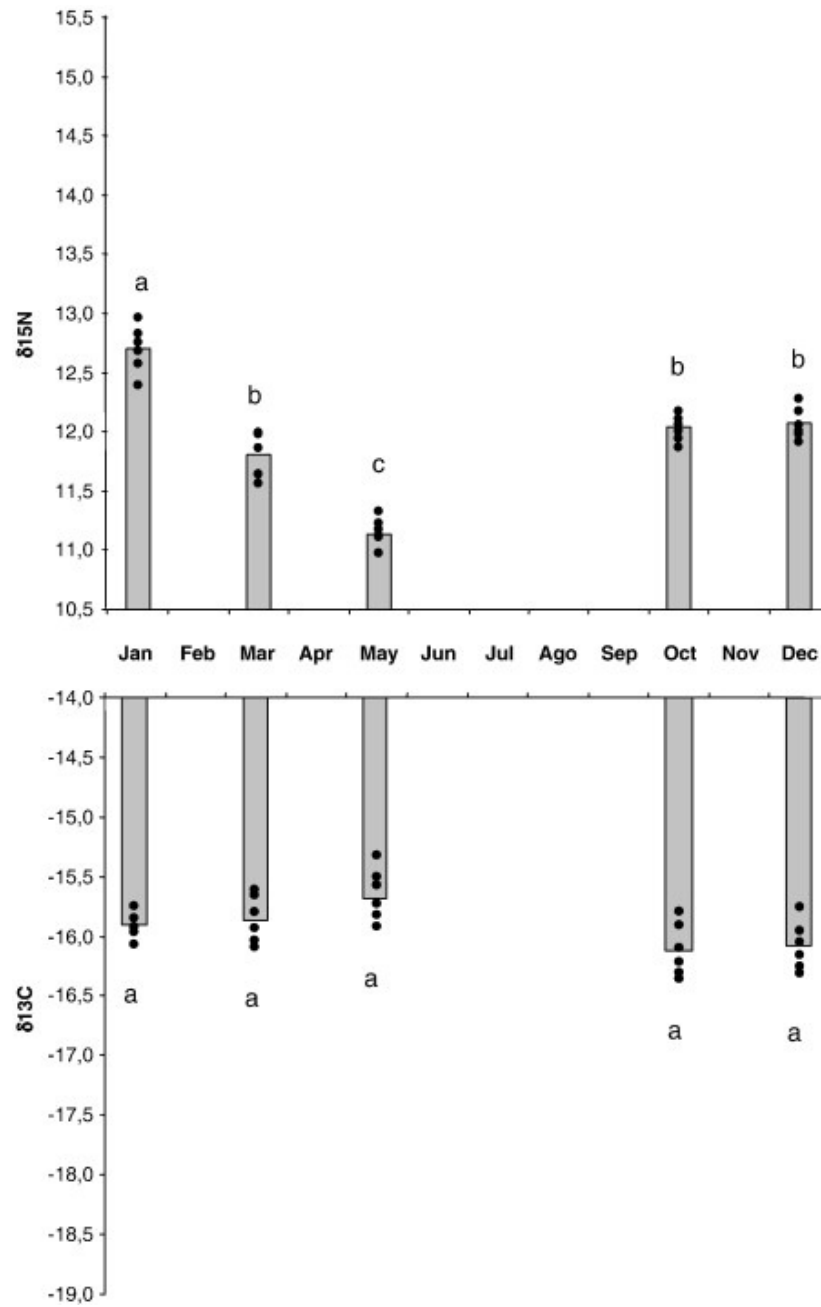


Fig. 3. Stable nitrogen and carbon isotope ratios of white muscle from wild fish during the year (mean \pm SD). Letters: Differences between months (ANOVA I, Scheffe's test, $p < 0.05$, $n = 6$).

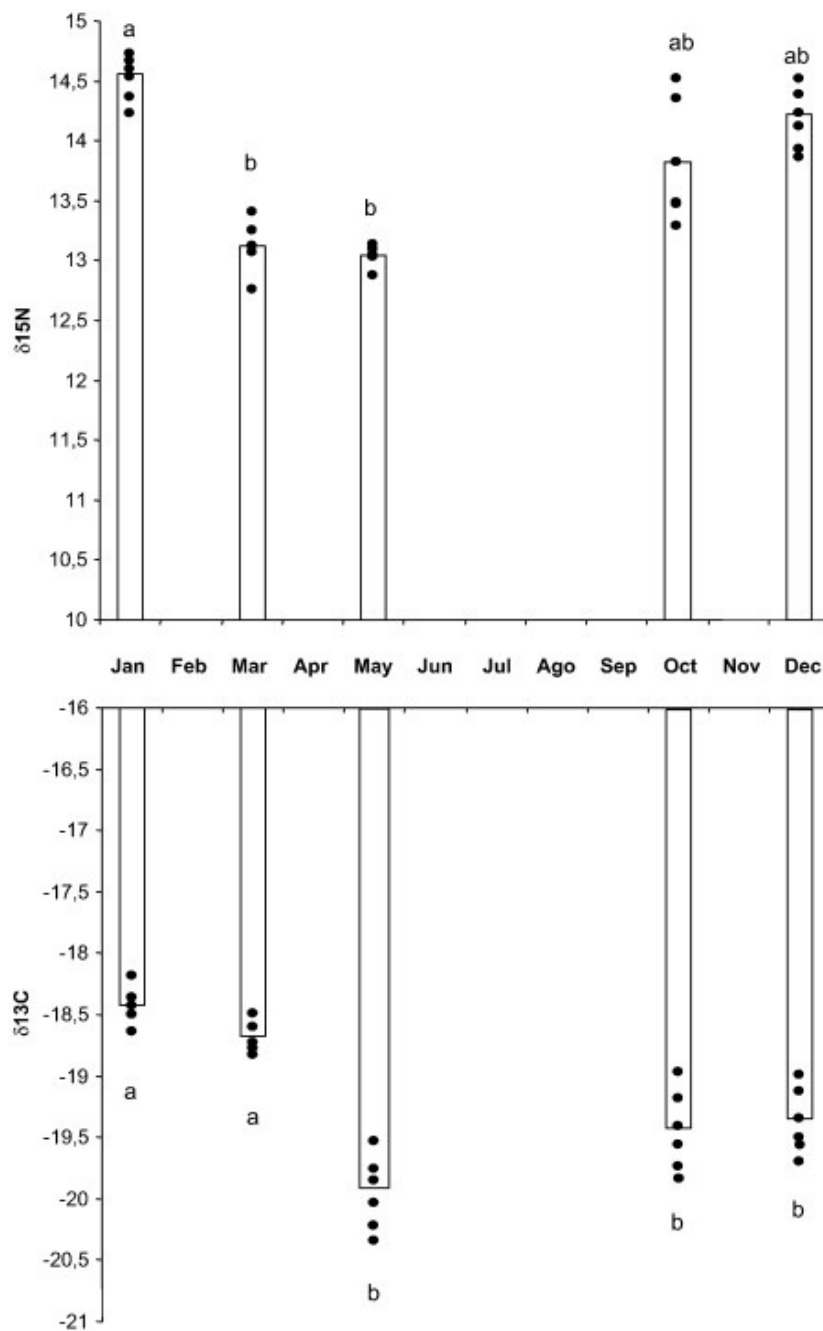


Fig. 4. Stable nitrogen and carbon isotope ratios of white muscle from farmed fish during the year (mean \pm SD). Letters: Differences between months (ANOVA I, Scheffe's test, $p < 0.05$, $n = 6$).

Fig. 5 shows the distribution of carbon and nitrogen stable isotope ratios in the diets and predators belonging to the different food chains studied (natural and aquaculture food chain). As it can be observed, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values clearly differentiate between farmed and wild specimens and their respective feed. Differences between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ average values for white muscle from farmed fish and feed fish were 3.3 ± 0.6 and 2.0 ± 0.5 .

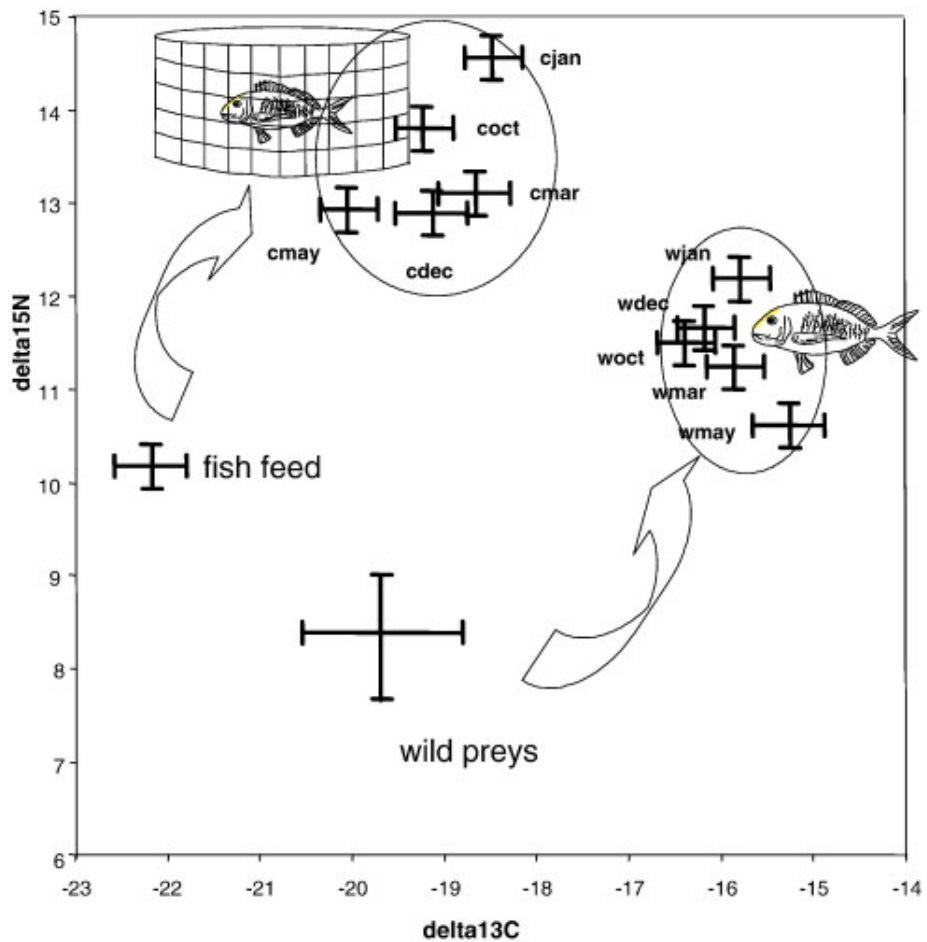


Fig. 5. Distribution of carbon and nitrogen stable isotope ratios (average, $n = 3 \pm$ standard deviations) among wild and farmed fish white muscle, fish feed and natural prey (bivalve and crustaceans).

Table 3 shows the carbon and nitrogen stable isotope ratios in fish tissues, fish feed and natural preys in October. Differences between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of fish and their diets are presented in Table 4.

Table 3. Carbon and nitrogen stable isotope ratios of fish tissues, fish feed and natural preys

	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	
	Mean	SD	Mean	SD
Wild fish muscle	-16.1	0.5	11.3	0.4
Farmed fish muscle	-19.5	0.4	13.9	0.5
Fish feed	-22.6	0.5	10.1	0.4
<i>L. depurator</i>	-20.1	0.5	8.2	0.3
<i>S. mantis</i>	-19.3	0.1	8.9	0.1
<i>D. trunculus</i>	-20.4	0.1	7.9	1.4
Mean preys	-19.9	0.6	8.3	0.5

Data from October.

Table 4. Enrichment values (mean \pm standard deviation in ‰) of carbon and nitrogen stable isotopic ratios ($\Delta\delta^{15}\text{N}$ and $\Delta\delta^{13}\text{C}$) in farmed and wild specimens of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in comparison to fish feed and natural prey, respectively (mean \pm SD)

	Wild fish — natural prey	Farmed fish — fish feed
$\Delta\delta^{15}\text{N}$	3.0 ± 0.9	3.8 ± 0.4
$\Delta\delta^{13}\text{C}$	3.8 ± 1.4	3.1 ± 0.6

4. Discusión

The presence of organochlorine pollutants in fish feed and natural preys leads to the accumulation of these compounds in the next link of the trophic chain, in both aquaculture and the natural food chain.

Farmed fish presented homogeneous organochlorine concentration during the year in white muscle and in liver (Fig. 2). This could be due to the continuous supply of food during the year on the farms, without any relation to the season. On the contrary, wild fish presented a contamination profile depending on environmental factors and on the biological cycle. Wild gilthead sea bream normally lives in a marine environment where temperatures range from 11 °C (winter) to 23 °C (late summer). On the Western Mediterranean coast, sea water temperature varies within that range. The uptake of food increases from winter to autumn when seawater temperatures increase. The most obvious effect of this increased food intake is the accumulation of lipids before the spawning season, and the risk of associated increased uptake of non-polar pollutants.

The results obtained show highest levels of contaminants in wild fish which coincide with the increase of sea water temperature, when the uptake of food is higher and fat is being stored in preparation for spawning. This fact results in wild fish presenting higher levels of organochlorine contaminants than farmed specimens in October before spawning.

Santerre et al. (2000) noticed a contrast in contaminant levels between aquaculture products and wild fish. The results of the analysis of farmed channel catfish, rainbow trout and red swamp crayfish from Southern USA revealed low levels or absence of OC, and results were below the concentration levels reported in wild fish. However, Easton et al. (2002) assessed the risk of the organochlorine contaminants in wild and farmed salmon, indicating higher levels of PCB and OC

in cultured fish as a consequence of the presence of these contaminants in fish feed. This fact has been confirmed in a recent study carried out by Hites et al. (2004), also suggesting the fish feed as the cause of the high levels of contaminants in farmed salmon, especially in Northern Europe. In these samples, the levels of organic compounds were higher than those found in farmed fish from North and South America.

The feed used in the culture of carnivorous fish is identified as the main source of persistent organic contaminants, a fact supported by the concentrations found in the samples analysed (up to 90 ng/g total PCBs), especially in Northern European farms (Hites et al., 2004). Possibly, the high concentrations found in this fish feed are a consequence of the high percentage of fish oil included and the load of contaminants presents in the raw material used in its manufacture.

In our case, fish feed supplied to farmed fish presented a total load of organochlorine analysed of 12 ng/g fresh weight. The reason for these low levels could be explained because fish feed used in Western Mediterranean farms are made from fish landed on the South American coast (Chile, Peru). As shown in our previous results on fish feed (Serrano et al., 2003a), manufactured feeds from South America fishing areas would result in low PCB and OCP content, and consequently in the final aquaculture product as well, as the main organochlorine input for farmed fish seems to be the diet. In fact, we have obtained data on the presence of organochlorine compounds in commercial fish feed batches of 2007 with similar composition to that shown in Table 1, manufactured with fish from South America, which confirm lower levels than others from Northern Atlantic (Serrano et al., unpublished data).

In regard to stable isotope determination, nitrogen stable isotopes ratios in muscle from wild and farmed sea bream during the year gave us a profile related

to the biological cycle. A clear decrease of $\delta^{15}\text{N}$ is observed in wild fish, probably associated with low food uptake after the winter. The $\delta^{15}\text{N}$ values recover higher levels when the sea water temperature increases after summer. This profile is more attenuated in the case of farmed fish (Fig. 3 and Fig. 4).

Isotopic enrichment also depends on tissue turnover rates, and can vary among a given organism's different tissues (Lorrain et al., 2002 and Bodin et al., 2007). In our case, $\delta^{15}\text{N}$ values for white muscle from gilthead sea bream can reflect the seasonal changes in feeding of this marine fish.

In regard to $\delta^{13}\text{C}$ values, they were stable throughout the year, as it can be expected in populations with a constant source of carbon in its diet as $\delta^{13}\text{C}$ is indicative of habitat or carbon source (Hecky and Hesslein, 1995).

In both cases, $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values were more enriched in farmed fish, as it has been pointed out by other authors (Dempson and Power, 2004 and Serrano et al., 2007).

$\delta^{15}\text{N}$ values from farmed and wild fish presented a mean difference of 2.0‰ during the year which corresponds with almost one trophic level, as variations between 2.5 and 3.5‰ are expected between prey and predator (Michener and Schell, 1994 and Sweeting et al., 2007).

BMF values calculated in cultured sea bream in this work are similar to those observed by Serrano et al. (2003a) for individual organochlorine compounds in cultured sea bass (0.9 to 3.4) (Table 1). In our case, the total organochlorines BMF presented in farmed and natural specimens were up to 3.0. It is remarkable that BMF values calculated from the data obtained for farmed fish show much higher biomagnification than in wild specimens. Moreover, $\delta^{15}\text{N}$ is 1‰ more enriched in the aquaculture food chain than in the natural one (Table 2).

Nevertheless, the low levels of contaminants in the feed supplied to farmed fish studied in this work (Table 2) result in the organochlorine concentrations in farmed fish being maintained below wild fish.

We hypothesise that as consequence of the higher trophic level of farmed fish, the biomagnification of organochlorine compounds should be higher. On the contrary, results show that organochlorine levels are higher in wild fish than in farmed one. This fact is the consequence of the very low levels of contaminants in the fish feed used, and although they are magnified in a higher degree than organochlorine levels in the natural prey, they remain below the levels reached in wild fish.

Fish feed used in aquaculture is a cause for concern because of the use of fish oils and meals, which could increase the load of lipophilic contaminants (European Commission, 2000). As a consequence, different ways to avoid the presence of these contaminants in fish feed has been tested, such as the substitution of fish oils with vegetal oils (Berntssen et al., 2005 and Benedito-Palos et al., 2007) or clean up during the production process. Such efforts have led to lower levels of contaminants in fish feed used currently in aquaculture activities, even to concentrations below those present in the natural preys.

The presence of OCs in natural gilthead sea bream populations could produce adverse effects for them, as has been reported in Atlantic salmon (Glover et al., 2007) and eel (Oliveira-Ribeiro et al., 2005). Moreover, bioaccumulation of these contaminants would be expected in higher trophic levels as has been stated by several authors (Borga et al., 2001, Kidd et al., 2001, Hoekstra et al., 2003 and Bordajandi et al., 2006)

In regard to $\delta^{13}\text{C}$, the cause of the difference between sea-cage cultured fish and wild specimens (3.2‰) could be explained by the different sources of carbon

in the diet of farmed fish which is based on oceanic fish species from South America, and the molluscs and crustaceans from rocky shores, the diet of the wild gilthead sea bream population considered in this study.

In conclusion, fish feed supplied in Western Mediterranean farms presents differential characteristics in respect to the natural diet of gilthead sea bream. $\delta^{15}\text{N}$ values suggest the location of fish feed in a higher trophic level than natural diet, which in turn provokes a higher trophic level of farmed fish than wild specimens. Likewise, BMF factors in fish tissues are very much higher in farmed fish. Although these characteristics would imply higher accumulation of lipophilic contaminants in farmed specimens, in the case of Mediterranean farms, the low levels of organochlorine compounds in the artificial diet lead to fish with an organochlorine total load lower than wild specimens.

In regard $\delta^{13}\text{C}$ values, they discriminate the different sources of carbon in the two diets studied, with origins in oceanic ecosystems from the Pacific (artificial diet), and the Mediterranean rocky shores (natural diet).

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for the use of the Isotope ratio mass spectrometer, Micromass Isoprime, and the elemental analyzer EuroEA 3000.

M.A. Blanes is very grateful to the Generalitat Valenciana for his junior research contract.

References

- Antunes and Gil, 2004 P. Antunes and O. Gil, PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria Aveiro, Portugal, *Chemosphere* 54 (2004), pp. 1503–1507.
- Benedito-Palos et al., 2007 L. Benedito-Palos, A. Saera-Vila, J.A. Calduch-Giner, S. Kaushik and J. Perez-Sanchez, Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis, *Aquaculture* 267 (2007), pp. 199–212.
- Berntssen et al., 2005 M.H.G. Berntssen, A.K. Lundebye and B.E. Torstensen, Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetal oil in the feed, *Aquac Nutr* 11 (2005), pp. 219–231.
- Bjerregard et al., 2001 P. Bjerregard, E. Dewailly, P. Ayotte, T. Parrs, L. Ferron and G.J. Mulvad, Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet, *Toxicol Environ Health* 62 (2001), pp. 69–81.
- Bodin et al., 2007 N. Bodin, F. Le Loc'h and C. Hily, Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustaceans tissues, *J Exp Biol Ecol* 341 (2007), pp. 168–175.
- Bordajandi et al., 2006 L.R. Bordajandi, I. Martin, E. Abad, J. Rivera and M.J. Gonzalez, Organochlorine compounds (PCBs, PCDDs and PCDFs) in sea fish and seafood from the Spanish Atlantic Southwest Coast, *Chemosphere* 64 (2006), pp. 1450–1457.
- Borga et al., 2001 K. Borga, G.W. Gabrielsen and J.U. Skaare, Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain, *Environ Pollut* 113 (2001), pp. 187–198.

- Bocquené and Franco, 2005 G. Bocquené and A. Franco, Pesticide contamination of the coastline of Martinique, *Mar Pollut Bull* 51 (2005), pp. 612–619.
- De Felip et al., 2004 E. De Felip, A. Di Domenico, R. Miniero and L. Silvestroni, Polychlorobiphenyls and other organochlorine compounds in human follicular fluid, *Chemosphere* 54 (2004), pp. 1445–1449.
- Dempson and Power, 2004 J.B. Dempson and M. Power, Use of stable isotopes to distinguish farmed from wild Atlantic salmon, *Salmo salar*, *Ecol Freshw Fish* 13 (2004), pp. 176–184.
- Easton et al., 2002 M.D.L. Easton, D. Luszniak and E. Von der Geest, Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed, *Chemosphere* 46 (2002), pp. 1053–1074.
- European Commission, 2000 European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the dioxin contamination of feedingstuffs and their contribution to the contamination of food of animal origin (2000) <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/outcome.en.html>.
- Glover et al., 2007 C.N. Glover, D. Petri, K.E. Tollefsen, N. Jorum, R.D. Handy and M.H.G. Berntssen, Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology, *Aquat Toxicol* 84 (2007), pp. 346–355.
- Guiguer et al., 2002 K.R.R.A. Guiguer, J.D. Reist, M. Power and J.A. Babaluk, Using stable isotopes to confirm the trophic ecology of Arctic charr morphotypes from Lake Hazen, Nunavut, Canada, *J Fish Biol* 60 (2002), pp. 348–362.
- Hecky and Hesslein, 1995 R.E. Hecky and R.H. Hesslein, Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis, *J North Am Benthol Soc* 14 (1995), pp. 631–653.
- Hernández et al., 2000 F. Hernández, R. Serrano, A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo and F.J. López, Persistent organochlorines and

- organophosphorus compounds and heavy metals in common whale (*Balaenoptera physalus*) from the western Mediterranean Sea, *Mar Pollut Bull* 40 (2000), pp. 426–433.
- Hernández et al., 2002a F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano, J. Gaspar and N. Olea, Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis, *J Anal Toxicol* 26 (2002), pp. 94–103.
- Hernández et al., 2002b F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano and C. Guerrero, Determination of organochlorine compounds in human adipose tissue using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia* 55 (2002), pp. 715–722.
- Hernández et al., 2002c F. Hernández, E. Pitarch, J. Beltran and F.J. López, Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood, *J Chromatogr B* 769 (2002), pp. 65–77.
- Hites et al., 2004 R.A. Hites, J.A. Foran, D.O. Carpenter, M.C. Hamilton, B.A. Knuth and S.J. Schwager, Global assessment of organic contaminants in farmed salmon, *Science* 303 (2004), pp. 226–229.
- Hoekstra et al., 2003 P.F. Hoekstra, T.M. O'Hara, A.T. Fisk, K. Borga, K.R. Solomon and D.C.G. Muir, Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort–Chukchi Sea, *Environ Pollut* 124 (2003), pp. 509–522.
- Johansen et al., 2004 P. Johansen, D. Muir, G. Asmund and F. Riget, Human exposure to contaminants in the traditional Greenland diet, *Sci Total Environ* 331 (2004), pp. 189–206.
- Kidd et al., 2001 K.A. Kidd, H.A. Bootsma, R.H. Hesslein, D.C.G. Muir and R.E. Hecky, Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food

- webs of Lake Malawi, east Africa: importance of trophic level and carbon source, *Environ Sci Technol* 35 (2001), pp. 14–20.
- Lorrain et al., 2002 A. Lorrain, Y.M. Paulet, L. Chauvaud, N. Savoye, A. Donval and C. Saout, Differential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology, *J Exp Mar Biol Ecol* 275 (2002), pp. 47–61.
- Maule et al., 2007 A.G. Maule, A.L. Gannam and J.W. Davis, Chemical contaminants in fish feeds used in federal salmonid hatcheries in the USA, *Chemosphere* 67 (2007), pp. 1308–1315.
- Michener and Schell, 1994 R.H. Michener and D.M. Schell, Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: K. Lajtha and R.H. Michener, Editors, *Stable isotopes in ecology and environmental science* (1994), pp. 138–157.
- Muñoz de Toro et al., 2006 M. Muñoz de Toro, H.R. Beldoménico, S.R. Garcia, C. Stoker, J.J. De Jesús and P.M. Beldoménico et al., Organochlorine levels in adipose tissue of woman from a littoral region of Argentina, *Environ Res* 102 (2006), pp. 107–112.
- Oliveira-Ribeiro et al., 2005 C.A. Oliveira-Ribeiro, Y. Vollaire, A. Sanchez-Chardi and H. Roche, Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France, *Aquat Toxicol* 74 (2005), pp. 53–69.
- Pandit et al., 2001 G.G. Pandit, A.M. Mohan Rao, S.K. Jha, T.M. Krishnamoorthy, S.P. Kale and K. Raghu et al., Monitoring of organochlorine pesticide residues in the Indian marine environment, *Chemosphere* 44 (2001), pp. 301–305.
- Pitarch et al., 2003 E. Pitarch, R. Serrano, F.J. López and F. Hernández, Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid phase extraction and gas

- chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 376 (2003), pp. 189–197.
- Santerre et al., 2000 C.R. Santerre, R. Ingram, G.W. Lewis, J.T. Davis, L.G. Lane and R.M. Grodner et al., Organochlorines, organophosphates and pyrethroids in channel catfish, rainbow trout, and red swamp crayfish from aquaculture facilities, *Food Chem Toxicol* 65 (2000), pp. 231–235.
- Serrano et al., 2003a R. Serrano, A. Simal-Julian, E. Pitarch, F. Hernández, I. Varo and J.C. Navarro, Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model, *Environ Sci Technol* 37 (2003), pp. 3375–3381.
- Serrano et al., 2003b R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch and F. Hernández, Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry, *J Sep Sci* 26 (2003), pp. 75–86.
- Serrano et al., 2007 R. Serrano, M.A. Blanes and L. Orero, Stable isotopes ratios of carbon and nitrogen in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) tissues from the western Mediterranean, *Chemosphere* 69 (2007), pp. 1075–1080.
- Serrano et al., submitted for publication Serrano, R., Barreda, M., Blanes, M.A. Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, submitted for publication.
- Smit, 2001 A.J. Smit, Source identification in marine ecosystems. In: M. Unkovich et al., Editors, *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems* (2001), pp. 219–245.

- Sweeting et al., 2007 C.J. Sweeting, J. Barry, C. Barnes, N.V.C. Polunin and S. Jennings, Effects of body size and environment on diet-tissue $\delta^{15}\text{N}$ fractionation in fishes, *J Exp Mar Biol Ecol* 340 (2007), pp. 1–10.
- Tsukino et al., 2006 H. Tsukino, T. Hanaoka, H. Sasaki, H. Motoyama, M. Hiroshima and T. Tanaka et al., Fish intake and serum levels of organochlorines among Japanese women, *Sci Total Environ* 359 (2006), pp. 90–100.
- Yang et al., 2007 R. Yang, T. Yao, B. Xu, G. Jiang and X. Xin, Accumulation features of organochlorine pesticides and heavy metals in fish from high mountain lakes and Lhasa River in the Tibetan Plateau, *Environ Int* 33 (2007), pp. 151–156.

3.4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La metodología desarrollada permite la determinación de los isótopos estables de carbono y nitrógeno en muestras de tejidos de peces. Estas muestras presentan unas características variables respecto a sus contenidos de agua y lípidos que condicionan el tratamiento inicial de las mismas. En el presente estudio, se ha determinado el efecto de la eliminación de los lípidos en la determinación de relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$) en muestras de tejidos de músculo blanco, músculo rojo, hígado, agallas y gónadas de doradas salvajes y cultivadas.

Las muestras analizadas tienen un rango muy amplio de porcentaje de lípidos (Tabla 1-**artículo 3**). Destaca la diferencia entre los tejidos de doradas salvajes y los de doradas cultivadas. Los resultados obtenidos para los tejidos antes y después de la eliminación de los lípidos, se muestran en las Figuras 2 y 3-**artículo 3**. La eliminación de los lípidos no afecta a la determinación de $\delta^{15}\text{N}$ salvo en el caso del hígado de las doradas cultivadas, mientras que el $\delta^{13}\text{C}$ muestra diferencias significativas en la mayoría de casos (Figuras 2 y 3-**artículo 3**).

Como se ha observado, la interferencia de los lípidos en la determinación de las relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno ($\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$), se han utilizado las muestras de tejidos libres de lípidos para elucidar las diferentes características de alimentación y tróficas entre los ejemplares salvajes y los cultivados.

La hipótesis de trabajo ha sido que las doradas cultivadas presentan relaciones alimentarias diferentes de las doradas salvajes. Estas diferencias pueden ser caracterizadas mediante las técnicas de análisis de isótopos estables,

que facilitan información sobre su posición en la red trófica y sobre las diferencias observadas entre ellos.

De esta forma, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los peces cultivados respecto de los peces salvajes muestran un incremento medio de $1.5\pm 0.2\text{‰}$ para los tejidos analizados (Tabla 2, **artículo 3**). Así pues, las diferencias observadas entre especímenes salvajes y cultivados sugieren que estos últimos se encuentran en una posición más alta en la cadena trófica, comparándolos con la población salvaje. Las características del pienso suministrado a los peces cultivados durante su crecimiento, puede explicar el aumento de nivel trófico respecto de las doradas salvajes. Las materias primas utilizadas para producir el pienso (harina de pescado y aceites de pescado de especies oceánicas) provienen de peces con posiciones en la red trófica superiores a las de las presas habituales de las doradas salvajes (principalmente bivalvos, equinodermos y crustáceos). Este es el motivo, conforme a los resultados, del incremento de $\delta^{15}\text{N}$ de los especímenes cultivados respecto de los salvajes.

Por otro lado, la $\delta^{13}\text{C}$ de las doradas cultivadas muestra una reducción media de $2.9\pm 0.4\text{‰}$ respecto de las doradas salvajes (Tabla 2, **artículo 3**). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ son indicativos del hábitat o de la fuente de carbono (Hecky y Hesslein 1995). Como se ha comentado para el caso de los isótopos de nitrógeno, las diferencias de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de las doradas salvajes respecto de las cultivadas, puede ser explicada en base a la diferente fuente de carbono, basada en especies oceánicas, en el caso de las doradas cultivadas, en comparación con las presas habituales de las doradas salvajes a lo largo de las costas rocosas del Mediterráneo occidental.

Consideradas de manera conjunta estas diferencias de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ entre ejemplares salvajes y cultivados se muestran en la Figura 4-**artículo 3**, observándose claramente las diferencias referidas.

Como ya se ha comentado, la determinación de isótopos estables se puede utilizar en el estudio de la contaminación ambiental para definir los niveles tróficos y los orígenes del nitrógeno y del carbono (Ruus et al., 2006).

Así pues, el método desarrollado de determinación de relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno se aplicó a una serie de muestras procedentes de acuicultura mediterránea, doradas cultivadas y el pienso utilizado en su cría; de igual forma se determinaron las relaciones de isótopos estables en muestras de doradas salvajes y en una serie de muestras de presas habituales de la dorada en libertad. A continuación se determinaron en las mismas muestras una serie de contaminantes organoclorados, mediante la metodología desarrollada por Serrano et al. (2003) para esta clase de muestras.

La técnica instrumental empleada para la determinación de los compuestos considerados (PCBs y DDTs) ha sido la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Dada la gran abundancia de lípidos en los tejidos analizados fueron necesarias etapas previas de extracción y purificación, debido a la incompatibilidad de los lípidos con el sistema cromatográfico.

Para maximizar la representatividad de los datos obtenidos, el muestreo se planteo a lo largo de un año evaluando así las posibles variaciones debidas al ciclo anual de la dorada.

Los resultados de los organoclorados encontrados en las muestras (Figura 2-**artículo 4**) muestran una variación en los niveles de organoclorados PCBs y DDTs encontrados en los tejidos estudiados de las doradas salvajes con un

máximo en músculo en el mes de octubre, coincidiendo con el mayor nivel de lípidos de ese momento. En el caso de las doradas cultivadas se observa un perfil en los niveles de organoclorados mucho más estable a lo largo del año. En octubre se determinaron los niveles de contaminantes organoclorados en muestras de pienso acuícola y en presas habituales de la dorada y con estos resultados junto con los correspondientes a las doradas salvajes y cultivadas se calcularon los factores de biomagnificación mostrados en la Tabla 2-**artículo 4**. Es de destacar los mayores factores de biomagnificación obtenidos para el caso de las doradas cultivadas. Pudiendo significar esto que, en el caso de las doradas cultivadas el proceso de biomagnificación tiene más rendimiento que en las doradas salvajes. Desconocemos si esto último está relacionado con una mayor eficacia en la alimentación de las doradas cultivadas, o más probablemente con una incompleta muestra de fuentes de alimento de las doradas salvajes.

Los resultados de las relaciones entre isótopos estables de nitrógeno muestran una cierta variación anual que podría estar relacionada con el ciclo biológico y la menor tasa de alimentación en primavera. En este sentido el perfil de las doradas cultivadas es más estable que el de las doradas salvajes. Respecto a los valores obtenidos para las relaciones de isótopos estables de carbono destaca una menor variación, no existiendo diferencia para los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de las doradas salvajes (Figura 3-**artículo 4**) y dado que $\delta^{13}\text{C}$ muestra la procedencia del carbono esto puede significar que tiene un origen muy similar a lo largo del año.

Cuando se estudian conjuntamente los resultados obtenidos de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ para las doradas salvajes y cultivadas y sus fuentes de alimento (Figura 5-**artículo 4**), se observa claramente que las doradas cultivadas están en un nivel trófico superior respecto de las salvajes. Este hecho está relacionado con el diferente origen del pienso ya comentado previamente y expuesto con detalle en el **artículo 4**. Se observa asimismo la posición relativa de las doradas cultivadas respecto del

pienso y de las doradas salvajes respecto de sus presas, resultando un esquema explicativo de las posiciones tróficas de las doradas salvajes y cultivadas en sus respectivas cadenas de alimentación.

3.5 REFERENCIAS

- Bodin N, Le Loc'h F, Hily C, 2006. Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustaceans tissues. *J Exp Mar Biol Ecol* 341:168-175.
- Darnaude AM, Salen-Picard Ch, Polunin NVC, Harmelin-Vivien ML, 2004. Trophodynamic linkage between river runoff and coastal fishery yield elucidated by stable isotope data in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Oecologia* 138:325-332
- Hecky RE, Hesslein RH, 1995. Contributions of benthic algae to lake food webs as revealed by stable isotope analysis. *J North American Benthol Soc* 14:631-653.
- Hoekstra PF, O'Hara TM, Fisk AT, Borga K, Solomon KR, Muir DCG 2003. Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort-Chukchi Seas. *Environ Pollut* 124:509-522
- Kaehler S, Pakhomov EA, McQuaid CD, 2000. Trophic structure of the marine food web at the Prince Edward Islands (Southern Ocean) determined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 208:13-20
- Kidd KA, Bootsma HA, Hesslein RH, Muir DCG, Hecky RE, 2001. Biomagnification of DDT through the benthic and pelagic food webs of Lake Malawi, east Africa: Importance of trophic level and carbon source. *Environ Sci Technol* 35:14-20
- Lorrain A, Paulet Y-M, Chauvaud L, Savoye N, Donval A, Saout C, 2002. Differential $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures among scallop tissues: implications for ecology and physiology. *J Exp Mar Biol Ecol* 275:47-61.
- Michener RH, Schell DM, 1994. Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. In: Lajtha, K., Michener, R.H., (Eds). *Stable Isotopes in Ecology*

- and Environmental Science. Blackwell Scientific Publications. UK. pp138-157.
- Naito W, Jin J, Kang YS, Yamamuro M, Manasuga S, Nakanishi J, 2003. Dynamics of PCDDs/DFs and coplanar-PCBs in an aquatic food chain of Tokyo Bay. *Chemosphere* 53:347-362.
- Ruus A, Berge JA, Bergstad OA, Knutsen JA, Hylland K, 2006. Disposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in two Norwegian epibenthic marine food webs. *Chemosphere* 62:1856-1868.
- Serrano R, Barreda M, Pitarch E, Hernández F, 2003. Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 26: 75-86
- Smit AJ, 2001. Source identification in Marine Ecosystems. In: Unkovich, M., Pate, J., McNeill, A., Jane Gibbs, D., (Eds). *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 219-245.
- Soritopoulos MA, Tonn WM, Wassenaar LI, 2004. Effects of lipid extraction on stable carbon and nitrogen isotope analyses of fish tissues: potential consequences for food web studies. *Ecol Freshw Fish* 13: 155-160.

CAPÍTULO 4:

DETERMINACIÓN DE PCBs COPLANARES (DIOXIN-LIKE PCBs) EN MUESTRAS PROCEDENTES DE ACUICULTURA MARINA.

4.1 Introducción

4.2 Artículo científico 5

Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls in fish feed and cultured fish fillets using liquid-liquid chromatography clean up and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry

4.3 Discusión de los resultados

4.4 Referencias

4.1 INTRODUCCIÓN

Las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas son un grupo de 75 isómeros estructurales relacionados (congéneres con diferentes índices de cloración), destacando la más conocida 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina o también llamada 2,3,7,8-TCDD. Basándonos en la toxicidad que presentan otros contaminantes, similar a la de la 2,3,7,8-TCDD, encontramos un variado grupo de compuestos aromáticos organoclorados identificados como compuestos análogos a las dioxinas (en adelante Dioxin-Like).

La mayoría de los compuestos Dioxin-Like pertenecen a los grupos de dibenzofuranos policlorados (PCDFs), bifenilos policlorados (PCBs), naftalenos policlorados (PCNs) y difenil-eter policlorados (PCDEs). Asimismo, algunas variantes bromadas o cloro-bromadas de estos compuestos también exhiben actividad Dioxin-Like (Gilpin et al. 2003).

Así pues, la pertenencia de un compuesto a la categoría Dioxin-Like está definida según un criterio biológico: producir un espectro similar de efectos tóxicos causados a su vez por un mecanismo común, el reconocimiento del compuesto Dioxin-Like por el receptor Ah (aril hidrocarbon).

La determinación analítica de los compuestos Dioxin-Like está condicionada por los bajos niveles de concentración a los que se encuentran estos compuestos, siendo esta circunstancia un gran condicionante que afecta al planteamiento del problema analítico, exigiendo técnicas de concentración y fraccionamiento específicas (van Leeuwen y de Boer 2008).

Como se ha expuesto previamente en capítulos anteriores los PCBs son compuestos organoclorados persistentes ampliamente utilizados en múltiples

aplicaciones y a lo largo del tiempo cantidades relevantes de los PCBs se han dispersado por diferentes compartimentos ambientales.

Considerando la estructura de los PCBs, algunos de los 209 posibles isómeros presentan un patrón de sustitución en los átomos de cloro que les permite adoptar una configuración coplanar y esta característica junto con las expuestas en el apartado sobre la toxicidad de los PCBs en el capítulo 1 (pag 22), posibilitan que estos compuestos presenten actividad toxicológica de tipo Dioxin-Like.

Esta particular actividad toxicológica es la responsable de que los PCBs Dioxin-Like, junto con todos los demás compuestos Dioxin-Like, sean contaminantes prioritarios. De esta forma se destinan muchos recursos, humanos y materiales, a la determinación, regulación legal de niveles y demás aspectos concernientes.

En este sentido, la presencia de PCBs Dioxin-Like es una problemática actual y la determinación de los niveles presentes de estos compuestos es una cuestión de gran relevancia.

Los PCBs Dioxin-Like están presentes en concentraciones extremadamente bajas comparadas con las de otros congéneres de PCBs (Martinez-Cored et al. 1999). Además, la posible presencia de una gran variedad de contaminantes orgánicos a niveles de concentración mucho más altos, dificulta la determinación analítica de estos compuestos haciendo necesaria la realización de etapas de purificación y fraccionamiento de alta eficiencia sobre los extractos, junto con una etapa de determinación instrumental de elevada sensibilidad y selectividad. El método de referencia “tradicional” era la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (GC-HRMS). Esta técnica permitía la determinación de los compuestos Dioxin-Like en alimentos a niveles de pg/g. La

GC-HRMS es una técnica cara que precisa de personal altamente cualificado y en consecuencia otras alternativas han sido exploradas en los últimos años. La espectrometría de masas basada en analizadores de trampa iónica (ITMS) se ha convertido en una alternativa razonable a la HRMS en el análisis de los PCBs Dioxin-Like y los PCDD/Fs (Malavia et al. 2004; Santos and Galceran 2003).

La acuicultura ha tenido en las últimas décadas un gran desarrollo motivado por el mayor consumo de pescado en el mundo y el descenso en la pesca extractiva. En este sentido es fundamental garantizar la seguridad alimentaria en el proceso de obtención de alimentos en la acuicultura. Investigaciones previas han detectado PCBs en el pienso acuícola y en el pescado cultivado (Santerre et al. 2000; Easton et al. 2002; Jacobs et al. 1997, 1998; Hilbert et al. 1998; Serrano et al. 2003 a; Hites et al. 2004, Maule et al. 2007, Pinto et al. 2008; Serrano et al. 2008 a, b). Por esta razón, es necesario el desarrollo de metodología económica, fiable y eficaz para la determinación de PCBs Dioxin-Like y PCDD-Fs.

La idoneidad de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tandem con detectores de trampa iónica para el análisis de PCBs Dioxin-Like en muestras de pescado ha sido corroborada por varios autores (Malavia et al. 2004; Bell et al. 2005).

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de metodología para el análisis de PCBs Dioxin-Like en productos de la acuicultura, incluyendo los piensos utilizados y los filetes de pescado obtenidos. El alto contenido en lípidos y la complejidad de las matrices estudiadas, hace necesario el estudio de la etapa de clean-up, con el objeto de eliminar la mayoría del contenido de grasa así como los compuestos interferentes presentes en las muestras. En este sentido, se ha estudiado la aplicación de LC-LC automatizada utilizando columnas de fase normal y grafito.

En concreto, el objetivo del artículo “*Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls in fish feed and cultured fish fillets using liquid-liquid chromatography clean up and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*” es desarrollar una metodología analítica que permita la determinación de PCBs Dioxin-Like en muestras procedentes de la acuicultura marina, proporcionando los niveles de sensibilidad y selectividad adecuados en cada caso.

4.2 ARTICULO 5: *Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls in fish feed and cultured fish fillets using liquid-liquid chromatography clean up and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry*

Miguel A. Blanes, Roque Serrano, Francisco J. López, Elena Serrano, Félix Hernández

Talanta (Submitted)

Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls in fish feed and cultured fish fillets using liquid-liquid chromatography clean up and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry

Miguel A. Blanes, Roque Serrano, Francisco J López, Elena Serrano, Félix Hernández*

Research Institute for Pesticides and Water (IUPA),

Avda Sos Baynat, University Jaume I, 12071 Castellón. Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34 964 387366; e-mail address: hernandf@qfa.uji.es

Abstract

In this paper, a method based on gas chromatography coupled to ion trap tandem mass spectrometry is developed for the determination of non-ortho and mono-ortho chlorinated biphenyls (dioxin-like PCBs) in fish feed and cultured fish fillets. After a reflux extraction in hexane, clean up of the extracts was carried out by acid digestion previous to normal phase liquid chromatography. The isolation of the different groups of PCBs, attending to the number of substitutions in ortho positions, was carried out by liquid chromatography using a hypercarb column. The efficacy of the clean up and fractionation treatments led to free fat extracts and avoid potential interferences in the quantification of the analytes. Precursor ions were isolated and voltages were optimized in order to obtain selective fragments for target compounds. The developed method was validated by means of recovery assays, three fortification levels were tested on fish feed (0.8, 0.2 and 0.02 ng/g) and fish fillet (0.4, 0.1 and 0.01 ng/g). Recoveries ranged from 65 to 116. Limits of detection were in the range 0.003-0.001 ng/g for non-ortho congeners and from 0.06 to 0.01 ng/g for mono-ortho PCBs. Precision varied in the different matrices and levels between 2 and 21%. Application to

real-world samples shows appreciable levels of dioxin like PCBs in fish muscle and fish feeds.

Keywords: polychlorinated biphenyls, dioxin-like, ion trap, fractionation, clean up

Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are persistent organic pollutants which have been used for a number of decades as a dielectric in transformers and capacitors, as plasticizers and as fire resistant liquid in closed systems. Due to their extreme resistance to biological and chemical degradation, they are globally distributed in all environmental compartments. Currently, PCBs are present in the contamination pattern of marine environments world-wide [1-6]. These compounds tend to accumulate in a wide range of biological samples and are bioaccumulated through the food web [6-8]. Some studies have shown that food is the main contributor for PCBs accumulation in farmed fish [9-11]. Fish consumption is a possible source of accumulation of PCBs and other organochlorine compounds in humans. In fact, dietary intake, especially of marine organisms, is considered the most important source of OCs in humans [12-17]. Therefore, OCs are frequently detected in human lipid tissues and fluids [15, 18-23].

Regarding to their chemical structure, some PCBs congeners present a chlorine substitution pattern that allows planar geometry. These kind of PCBs are called co-planar PCBs or non-ortho PCBs and show the same type of toxicity as 2, 3, 7, 8-polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs). Due to this toxic ability non-ortho, mono-ortho and for some Regulatory Agencies di-ortho- substituted congeners are known as dioxin-like PCBs (DL-PCBs) and

have been considered priority pollutants. The World Health Organization (WHO) has assigned a toxic equivalent factor (TEF) based on their toxicity related to 2, 3, 7, 8-TCDD, which is the most toxic congener [24-26].

Individual DL-PCBs are present in extremely low concentrations compared with the other PCBs congeners [27]. Moreover, the possible presence of a variety of organic contaminants at relatively high concentrations difficult the analytical determination of these compounds and both efficient clean up step and high selectivity and sensibility in the instrumental determination are required. Nowadays, gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS) as described in US EPA Method 1668 [28] is the method applied traditionally and it is considered the reference method for the accurate and specific determination of DL-PCBs in environmental and food samples with detection limits at $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ level. The GC-HRMS technique is expensive and qualified personnel are required. As consequence other alternatives has been investigated in the recent years. Mass spectrometry based on ion trap analyzers (ITMS) has become as the alternative to HRMS for the analysis of DL-PCBs and PCDD/Fs [29, 30].

Marine aquaculture has seen strong development in the last few decades as a consequence of increased fish consumption by the world population and decreasing wild stocks. Fish culture operates in parallel to traditional fisheries and nowadays both cultured and wild fish are important components of the Mediterranean diet.

Previous works have detected these pollutants in fish feed used in aquaculture and in cultured fish [6, 9, 31-38]. As the human population is at the top of the artificial food chain that arises from aquaculture activities (composed of

fish feed and farmed fish), a possible source of accumulation of OC in human beings exists [18, 19, 21, 22, 39-42].

Therefore, the development of economical, reliable and effective methods for the determination of DL-PCBs and PCDD-Fs, available for laboratories around the world, are required for the determination of DL-PCBs in marine aquaculture commodities.

The suitability of gas chromatography coupled with ion trap tandem mass spectrometry for the analysis of DL-PCBs in fish samples has been demonstrated for some authors [29, 30, 40-43].

The goal of the present research is to develop methodology for the determination of DL-PCBs in two marine aquaculture products presenting the most complex matrices; fish feeds and fillets from culture fish. The high fat content and the complexity of matrices considered makes necessary the optimization of the clean-up step, in order to eliminate most of the fat content and interfering compounds present in samples. Moreover, fractionation of analytes is performed in order to avoid potential interferences. In this way, the application of LC-LC automated clean up using normal phase and graphite phase columns allows to obtain the analytes separated in free fat fractions. Instrumental determination by gas chromatography coupled to ion trap mass analyzer was also studied and optimized. The GC-IT-MS/MS proposed method was validated statistically in our laboratory as certified reference materials are not available for the matrices studied.

Material and methods

Samples

Composite samples of fish feed were obtained pooling different commercial batches. Ingredients and approximate composition of fish feed are shown in Table 1.

Table 1. Ingredients and chemical composition of fish feed analyzed

Ingredient (%)	FO	33VO	66VO
Fish meal (CP 70%) ¹	15	15	15
CPSP 90 ²	5	5	5
Corn gluten	40	40	40
Soybean meal	14.3	14.3	14.3
Extruded wheat	4	4	4
Fish oil ³	15.15	10.15	5.15
Rapeseed oil	0	0.85	1.7
Linseed oil	0	2.9	5.8
Palm oil	0	1.25	2.5
Soya lecithin	1	1	1
Binder	1	1	1
Mineral premix ⁴	1	1	1
Vitamin premix ⁵	1	1	1
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	2	2	2
L-Lys	0.55	0.55	0.55
Proximate composition			
Dry matter (DM, %)	93.13	92.9	92.77
Protein (% DM)	53.2	52.81	52.62
Fat (% DM)	21.09	21	20.99
Ash (% DM)	6.52	6.69	6.57

¹Fish meal (Scandinavian LT)

²Fish soluble protein concentrate (Sopropêche, France)

³Fish oil (Sopropêche, France)

⁴Supplied the following (mg · kg diet⁻¹, except as noted): calcium carbonate (40% Ca) 2.15 g, magnesium hydroxide (60% Mg) 1.24 g, potassium chloride 0.9 g, ferric citrate 0.2 g, potassium iodine 4 mg, sodium chloride 0.4 g, calcium hydrogen phosphate 50 g, copper sulphate 0.3, zinc sulphate 40, cobalt sulphate 2, manganese sulphate 30, sodium selenite 0.3.

⁵Supplied the following (mg · kg diet⁻¹): retinyl acetate 2.58, DL-cholecalciferol 0.037, DL- α tocopheryl acetate 30, menadione sodium bisulphite 2.5, thiamin 7.5, riboflavin 15, pyridoxine 7.5, nicotinic acid 87.5, folic acid 2.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin B₁₂ 0.025, ascorbic acid 250, inositol 500, biotin 1.25 and choline chloride 500.

Composite samples of fish fillet were made with 15 specimens of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Both, samples of fish fillets and fish feed, were stored at -20 °C until analysis.

Chemicals

The PCB-Mix 41 standard from Dr Ehrenstorfer (10 ng/μL in iso-octane) containing DL-PCBs (IUPAC N° 77, 81, 118, 123, 114, 105, 126, 167, 156, 157, 169 and 189) and PCB-Mix 20 standard from Dr Ehrenstorfer (10 ng/μL in iso-octane) containing mixed solution of conventional PCBs and DL-PCBs (IUPAC N° 28, 31, 52, 77, 101, 105, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 169 170 and 180) were purchased from Scharlab (Barcelona Spain). The isotopically labelled [¹³C] congeners were used as internal standards and were purchased from Wellington Laboratories (Canada). Acetone, n-hexane, toluene and ethyl acetate, (ultratrace quality) and sulphuric acid (95-98%) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Anhydrous sodium sulphate for pesticide residue analysis (Scharlab, Barcelona, Spain) was dried for 18 h at 300°C before its use.

Liquid Chromatography

The LC automated clean up system was composed as follows: LC Pump: Master 305 5SC piston pump with 805 Manometric module from Gilson (Middleton, USA); valve: 6 way high-pressure valve VICI Valco (Europe Instruments, Schenkon, Switzerland), electronically controlled; sampler: injection valve Rheodyne (Cotati, CA, USA) with 1 mL loop; column: 150x3.9 mm in inner diameter packed with 4 μm silica Novapack (Waters, Mildford, MA, USA); fraction collector: Gilson FC 203B (Middleton, USA); mobile phases: n-hexane and ethyl acetate; flow rate 1 mL min⁻¹.

LC system for automated fractionation of PCBs was constructed with the following equipment: two LC Pumps: Master 305 5SC piston pump and slave 306 5SC piston pump, with 805 Manometric module and 811C dynamic mixer module, all from Gilson (Middleton, USA); valve: 6 way high-pressure valve VICI Valco (Europe Instruments, Schenk, Switzerland), electronically controlled; sampler: injection valve Rheodyne 7125 (Cotati, CA, USA) with 1 mL loop; column: 100x4.6 mm ID 5 μ m packed with HYPERCARB (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA); fraction collector: Gilson FC 203B (Middleton, MA, USA); Mobile phases: n-hexane and toluene, flow rate, direction and gradient composition are detailed in Table 2.

Table 2 Experimental conditions of LC system 2 used during fractionation of Dioxin-Like PCBs extract.

Min	Flow (mL/min)	Hexane (%)	Toluene (%)	Flow direction ¹
0	1	100	0	F
9	1			
10		100	0	
11	2,5			
18		60	40	
26		60	40	F
27		0	100	R
64		0	100	R
66		100	0	F
74	2,5			
78	1			
80	1	100	0	F

¹Flow direction: F= forward fluxe R=reverse fluxe

Gas Chromatography

GC-MS/MS analysis was performed using a 3800 gas chromatograph coupled to a 4000 mass spectrometer with 8400 autosampler module all from VARIAN (Palo Alto, CA, USA). ITMS operates in internal configuration with electron impact ionisation mode (EI), electron energy of 70 eV and emission current of 80 μA were selected. The injector temperature was set at 250°C. The column oven temperature was programmed as follows: 90°C for 0.5 min, 35°C min^{-1} to 190°C, 5°C min^{-1} to 270°C, 10°C min^{-1} to 300°C with a final isothermal of 5 min. Injection was carried out in splitless mode and analytes separation were performed using a fused silica capillary column (DB-5MS 30m x 0.25mm, 0.25 μm film thickness). Carrier gas was Helium at a flow of 1 mL min^{-1} .

Experimental mass spectrometer conditions were as follows: transfer line and trap temperatures were 275°C and 190°C, respectively, electron multiplier potential was 1950V. Target TIC of 10000 counts was used in Automatic gain control. Emission current was 80 μAmps . Precursor, extracted ions, wave form and excitation amplitude are indicated in Table 3.

Sample preparation and extraction

Samples were thawed at room temperature. Approximately 24 g of fish muscle or 12 g of fish feed previously chopped were homogenized in a mortar with the amount of anhydrous sodium sulphate necessary to remove water. Moreover, 20 ng of each the internal standards 2,3',4,4',5-Pentachloro [$^{13}\text{C}_{12}$] biphenyl and 3,3',4,4',5-Pentachloro [$^{13}\text{C}_{12}$] biphenyl, were added to the sample before extraction.

Table 3 Experimental conditions of the MS/MS method used for the determination of Dioxin-Like PCBs.

Compound	Rt (min)	Group	Precursor ion	Waveform	Excitation amplitude (volts)	Mass range	Q	q
PCB 81	10.50	1	292	Resonant	2.00	180-302	222	220
PCB 77	10.78	1	292	Resonant	2.00	180-302	222	220
PCB 123	11.42	2	326	Resonant	1.90	200-336	256	258
PCB 118	11.48	2	326	Resonant	1.90	200-336	256	258
PCB 118*	11.47	2	338	Resonant	2.25	240-348	268	270
PCB 114	11.80	3	326	Resonant	2.05	200-336	256	258
PCB 105	12.24	4	326	Resonant	2.10	200-336	256	258
PCB 126	13.20	5	326	Resonant	2.25	200-336	256	258
PCB 126*	13.19	5	338	Resonant	2.25	240-348	268	270
PCB 167	13.78	6	360	Resonant	2.50	220-370	290	292
PCB 156	14.48	7	360	Resonant	2.50	220-370	290	292
PCB 157	14.65	7	360	Resonant	2.50	220-370	290	292
PCB 169	15.64	8	360	Resonant	2.60	220-370	290	292
PCB 189	16.81	9	396	Resonant	2.65	250-406	326	324

Extraction was carried out by refluxing with 150 mL of *n*-hexane for 4 h. After filtration (0.45 μ m), the extracts were pre-concentrated using a Kuderna-Danish evaporation system until less than 5 mL remained (avoiding dryness) and the final extract was adjusted to 11 mL under a N₂ stream at 40°C with *n*-hexane. 1 mL was used to lipid gravimetric determination.

Clean up and fractionation

First, acid digestion was applied to the 10 mL extract remaining. Digestion was performed with 4 mL of concentrated sulphuric acid, by shaking for 3 min in a Vortex. Phases were separated by centrifugation. The operation was repeated three times. The hexanic phases obtained were combined and adjusted to 1 mL under a N₂ stream at 40°C.

The clean up was performed injecting 1 mL hexanic extract (obtained after acid digestion) into a LC system using a silica gel high-performance LC column. All of PCBs eluted between 0 and 12 minutes, so this fraction was adjusted to 1 mL under a N₂ stream at 40°C. More details on functioning of the automated LC system can be consulted in Serrano et al. [10]

For separation of poly-ortho, mono-ortho and no-ortho PCB congeners, resulting extract was injected in the LC system for fractionation using a porous graphite high performance LC column. The poly-ortho PCBs, mono-ortho PCBs and no-ortho PCB congeners eluted from 1 to 5 minutes, from 5.5 to 14 minutes and from 14 to 26 minutes respectively. The mono-ortho PCBs congener fraction was adjusted to 1 mL under a N₂ stream at 40°C with *n*-hexane and the no-ortho PCBs congeners fraction was adjusted to 0.1 mL under a N₂ stream at 40°C with *n*-hexane. The porous graphite high performance LC (HPLC) column was regenerated with 100% toluene in reversed flow.

GC determination

Analysis of the fractions containing mono-ortho and no-ortho PCB congeners was performed by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry, operating in internal configuration with electron impact ionisation mode (EI).

The internal standards 2,3',4,4',5-Pentachloro[¹³C₁₂]biphenyl and 3,3',4,4',5-Pentachloro[¹³C₁₂]biphenyl, isotopically [¹³C] labelled were used as surrogates. Quantification was performed by external calibration by means of internal standard method.

Dioxin Toxic Equivalents

For calculate dioxin-like toxicological activity of DL-PCBs (dioxin-like equivalents), Toxicity Equivalency Factors (TEF) referred to the activity of 2,3,7,8-TCDD were applied to transform concentrations of each congener [44].

Determination of fat content

The total fat content in the sample extracts was determined gravimetrically, evaporating 1 mL of extract at 95°C until constant weight.

Results and discussion

Extracts Clean-up and fractionation of analytes

Determination of organochlorine pollutants in fatty samples normally needs several clean up steps with the purpose of remove lipids, due to the incompatibility of lipids with gas chromatographic system. Our laboratory has an extended experience in the use of NPLC as clean up technique with excellent results [10, 18, 19]. In this study, methodology developed by Serrano et al. [10] has been applied to the clean up and fractionation of extracts obtained from fish feed and cultured fish fillet samples. The high complexity of matrices considered makes necessary an efficient clean up and fractionation, in order to obtain extracts that allow an adequate instrumental determination of DL-PCBs by means of ion-trap mass analyzer. In this way, our experience shows that the combination of acid digestion followed by NPLC chromatography allows the direct injection of

purified extract in GC system obtaining chromatograms with excellent S/N ratios leading to low limits of detection [10].

As consequence of the ultra-trace levels of no-ortho and some mono-ortho PCBs in environmental samples, it was necessary the isolation of the target pollutants from others non-target such as poly-ortho PCBs that may exist at higher concentrations and could interfere in its instrumental determination.

The separation properties of graphite are based upon interactions between the π -electronic density in graphite structure with the diaromatic system (π -electrons) of the biphenyls. These interactions are stronger with no-ortho PCBs (due to its capability of adopt planar configuration, maximizing π -interactions), than with mono-ortho PCBs, which have an intermediate interaction. On the other hand, this interaction is unappreciable for poly-ortho PCBs [26]. In this way, HYPERCARB column allows the separation of the PCBs in different fractions as a function of PCB ortho chlorine level by means of changing gradient composition.

The fractionation capability was tested injecting in HYPERCARB column a mix of PCBs with different degree of chlorination in ortho positions. The mix used contained PCBs IUPAC N° 28, 31, 52, 77, 101, 105, 118, 126, 128, 138, 153, 156, 169 170 and 180. Previous works have tested numerous composition gradients in order to achieve a complete separation of PCBs congeners [26, 45, 46]. After checking several gradients, it was found that conditions detailed at Table 2 were selected, allowing the complete separation of PCBs in three groups: poly-ortho, mono-ortho and non-ortho fractions. Figure 1 shows chromatograms obtained from the analysis of the different fractions corresponding to a fortified fish fillet sample.

Mass spectrometry optimisation

The ion trap mass spectrometer (ITMS) was operated in internal configuration with electron impact ionisation mode (EI). MS/MS detection was performed by isolation the parent ion for each PCB congener in the trap followed by application of an adequate excitation voltage for its subsequent fragmentation. Due to the special conditions of DL-PCBs with a higher stability than conventional PCBs congeners a resonant waveform was selected for fragmentation purposes. Precursor ion were selected from the EI spectra looking for high selectivity and higher m/z values and products ions were obtained scanning over a characteristic mass range. It is relevant to note that DL-PCBs have a characteristic loss of two chlorine atoms [24], in consequence one chlorine atom loss fragment is not observed.

In the MS/MS developed method, run are divided into nine acquisitions groups including all of the DL-PCBs and the two isotopically [$^{13}\text{C}_{12}$] equivalents for PCBs 118 and 126. All of the groups have one Scan Channel with the exception of groups 2 and 5 which contains additional Scan Channel for [$^{13}\text{C}_{12}$] PCBs 118 and 126.

Isolation and excitation conditions were optimised and selected in order to obtain characteristic MS/MS spectra with fragmentation patterns rich enough to allow the reliable identification of analytes. Most relevant parameters are detailed in Table 3.

Analytical parameters

The overall analytical procedure including reflux in n-hexane for PCBs extraction, evaporation by Kuderna-Danish, acid digestion, NPLC clean-up with silica column, fractionation step in graphite column and final determination by

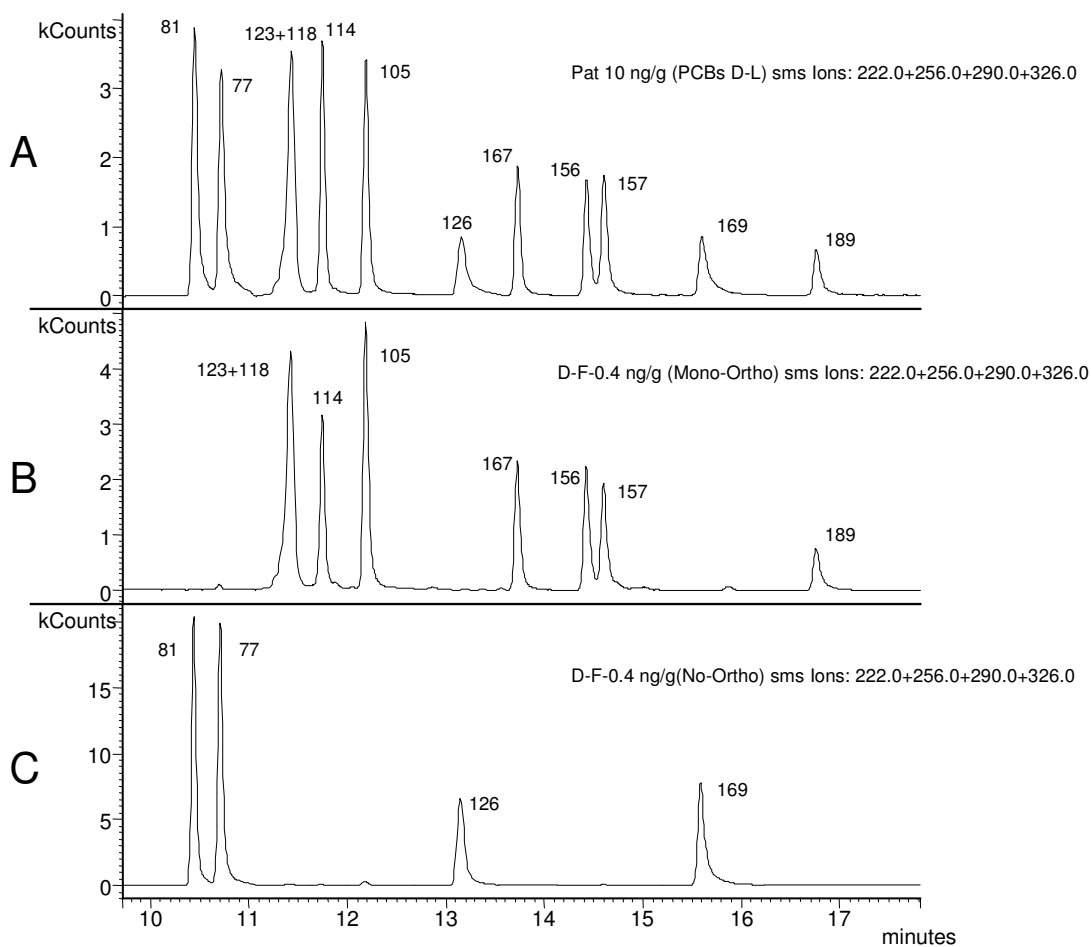


Figure 1 Composed chromatograms obtained as a sum of extracted ion chromatograms (MS/MS). **(A)** Dioxin-Like PCBs presents in the standard solution used for fortification of samples. Sum of extracted ion chromatograms (MS/MS) show mono-ortho **(B)** and no-ortho **(C)** congeners respectively, obtained from a fortified fish sample at level of 0,4 ng/g after analytical procedure.

GC/MS-MS (EI), was validated in terms of accuracy and precision showing satisfactory results by means of recovery experiments.

Analysis of five replicates at three fortification levels were carried out for each sample type: 0.4, 0.1 and 0.01 ng·g⁻¹ (fresh weight) and 0.8, 0.2 and 0.02 ng·g⁻¹ (fresh weight) for fish fillet samples and fish feed samples, respectively. Blank samples were analyzed (five replicates) in order to determine the presence of DL-PCBs in the samples used for validation. Table 4 shows quantitative recoveries for DL-PCBs at the three fortifications levels assayed. PCBs levels found in real samples are shown in Table 5 and as can be seen mono-ortho PCBs concentrations are higher than no-ortho PCBs levels. No-ortho PCBs 81 and 169 are non detected in samples as well mono-ortho PCB 114 are non detected in fish feed samples. Results for mono-ortho PCBs at lowest level have not been reported due to their high presence in real samples before fortification. In general, results obtained showed satisfactory recoveries between 80-120%.

Limits of detection were in the range 0.003-0.001 ng/g for non-ortho congeners and from 0.06 to 0.01 ng/g for mono-ortho PCBs. Precision varied in the different matrices and levels between 2 and 21%. Figure 2 shows chromatograms corresponding to no-ortho PCBs 77 and PCB 126 in a sample of fish feed, quantificated at 0.017 ng·g⁻¹ and 0.008 ng·g⁻¹, respectively. These values are averaged concentrations obtained from the five replicates analyzed.

Previous works attained comparable LOQs and LODs when GC-ITMS was used in DL-PCBs determination at marine samples [47, 48].

Table 6 shows Dioxin Toxic Equivalent (TEQ) attributed to Dioxin-Like PCBs present in real samples analysed. As can be observed, the methodology developed is capable to detect, confirm and quantified dioxin-like PCBs in real-world-samples.

Table 4 Mean recoveries (%) and relative standard deviation after application of the overall analytical process to five fortified fish muscle and fish feed samples. All concentrations are expressed in terms of fresh weight.

PCB	Fish muscle							
	0,4 ng g ⁻¹		0,1 ng g ⁻¹		0,01 ng g ⁻¹		LOQ	LOD
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	ng g ⁻¹	ng g ⁻¹
123+118	79	7	118	13	-	-	0,15	0,05
114	99	2	92	12	-	-	0,05	0,02
105	81	10	89	19	-	-	0,05	0,02
167	104	7	103	25	-	-	0,03	0,01
156	100	9	86	20	-	-	0,04	0,02
157	91	7	86	18	-	-	0,07	0,03
189	100	10	103	12	-	-	0,06	0,02
81	84	15	79	8	103	10	0,004	0,001
77	88	14	76	6	66	21	0,007	0,002
126	94	3	94	5	74	12	0,006	0,002
169	100	5	113	2	105	3	0,004	0,001

PCB	Fish feed							
	0,8 ng g ⁻¹		0,2 ng g ⁻¹		0,02 ng g ⁻¹		LOQ	LOD
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	ng g ⁻¹	ng g ⁻¹
123+118	87	4	84	17	-	-	0,20	0,06
114	101	4	104	6	-	-	0,05	0,02
105	91	3	75	7	-	-	0,06	0,02
167	106	4	99	15	-	-	0,05	0,02
156	103	6	83	15	-	-	0,05	0,02
157	95	8	77	15	-	-	0,07	0,03
189	101	12	116	7	-	-	0,05	0,02
81	85	8	87	7	103	13	0,008	0,002
77	91	11	85	8	65	12	0,009	0,003
126	93	6	98	8	78	6	0,005	0,002
169	102	6	101	3	111	5	0,005	0,002

Table 5 Concentrations of Dioxin-Like PCBs detected in real world samples of fish muscle and fish feed.

Blank samples concentration ng g ⁻¹	Fish muscle		Fish feed	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
PCB 123+118	0,66	18	0,63	12
PCB 114	d	-	nd	-
PCB 105	0,22	19	0,25	18
PCB 167	0,13	13	0,10	17
PCB 156	0,18	9	0,18	23
PCB 157	0,09	5	0,15	8
PCB 189	0,09	4	nd	-
PCB 81	nd	-	nd	-
PCB 77	0,012	17	0,017	9
PCB 126	0,007	25	0,008	5
PCB 169	nd	-	nd	-

d: detected, nd: non detected

As an example of quantification limits achieved, Figure 2 shows chromatograms corresponding no-ortho PCBs 77 and PCB 126 in a sample of fish feed, quantificated at 0.017 ng·g⁻¹ and 0.008 ng·g⁻¹ respectively. These values are averaged concentrations obtained from the five replicates analyzed. Table 6 shows Dioxin Toxic Equivalents (TEQ) attributed to Dioxin-Like PCBs, calculated by the sum of Toxicity Equivalency Factors (TEF) multiplied by concentrations of each Dioxin-Like PCBs.

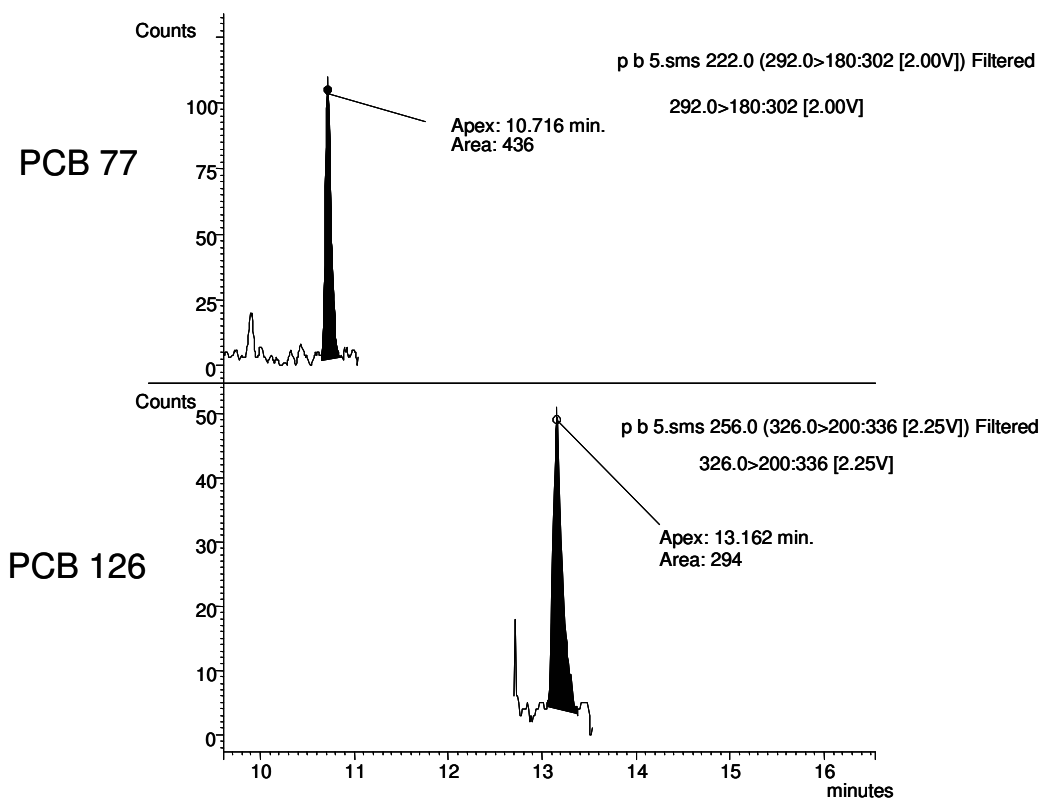


Figure 2 GC-MS/MS extracted ion chromatograms obtained from a non-fortified sample of fish feed, corresponding to Dioxin-Like PCBs 77 and 126 quantificated at 0.017 ng/g and 0.008 ng/g respectively.

Table 6 Dioxin Toxic Equivalents (TEQ) attributed to Dioxin-Like PCBs found in real world samples.

TEQ	Mean (pg/g)	RSD (%)
Fish muscle	0.93	25
Fish feed	1.06	6

References

- [1] F. Hernández, R. Serrano, A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo, F.J. López, *Mar. Pollut. Bull.* 40 (2000) 426–33.
- [2] G.G. Pandit, A.M. Mohan Rao, S.K. Jha, T.M. Krishnamoorthy, S.P. Kale, K. Raghu *Chemosphere* 44 (2001) 301-305.
- [3] P.F. Hoekstra, T.M. O'Hara, A.T. Fisk, K. Borga, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, *Environ. Pollut.* 124 (2003) 509–22.
- [4] G. Bocquené, A. Franco, *Mar. Pollut. Bull.* 51 (2005) 612–619.
- [5] R. Yang, T. Yao, B. Xu, G. Jiang, X. Xin, *Environ. Int.* 33 (2007) 151–156.
- [6] R. Serrano, M. Barreda, M.A. Blanes, *Mar. Pollut. Bull.* 56 (2008) 963-972.
- [7] R. Serrano, M.A. Blanes F.J. López, *Sci. Tot. Environ.* 389 (2008) 340-349.
- [8] G. Sagratini, M. Buccioni, C. Ciccarelli, P. Conti, G. Cristalli, D. Giardina, C. Lambertucci, G. Marucci, R. Volpini, S. Vittori, *Food Add. Contam.* 1 (2008) 69-77.
- [9] R. Serrano, A. Simal-Julian, E. Pitarch, F. Hernández, I. Varo, J.C. Navarro, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3375-3381.
- [10] R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch, F. Hernandez, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 75-86.
- [11] P. Antunes, O. Gil, *Chemosphere* 54 (2004) 1503-
- [12] EPA US Environmental Protection Agency. Washington DC (1999) Method 1668
- [13] P. Bjerregard, E. Dewailly, P. Ayotte, T. Parrs, L. Ferron, G.J. Mulvad, *Toxicol. Environ. Health* 62 (2001) 69-81.
- [14] P. Johansen, D. Muir, G. Asmund, F. Riget, *Sci. Tot. Environ.* 331 (2004) 189-206.
- [15] H. Tsukino, T. Hanaoka, H. Sasaki, H. Motoyama, M. Hirosima, T. Tanaka, *Sci. Tot. Environ.* 359 (2006) 90–100.

-
- [16] B. Naso, D. Perrone, M.C. Ferrante, M. Bilancione, A. Lucisano, *Sci. Tot. Environ.* 343 (2005) 83-95.
- [17] L.R. Bordajandi, I. Martin, E. Abad, J. Rivera, M.J. Gonzalez, *Chemosphere* 64 (2006) 1450-1457.
- [18] F. Hernández, E. Pitarch, J. Beltran, F.J. López, *J Chromatogr. B* 769 (2002) 65–77.
- [19] F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano, J. Gaspar, N. Olea, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 94–103.
- [20] F. Hernández, E. Pitarch, R. Serrano, C. Guerrero, *Chromatographia* 55 (2002) 715–722.
- [21] E. Pitarch, R. Serrano, F.J. López, F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 189–97.
- [22] E. De Felip, A. Di Domenico, R. Miniero, L. Silvestroni, *Chemosphere* 54 (2004) 1445-1449.
- [23] M. Muñoz de Toro, H.R. Beldoménico, S.R. Garcia, C. Stoker, J.J. De Jesús, P.M. Beldoménico, *Environ. Res.* 102 (2006) 107–112.
- [24] U.G. Ahlborg, G.C. Becking, L.S. Birnbaum, A. Brower, H.J.G.M. Derks, M. Feely, G. Golor, A. Nangerg, J.C. Larsen, A.K.D. Liem, S.H. Safe, C. Schlatter, N.F. Waern, M. Younes, E. Yrjanheikki, *Chemosphere* 28 (1994) 1049-1059.
- [25] M.V. Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feely, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.C. Larsen, F.X.R. Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern, T. Zacharewski, *Environ. Health Perspectives* 106 (1998) 775.
- [26] K. Lundgren, B. van Bavel, M. Tysklind, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 79-93.

- [27] M. Martínez-Cored, E. Pujadas, J. Díaz-Ferrero, M. Coll, R. Martí, F. Broto-Puig, F. Comellas, M.C. Rodríguez-Larena, Fresenius J. Anal. Chem. 364 (1999) 576-583.
- [28] EPA (1999) Method 1668: Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids and Tissue by HRGC/HRMS, Revision A, December 1999. US Environmental Protection Agency. Washington DC
- [29] J. Malavia, F.J. Santos, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 171-178.
- [30] F.J. Santos, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 125-151.
- [31] C.R. Santerre, R. Ingram, G.W. Lewis, J.T. Davis, L.G. Lane, R.M. Grodner, C-I .Wei, P.B. Bush, D.H. Xu, J. Shelton, E.G. Alley, J.M. Hinshaw, Food Chem. Toxicol. 65 (2000) 231-235.
- [32] M.D.L. Easton, D. Luszniak, E. Von der Geest, Chemosphere 46 (2002) 1053-1074.
- [33] R.A. Hites, J.A. Foran, D.O. Carpenter, M.C. Hamilton, B.A. Knuth, S.J. Schwager, Science 303 (2004) 226-229.
- [34] A.G. Maule, A.L. Gannam, J.W. Davis, Chemosphere 67 (2007) 1308-1315.
- [35] B. Pinto, S.L. Garritano, R. Cristofani, G. Ortaggi, A. Giulliano, R. Amodio-Cocchieri, T. Cirillo, M. De Giusti, A. Boccia, D. Reali, Environ. Monitor. Assess. 144 (2008) 445-453.
- [36] M. Porta, N. Malats, M. Jarrod, J.O. Grimalt, J. Rifá, A. Carrato, L. Guarner, A. Salas, M. Santiago-Silva, J.M. Corominas, M. Andreu, F.X. Real, The Lancet 354 (2000) 21-25.
- [37] S. Cruz, C. Lino, M.I. Silveira, Sci. Tot. Environ. 317 (2003) 23-35.
- [38] S. De Saeger, H. Sergeant, M. Piette, N. Bruneel, W. Van de Voorde, C. Van Peteghem, Chemosphere 58 (2005) 953-960.
- [39] B.W. Withcomb, E.F. Schisterman, G.M. Buck, J.M. Weiner, H. Greicerstein, P.J. Kostiniak, Environ. Toxicol. Pharmacol. 19 (2005) 203-213.

- [40] J.G. Bell, F. McGhee, J.R. Dick, D.R. Tocher, *Aquaculture* 243 (2005) 305-314.
- [41] M.N. Jacobs, D. Santillo, P.A. Johnston, C.L. Wyatt, M.C. French, *Chemosphere*. 37 (1998) 1709-1721.
- [42] M.N. Jacobs, P.A. Johnston, C.L. Wyatt, D. Santillo, M.C. French, *Int. J. Environ. Pollut.* 8 (1997) 74-93.
- [43] G. Hilbert, L. Lillemark, S. Balchen, C.S. Hojskov, *Chemosphere* 37 (1998) 1241-1252.
- [44] EU Commission Regulation (EC) No 1881/2006
- [45] K.R. Echols, R.W. Gale, K. Feltz, J. O'Laughlin, D.E. Tillit, T.R. Schwartz, *J.Chromatogr. A* 811 (1998) 135-144.
- [46] S. Chu, CH-S. Hong, B.A. Rattner, P.C. McGowan, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1058-1066.
- [47] D. Wang, S. Atkinson, A. Hoover-Miller, Q. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1815-1821.
- [48] S. Verenitch, A. deBruyn, M. Ikonomou, A. Mazumder, *J. Chromatogr. A.* 1142 (2007) 199-208.

4.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El objetivo del trabajo expuesto fue establecer una metodología analítica para la determinación de Dioxin-Like PCBs. La técnica instrumental empleada para la determinación de los compuestos considerados fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tandem utilizando un detector de trampa iónica.

Dados los bajos niveles en los que se encuentran los PCBs Dioxin-Like, muy por debajo del ng/g, y la gran abundancia de lípidos en las matrices analizadas, fue necesario aplicar sucesivas etapas de extracción, purificación y fraccionamiento de los extractos, basadas en parte en los conocimientos previos, (Hernández et al 2002a, 2002b; Serrano et al. 2003b). Quedando por resolver el fraccionamiento de los PCBs en los diferentes grupos según el número de sustituyentes cloro en la posición *orto*.

La opción elegida para llevar a cabo el fraccionamiento de los PCBs y conseguir el aislamiento de los Dioxin-Like PCBs del resto de los congéneres ha sido la cromatografía líquida en una columna de grafito. Las propiedades de separación de esta columna radican en las interacciones entre la densidad electrónica del sistema π -electrónico de la estructura del grafito con el sistema diaromático (electrones π) de los bifenilos. Esta interacción π - π es máxima para los *no-orto* PCBs, ya que pueden adoptar una configuración coplanar, es intermedia en intensidad para los *mono-orto* PCBs e inexistente para los *poli-orto* PCBs. De esta forma la columna de grafito utilizada permite separar los PCBs en diferentes fracciones en función del número de átomos de cloro en posición *orto* en el bifenilo, la Tabla 2 (**artículo 5**) muestra el resultado de la metodología de fraccionamiento propuesta. Asimismo, la Figura 1 (**artículo 5**) muestra los

cromatogramas obtenidos del análisis de las diferentes fracciones obtenidas del fraccionamiento en columna de grafito.

La determinación de los Dioxin-Like PCBs se realizó mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con detector de trampa iónica, utilizando impacto electrónico como técnica de ionización y operando en configuración de ionización interna. El método de MS/MS desarrollado, descrito con detalle en el **artículo 5**, se basa en el aislamiento del ión precursor para cada PCB, seguido de la aplicación de un voltaje de excitación adecuado para conseguir la fragmentación del mismo, en la Tabla 3 (**artículo 5**) se encuentran detalladas las condiciones de trabajo, optimizadas para obtener los espectros de MS/MS que permitan la identificación de los analitos. Hay que destacar la utilización de dos Dioxin-Like PCBs marcados, los equivalentes [$^{13}\text{C}_{12}$] de los PCBs 118 y 126, utilizados como *surrogates* y que corrigen las posibles pérdidas o variaciones instrumentales.

La metodología ha sido validada de manera satisfactoria, analizando cinco réplicas a tres niveles de fortificación, para las dos matrices estudiadas, obteniendo en la mayoría de casos recuperaciones en el rango 80%-120% (Tabla 4, **artículo 5**).

Los límites de cuantificación y detección son para los mono-*orto* Dioxin-Like PCBs, los LOQs se encuentran en el rango 0.2-0.03 ng/g mientras los LODs están entre 0.06 y 0.01. Respecto a los no-*orto* Dioxin-Like PCBs, los LOQs determinados estaban entre 0.009-0.004 ng/g mientras que los LODs oscilaban entre 0.003 y 0.001.

Consideramos adecuados estos límites de cuantificación y de detección, ya que permiten la determinación de los Dioxin-Like PCBs a los niveles encontrados en las matrices estudiadas (Tabla 5 **artículo 5**). En este sentido, la Figura 2

(**artículo 5**) muestra los cromatogramas correspondientes a los *no-orto* PCBs 77 y PCB 126 en una muestra no fortificada de pienso de acuicultura, cuantificada a 0.017 ng/g y 0.008 ng/g respectivamente.

4.4 Referencias

- Bell JG, McGhee F, Dick JR, Tocher DR. 2005. Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture* 243(1-4), 305-314.
- Easton MDL, Luszniak D, Von der Geest E. 2002. Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed. *Chemosphere* 46:1053-1074.
- Gilpin RK, Wagel DJ, Solch JG. 2003. Production, distribution and fate of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and related organohalogenes in the environment. En: Schechter A, Gasiewicz TA (eds) *Dioxins and health*. John Wiley and Sons (USA). P 55-87.
- Hernández F, Pitarch E, Beltran J, López FJ. 2002a. Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood. *J Chromatogr B* 769:65–77.
- Hernández F, Pitarch E, Serrano R, Gaspar J, Olea N. 2002b. Multiresidue determination of endosulfan and metabolic derivatives in human adipose tissue using automated liquid chromatography clean up and gas chromatography analysis. *J Anal Toxicol* 26:94–103.
- Hilbert G, Lillemark L, Balchen S, Hojskov CS. 1998. Reduction of organochlorine contaminants from fish oil during refining. *Chemosphere* 37:1241-1252.
- Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ. 2004. Global Assessment of Organic Contaminants in Farmed Salmon. *Science* 303:226-229.

- Jacobs MN, Johnston PA, Wyatt CL, Santillo D, French MC. 1997. Organochlorine pesticide and PCB residues in pharmaceutical, industrial and food grade fish oils. *Int J Environ Pollut* 8:74-93.
- Jacobs MN, Santillo D, Johnston PA, Wyatt CL, French MC. 1998. Organochlorine residues in fish oil dietary supplements: comparison with industrial grade oils. *Chemosphere* 37:1709-1721.
- Malavia J, Santos F J, Galceran M T. 2004. Gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry versus GC-high-resolution mass spectrometry for the determination of non-ortho-polychlorinated biphenyls in fish. *J Chromatogr A* 1056:171-178.
- Martinez-Cored M, Pujadas E, Diaz-Ferrero J, Coll M, Marti R, Broto-Puig F, Comellas F, Rodriguez-Larena MC. 1999. *Fresenius J Anal Chem* 364:576
- Maule AG, Gannam AL, Davis JW. 2007. Chemical contaminants in fish feeds used in federal salmonid hatcheries in the USA. *Chemosphere* 67:1308-1315
- Pinto B, Garritano S L, Cristofani R, Ortaggi G, Giulliano A, Amodio-Cocchieri R, Cirillo T, De Giusti M, Boccia A, Reali D. 2008. Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed sea food. *Environ Monitoring Assess* 144:445-453
- Santerre CR, Ingram R, Lewis G.W, Davis JT, Lane LG, Grodner RM, Wei C.-I, Bush PB, Xu DH, Shelton J, Alley EG, Hinshaw JM. 2000. Organochlorines, organophosphates and pyrethroids in channel catfish, rainbow trout, and red swamp crayfish from aquaculture facilities. *Food Chem Toxicol* 65:231-235.
- Santos FJ, Galceran MT. 2003. Modern developments in gas chromatography-mass spectrometry-based environmental analysis. *J Chromatogr A* 1000:125-151.

- Serrano R, Simal-Julian A, Pitarch E, Hernández F, Varo I, Navarro JC. 2003a. Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Environ Sci Technol* 37:3375-3381.
- Serrano R, Barreda M, Pitarch E, Hernandez F. 2003b. Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry *J Sep Sci* 26:75-86
- Serrano R, Barreda M, Blanes MA. 2008a. Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 56:963-972.
- Serrano R, Blanes MA, López FJ. 2008 b. Biomagnification of organochlorine pollutants in farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and stable isotope characterization of the trophic chains. *Sci Total Environ* 389:340-349.
- Van Leeuwen SPJ and De Boer J. 2008. Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment. *J Chromatogr A* 1186:161-182.

CAPÍTULO 5:

CONCLUSIONES GENERALES

Las diferentes conclusiones extraídas de las investigaciones desarrolladas en esta Tesis se detallan a continuación.

Los niveles de los contaminantes organoclorados estudiados presentan variaciones entre los diferentes tejidos analizados, así como a lo largo de las estaciones.

Las diferencias observadas entre los niveles de OCs están relacionadas con el ciclo reproductivo y de alimentación anual de la dorada.

Las doradas cultivadas muestran menores variaciones estacionales en los niveles de organoclorados que las doradas salvajes como consecuencia de las condiciones de cultivo que minimizan los cambios naturales.

Los niveles de contaminantes organoclorados encontrados en las doradas salvajes suelen ser mayores que los encontrados en las doradas cultivadas, para muestras procedentes de la zona occidental del Mar Mediterráneo. Asimismo, todas las muestras exhibían niveles detectables de contaminantes organoclorados, si bien por debajo de los niveles recomendados para el consumo humano.

Los mayores niveles de contaminantes organoclorados encontrados en las muestras corresponden al DDE y al PCB 153.

Los ratios de transferencia entre el hígado y los ovocitos no muestran diferencias entre los ejemplares salvajes y cultivados, para los contaminantes organoclorados estudiados, a pesar de las posibles diferencias en la vitelogénesis asociadas a las diferentes características de alimentación.

Los altos niveles de lípidos presentes en algunas de las muestras estudiadas pueden afectar a la determinación de las relaciones de isótopos estables de carbono y nitrógeno.

Las $\delta^{13}\text{C}$ de las doradas cultivadas son menores que las halladas para las doradas salvajes, hecho probablemente causado por una diferente fuente de carbono en la dieta, ecosistema oceánico para el pienso y fondos marinos rocosos del Mediterráneo occidental en el caso de la dieta natural.

Los niveles de $\delta^{15}\text{N}$ en el músculo de las doradas cultivadas son mayores que en el de las doradas salvajes, lo que indica un incremento relativo en el nivel trófico.

La determinación de las relaciones de isótopos estables en los tejidos de doradas, permite diferenciar entre ejemplares salvajes y cultivados así como caracterizar las diferencias en la dieta y en las condiciones de alimentación.

Los factores de biomagnificación en los tejidos de las doradas cultivadas son mucho mayores que los determinados en especímenes salvajes. Aunque este hecho implica una mayor acumulación de los contaminantes organoclorados en los ejemplares cultivados, los relativamente bajos niveles de OCs en los piensos utilizados en la dieta artificial, conduce a ejemplares con una carga de contaminantes inferior a la de los ejemplares salvajes.

Se ha desarrollado una metodología sensible y selectiva basada en el uso de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tandem, para la determinación de Dioxin-Like PCBs.

**OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS
RELACIONADOS CON LA TESIS**

- *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010) 38–45

Bioaccumulation markers and biochemical responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) raised under different environmental conditions

Luna Greco ^{*a}, Roque Serrano ^b, Miguel A. Blanes ^b, Elena Serrano ^b, Ettore Capri ^a

^a *Agricultural and Environmental Chemistry Institute, Plant Chemistry Section, Via Emilia Parmense 84, Università Cattolica del Sacro Cuore, 29100 Piacenza, Italy*

^b *Research Institute for Pesticides and Water (IUPA), Avda Sos Baynat, s/n., University Jaume I, 12071 Castellón, Spain*

* Corresponding author. Fax: 39 0523599217.

E-mail address: luna.greco@unicatt.it (L. Greco).

- *Marine Pollution Bulletin* 56 (2008) 963–972

Investigating the presence of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in wild and farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from the Western Mediterranean sea

Roque Serrano ^{*}, Mercedes Barreda, Miguel A. Blanes

Research Institute for Pesticides and Water (IUPA), Avda Sos Baynat, s/n., University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

*Corresponding author. Tel.: +34 964 387358; fax: +34 964 387368.

- En preparación

Characterization of the organic contamination pattern of a hyper-saline ecosystem by rapid screening using gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry

Roque Serrano ^{*a}, Tania Portolés ^a, Miguel A. Blanes ^a, Félix Hernández ^a, Juan C. Navarro ^b, Inmaculada Varó ^b, Francisco Amat ^b

^a*Research Institute for Pesticides and Water (IUPA). Avda Sos Baynat, s/n. University Jaume I, 12071 Castellón, Spain*

^b*Institute of Aquaculture of Torre la Sal (IATS), C.S.I.C., 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain*

