

## Environmental chemical data and *Carcinus maenas* biochemical responses in a coastal eutrophic ecosystem (Óbidos Lagoon, Portugal)

## Datos químicos ambientales y respuestas bioquímicas de *Carcinus maenas* en un ecosistema costero eutrófico (Laguna de Óbidos, Portugal)

P Pereira<sup>1,2\*</sup>, H de Pablo<sup>1</sup>, C Vale<sup>1</sup>, M Pacheco<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Institute of Biological Resources – IPIMAR, Av. Brasília, 1449-006 Lisbon, Portugal. \* E-mail: patbio@ipimar.pt

<sup>2</sup> CESAM and Biology Department, Aveiro University, 3810-193 Aveiro, Portugal.

### Abstract

The status of Óbidos Lagoon (Portugal) was assessed combining water quality, sediment quality, and oxidative stress responses in female shore crab *Carcinus maenas*. Two sites were surveyed in October 2005, one located in an impacted, confined inner branch (Barrosa) and another in the middle of the lagoon more influenced by the seawater input. Concentrations of ammonium and nitrate + nitrite were notably higher in Barrosa, although the differences in sediment metal contamination were minor. The availability of dissolved Mn, Cu, Ni, and Cd was higher in Barrosa, particularly in the morning, which suggests the influence of internal processes occurring near the sediment during the night. Female crabs captured at Barrosa exhibited alterations in hepatopancreas antioxidants, clearly indicating that the inner branch is a more polluted area. Crabs displayed increased activity of glutathione peroxidase, catalase, and glutathione S-transferase, as well as lipid peroxidative damage, whereas no differences were observed for total glutathione. Those significant responses were not accompanied by a significant elevation of metal levels in the hepatopancreas, suggesting that adverse effects may have been caused by the synergism of stressors.

*Key words:* *Carcinus maenas*, costal lagoon, eutrophication, metals, oxidative stress.

### Resumen

Se evaluó el estado de la Laguna de Óbidos (Portugal) mediante la calidad del agua y del sedimento, así como las respuestas al estrés oxidativo en hembras de cangrejo *Carcinus maenas*. En octubre de 2005 se muestrearon dos estaciones en la laguna, una localizada en un brazo interno e impactado (brazo Barrosa) y otra en la parte media de la laguna, con mayor influencia de aportes oceánicos. Las concentraciones de amonio y nitrato + nitrito fueron notablemente mayores en Barrosa, mientras que las diferencias en los niveles de metales en el sedimento fueron mínimas. La disponibilidad de Mn, Cu, Ni y Cd disueltos fue mayor en Barrosa, especialmente por la mañana, lo que sugiere la influencia de procesos internos que ocurren cerca del sedimento durante la noche. Las hembras de *C. maenas* capturadas en Barrosa presentaron alteraciones en sus antioxidantes hepatopancreáticos, una clara indicación de que el brazo interno es una zona más contaminada. Los cangrejos mostraron un incremento en la actividad glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión S-transferasa, así como daño peroxidativo de lípidos, mientras que para el glutatión total no se observaron diferencias. Las respuestas significativas no fueron acompañadas por un incremento significativo de los niveles de metales en el hepatopáncreas, lo que indica que los efectos adversos pudieron haber sido causados por el sinergismo de las fuentes de estrés.

*Palabras clave:* *Carcinus maenas*, estrés oxidativo, eutrofización, laguna costera, metales.

### Introduction

Eutrophic environments often display a decline of oxygenation during the night, triggering pulses on the availability of trace metals and nutrients owing to mobilization from sediments (Point *et al.* 2007). Aquatic organisms inhabiting those environments are exposed to multiple stress agents with different mechanisms of toxicity, each contributing to a final overall adverse effect. In order to improve the efficacy of monitoring programs in such complex circumstances, the combination of chemical data and biological responses is strongly recommended (Walker and Livingstone 1992, van der Oost *et al.*

### Introducción

Los ambientes eutróficos frecuentemente muestran una reducción en la oxigenación durante la noche, lo que provoca pulsos en la disponibilidad de los metales traza y nutrientes debido a su movilización desde los sedimentos (Point *et al.* 2007). Los organismos acuáticos que allí habitan están expuestos a múltiples agentes de estrés con diferentes mecanismos de toxicidad, y cada uno contribuye al efecto adverso general final. Para mejorar la eficacia de los programas de monitoreo bajo circunstancias tan complejas, resulta muy recomendable combinar los datos químicos con las respuestas biológicas

2003, Laffon *et al.* 2006). Among the wide range of biological responses pointing to environmental contamination, biochemical markers have played a singular role, representing early-warning signals whose detection can prevent adverse effects at higher hierarchical levels (van der Oost *et al.* 2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems are triggered to eliminate reactive oxygen species (ROS), allowing organisms to overcome oxidative stress (Winston and Di Giulio 1991). The production of ROS is ubiquitous in aquatic species, antioxidant induction being an important component of the adaptive response in organisms exposed to different classes of contaminants (Stohs and Bagchi 1995). Antioxidant defences may also be induced by ammonia and nitrites (Das *et al.* 2004, Nimptsch and Pflugmacher 2007), highlighting the relevance of eutrophic conditions in the overall responses of the organisms.

The European shore crab *Carcinus maenas* L has a sedentary lifestyle, and is an aggressive and voracious predator living in close contact with the sediment (Baeta *et al.* 2005). This species has been extensively used as bioindicator due to its wide geographical distribution, although studies applying oxidative stress endpoints under real field scenarios are less abundant (Astley *et al.* 1999, Martín-Díaz *et al.* 2008, Morales-Caselles *et al.* 2008). This study reports oxidative stress responses in a wild population of *C. maenas* females from a coastal lagoon (Óbidos Lagoon, Portugal) impacted by eutrophication and moderate metal contamination, and examines the implications of the co-occurrence of these environmental stressors on the ecosystem health.

## Material and methods

### Study area

Óbidos Lagoon, located on the west coast of Portugal, is a shallow coastal lagoon with a wet area of 7 km<sup>2</sup> (fig. 1). The lagoon is permanently connected to the sea through a narrow inlet and comprises areas of different morphological and sedimentary characteristics (Oliveira *et al.* 2006): several sand banks, narrow channels, and strong currents in the lower part; weaker current intensities in the broad middle lagoon; and muddy bottom sediments in the inner branches. Barrosa branch is shallower (mean depth of 1 m) and water circulation is mostly dependent on the tides and on a small tributary that drains agriculture fields. Domestic effluents from a nearby town (Caldas da Rainha, 50,000 inhabitants) have been discharged into Barrosa during the past decades. Consequently, the water quality has been considerably degraded showing clear symptoms of eutrophication, favouring opportunist macroinvertebrate species and macroalgal growth (Carvalho *et al.* 2005, 2006). Anthropogenic discharges into the middle and lower parts of the lagoon are negligible or absent, and degradation of water quality and macrobenthos has not been identified.

(Walker y Livingstone 1992, van der Oost *et al.* 2003, Laffon *et al.* 2006). Dentro del amplio intervalo de respuestas biológicas que indican contaminación ambiental, los marcadores bioquímicos han jugado un papel singular, ya que son señales precoces de alerta cuya detección puede prevenir efectos adversos a niveles jerárquicos mayores (van der Oost *et al.* 2003). Para eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) se desencadenan sistemas enzimáticos y no enzimáticos que permiten a los organismos superar el estrés oxidativo (Winston y Di Giulio 1991). La producción de ROS es ubicua en especies acuáticas, siendo la inducción antioxidante un componente importante de las respuestas adaptativas en los organismos expuestos a diferentes clases de contaminantes (Stohs y Bagchi 1995). Las defensas antioxidantes también pueden ser inducidas por el amoníaco y los nitritos (Das *et al.* 2004, Nimptsch y Pflugmacher 2007), realzando la importancia de las condiciones eutróficas en la respuesta global de los organismos.

El cangrejo común europeo *Carcinus maenas* L tiene una vida sedentaria, es un depredador agresivo y voraz que vive en contacto con el sedimento (Baeta *et al.* 2005). Esta especie ha sido muy utilizada como bioindicador debido a su amplia distribución geográfica, aunque son escasos los estudios que han examinado sus respuestas al estrés oxidativo en condiciones reales de campo (Astley *et al.* 1999, Martín-Díaz *et al.* 2008, Morales-Caselles *et al.* 2008). En este trabajo se determinaron las respuestas al estrés oxidativo en hembras de una población silvestre de *C. maenas* de una laguna costera (Laguna de Óbidos, Portugal) eutrófica y moderadamente contaminada por metales, y se evaluaron las implicaciones de la concurrencia de estas fuentes de estrés ambiental en la salud del ecosistema.

## Material y métodos

### Área de estudio

La Laguna de Óbidos, localizada en la costa occidental de Portugal, es una laguna costera somera con un área húmeda de 7 km<sup>2</sup> (fig. 1). Mantiene contacto permanente con el mar a través de una entrada angosta y presenta zonas con diferentes características morfológicas y sedimentarias (Oliveira *et al.* 2006): varios bancos de arena, canales angostos y corrientes fuertes, en la parte inferior (más cerca del mar); corrientes menos intensas en su amplia parte media; y sedimentos lodosos en sus brazos internos. El brazo conocido como Barrosa es más somero (profundidad media de 1 m) y la circulación del agua depende principalmente de las mareas y de un pequeño afluente de agua que transcurre por campos agrícolas. Barrosa ha recibido las aguas residuales de una ciudad cercana (Caldas da Rainha, 50,000 habitantes) durante las últimas décadas y, por tanto, su calidad del agua se ha visto muy degradada, mostrando síntomas claros de eutrofización, lo cual favorece las especies oportunistas de macroinvertebrados así como el crecimiento de macroalgas (Carvalho *et al.* 2005, 2006). Las descargas antropogénicas en las partes inferior y media de la laguna son mínimas o inexistentes, y no se ha registrado degradación ni del agua ni de la fauna macrobentónica.

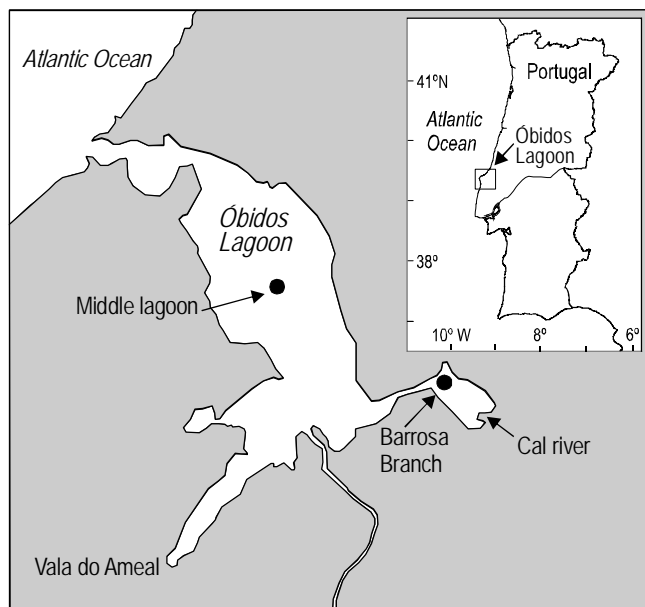


Figure 1. Location of the sampling sites at Óbidos Lagoon (Portugal).

Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo en la Laguna de Óbidos (Portugal).

### Sampling and sample preparation

A survey was conducted in October 2005 at two sampling sites: one located in a confined inner branch (Barrosa), and another in the middle part of the lagoon that has a high renewal of seawater and served as a reference site (fig. 1). Surface water (0.2-m depth) was sampled during high and low tides in the morning and afternoon, respectively. Temperature, salinity, and pH were measured *in situ* using a YSI 650 meter. Water was sampled by hand into several bottles according to the analytical specifications and transported to a field laboratory for filtration and preservation. Sediments were collected with a Van Veen grab; the first centimetres were removed with a spatula and stored in plastic bags. In the laboratory, surface sediment samples were oven-dried to constant weight at 40°C and homogenized. Six females of *C. maenas* were captured using baited circular drop nets. Specimens were weighted (total fresh weight) and measured (cephalothorax width). The morphological observation of specimens during laboratory handling showed the absence of ovigerous females. The hepatopancreas was excised, divided into two parts, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further metal analysis and biochemical assays.

### Analytical determinations

#### Water physicochemical parameters

Dissolved oxygen was determined by a modified Winkler method (Carrit and Carpenter 1966). Suspended particulate matter was obtained by filtering 250 mL of water through

### Muestreo y preparación de las muestras

En octubre de 2005 se realizó un estudio en dos estaciones de muestreo: una localizada en un brazo interno confinado (Barrosa), y otra en la parte media de la laguna con alta renovación de agua marina y que sirvió como sitio de referencia (fig. 1). Se muestreó el agua superficial (profundidad de 0.2 m) durante la pleamar y la bajamar, por la mañana y tarde, respectivamente. La temperatura, la salinidad y el pH fueron medidos *in situ* con una sonda YSI 650. Las muestras de agua se recolectaron a mano en varias botellas siguiendo las especificaciones analíticas y se transportaron a un laboratorio de campo para su filtración y preservación. Los sedimentos se recolectaron con una draga Van Veen; los primeros centímetros fueron recogidos con una espátula y almacenados en bolsas de plástico. En el laboratorio las muestras de sedimento superficial se secaron en un horno a 40°C hasta lograr peso constante y se homogeneizaron. Se capturaron seis hembras de *C. maenas* usando nasas circulares encarnadas. Los especímenes fueron pesados (peso húmedo total) y medidos (ancho del cefalotórax). La observación morfológica de los especímenes en el laboratorio indicó la ausencia de hembras ovadas. El hepatopáncreas se extirpó, se dividió en dos partes, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis bioquímico y de metales.

### Determinaciones analíticas

#### Parámetros fisicoquímicos del agua

El oxígeno disuelto se determinó utilizando un método modificado de Winkler (Carrit y Carpenter 1966). La materia particulada en suspensión se obtuvo mediante la filtración de 250 mL de agua a través de membranas de acetato de celulosa (0.45 µm) y fue determinada por gravimetría. Las muestras para la determinación de los nutrientes inorgánicos disueltos (nitrato + nitrito,  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ; amonio,  $\text{NH}_4^+$ ) se pasaron por filtros MSI Acetate Plus y se analizaron usando un autoanalizador Bran Luebbe TRAACS 2000.

#### Análisis de metales, carbón y nitrógeno

La medición de Mn, Cu, Cr, Ni y Cd disueltos se realizó mediante gradientes difusivos en películas delgadas (DGT, por sus siglas en inglés; Davison y Zhang 1994) (0.4 mm de grosor) colocados en agua recolectada en botellas de polipropileno (2 L) descontaminadas durante 48 h a 20°C. La extracción de los metales de las muestras se llevó a cabo usando 5 mL de  $\text{HNO}_3$  (1 M). Todas las soluciones extraídas fueron analizadas directamente mediante espectrometría de masas con acoplamiento inductivo (ICP-MS, Thermo Elemental Serie X). Las muestras de sedimento (≈100 mg) fueron completamente mineralizadas con HF y agua regia a 100°C durante 1 h en bombas de Teflón cerradas. Posteriormente, los contenidos de las bombas se evaporaron hasta la sequedad en frascos de Teflón (DigiPrep HotBlock, SCP Science), se redisolviéron

cellulose acetate membranes (0.45  $\mu\text{m}$ ) and determined gravimetrically. Samples for the determination of dissolved inorganic nutrients (nitrate + nitrite,  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ; ammonium,  $\text{NH}_4^+$ ) were filtered through MSI Acetate Plus filters, and analyzed using a Bran Luebbe TRAACS 2000 autoanalyzer.

#### Metal, carbon, and nitrogen analyses

The measurement of dissolved Mn, Cu, Cr, Ni, and Cd was performed by diffusive gradients in thin-film (DGT) samplers (Davison and Zhang 1994) (0.4 mm of thickness) deployed in water collected in decontaminated polypropylene bottles (2 L) during 48 h at 20°C. Elution of metals from samplers was carried out using 5 mL of  $\text{HNO}_3$  (1 M). All elution solutions were analyzed directly by inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS, Thermo Elemental X-Series). Sediment samples ( $\approx 100$  mg) were completely mineralized with HF and aqua regia in closed Teflon bombs at 100°C for 1 h. Bomb contents were then evaporated to near dryness in Teflon vials (DigiPrep HotBlock, SCP Science), redissolved with 1 mL of double-distilled  $\text{HNO}_3$  and 5 mL of Milli-Q water, heated for 20 min at 75°C, and diluted with Milli-Q water (Caetano *et al.* 2007). Freeze-dried and homogenized tissue samples ( $\approx 50$  mg) were digested using a mixture of  $\text{HNO}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 60°C for 12 h, at 100°C for 1 h, and at 80°C for 1 h, according to the method described by Ferreira *et al.* (1990). Concentrations of Al, Fe, and Zn were determined by flame atomic absorption spectrometry (Perkin Elmer AAnalyst 100), and concentrations of Mn, Cu, Cr, Ni, and Cd were determined by ICP-MS. The accuracy of the analytical procedures was assessed by the analysis of certified reference materials (MESS-3, AGV-1, BCSS-1, and NIST-1646a for sediments; TORT-1, TORT-2, DOLT-1, and DOLT-3 for crab hepatopancreas). To check for any possible contamination during the analytical procedure, procedural blanks were analyzed. Organic carbon and nitrogen were determined in sediment samples using the method described by Verardo *et al.* (1990) in a CHN Fisons NA 1500 analyzer.

#### Oxidative stress parameters

Hepatopancreases were homogenized in a 1:11 w/v ratio (hepatopancreas weight:buffer volume) of 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.15 mol  $\text{L}^{-1}$  KCl and 20% glycerol. An aliquot of homogenate was taken to measure thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the rest was centrifuged at 12,000 g for 20 min to remove cell debris, nuclei, mitochondria, and lysosomes. The supernatant was collected and recentrifuged at 135,000 g for 75 min. The cytosolic fraction was frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Total glutathione (GSH<sub>t</sub>) content was determined adopting the enzymatic recycling method using glutathione reductase (GR) excess, whereby the sulfhydryl group of GSH reacts with DTNB (Ellman's reagent) producing a yellow-coloured 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB). The formation of TNB was

con 1 mL de  $\text{HNO}_3$  bidestilado y 5 mL de agua Milli-Q, se calentaron durante 20 min a 75°C, y se diluyeron con agua Milli-Q (Caetano *et al.* 2007). Las muestras de tejido liofilizadas y homogeneizadas ( $\approx 50$  mg) fueron digeridas con una mezcla de  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 60°C durante 12 h, a 100°C durante 1 h, y a 80°C durante 1 h, según el método descrito por Ferreira *et al.* (1990). Se determinaron las concentraciones de Al, Fe y Zn por espectrometría de absorción atómica a la llama (Perkin Elmer AAnalyst 100), y las de Mn, Cu, Cr, Ni y Cd por ICP-MS. La precisión de los procedimientos analíticos se evaluó mediante el análisis de materiales de referencia certificados (MESS-3, AGV-1, BCSS-1 y NIST-1646a para sedimentos; TORT-1, TORT-2, DOLT-1 y DOLT-3 para el hepatopáncreas de cangrejo). Se analizaron blancos para verificar alguna posible contaminación durante el procedimiento analítico. Se determinaron el carbono orgánico y el nitrógeno orgánico en las muestras de sedimento siguiendo el método descrito por Verardo *et al.* (1990) en un analizador CHN Fisons NA 1500.

#### Parámetros de estrés oxidativo

Se homogeneizaron los hepatopáncreas a razón de 1:11 p/v (peso del hepatopáncreas:volumen del tampón) de 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.4) con 0.15 mol  $\text{L}^{-1}$  KCl y glicerol al 20%. Se tomó una alícuota del homogeneizado para medir las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el resto se centrifugó a 12,000 g durante 20 min para eliminar restos celulares, núcleos, mitocondrias y lisosomas. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 135,000 g por 75 min. La fracción citosólica se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta ser usada. El contenido de glutatión total (GSH<sub>t</sub>) se determinó usando el método de reciclaje enzimático con exceso de glutatión reductasa (GR), en el cual el grupo sulfidrilo del GSH reacciona con el reactivo de Ellman (DTNB) y produce un ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de color amarillo. La formación de TNB se midió mediante espectrofotometría a 412 nm y los resultados se expresaron en nanomoles de TNB formado por minuto por miligramo de proteína. Se determinó la actividad glutatión S-transferasa (GST) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) como sustrato según el método de Habig *et al.* (1974), calculado como nanomoles de CDBN conjugado formado por minuto por miligramo de proteína usando un coeficiente de extinción molar de  $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La actividad catalasa (CAT) se determinó mediante el método de Claiborne (1985). El cambio en la absorbancia fue registrado a 240 nm y la actividad CAT fue calculada en términos de nanomoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto por miligramo de proteína. La actividad glutatión peroxidasa (GPx) se determinó midiendo la oxidación del fosfato nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) a 340 nm usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato (Mohandas *et al.* 1984). La determinación del daño por peroxidación lipídica (LPO) se realizó con base en la medición de las TBARS (535 nm), según la adaptación de Filho *et al.* (2001). La razón de LPO fue expresada como nanomoles de TBARS formadas por miligramo de

measured by spectrophotometry at 412 nm and the results were expressed as nanomoles of TNB formed per minute per milligram of protein. Glutathione S-transferase (GST) activity was determined using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate according to the method of Habig *et al.* (1974), calculated as nanomoles of CDBN conjugate formed per minute per milligram of protein using a molar extinction coefficient of  $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Catalase (CAT) activity was assayed by the Claiborne (1985) method. Change in absorbance was recorded at 240 nm and CAT activity was calculated in terms of nanomoles of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute per milligram of protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by measuring the oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm using  $\text{H}_2\text{O}_2$  as substrate (Mohandas *et al.* 1984). The determination of lipid peroxidative (LPO) damage was carried out based on the TBARS measurement (535 nm), as adapted by Filho *et al.* (2001). The rate of LPO was expressed as nanomoles of TBARS formed per milligram of fresh tissue, using a molar extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Cytosolic protein concentrations were determined according to the Biuret method (Gornall *et al.* 1949) using bovine serum albumin (Merck, Darmstadt) as a standard.

#### Statistical analysis

Analysis of variance was applied to compare results between crab groups, followed by the Tukey test (Zar 1996). Differences between means were considered significant when  $P < 0.05$ . The metal concentrations in crabs and oxidative stress parameters were correlated with the Pearson analysis ( $P < 0.05$ ) in order to detect significant relationships between variables.

## Results

### Water and sediment characteristics

Temperature ranged between 18°C and 20°C. The salinity was slightly lower in Barrosa reflecting the small freshwater inputs during ebb tide (table 1). The suspended particulate matter concentration was higher during low tide at both sites. Dissolved oxygen concentration was approximately 100% saturation and pH showed larger differences in Barrosa. Ammonium at both sites accounted for 80–93% of the total inorganic nitrogen concentrations, and was higher in Barrosa (44–53  $\mu\text{M}$ ) than in the middle of the lagoon (16–28  $\mu\text{M}$ ). A similar inter-site difference was observed for nitrate + nitrite concentrations (5.1–13 and 1.8–2.0  $\mu\text{M}$ , respectively). In Barrosa, higher concentrations were registered at low tide, suggesting the influence of freshwater discharges enriched in nutrients.

The levels of dissolved Cu, Cr, Ni, and Cd indicated low contamination, although the Barrosa values always exceeded those registered in the middle of the lagoon. Values ranged within narrower intervals in the middle lagoon than in Barrosa.

tejido húmedo, usando un coeficiente de extinción molar de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las concentraciones de proteína citosólica fueron determinadas siguiendo el método de Biuret (Gornall *et al.* 1949), usando albúmina sérica de bovino (Merck, Darmstadt) como estándar.

### Análisis estadístico

Para comparar los resultados entre los grupos de cangrejos se aplicó un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey (Zar 1996). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ . Las concentraciones de metales en los cangrejos y los parámetros de estrés oxidativo fueron correlacionados con el análisis de Pearson ( $P < 0.05$ ) para detectar las relaciones significativas entre las variables.

## Resultados

### Características del agua y el sedimento

La temperatura varió entre 18°C y 20°C. La salinidad fue ligeramente menor en el brazo interno de Barrosa, reflejando los pequeños aportes de agua dulce durante la bajante (tabla 1). La concentración de la materia particulada en suspensión fue mayor durante la bajamar en ambos sitios. Los niveles de oxígeno disuelto fueron aproximadamente 100% de saturación y las mayores diferencias de pH se observaron en Barrosa. En ambos sitios el amonio explicó entre el 80% y el 93% de las concentraciones de nitrógeno inorgánico total, siendo más alto

**Table 1.** Water physicochemical parameters, ammonium and nitrate + nitrite concentrations, and dissolved metals from the Barrosa branch and middle of the lagoon (reference site), during two sampling periods (morning/high tide and afternoon/low tide).

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos del agua, concentraciones de amonio y nitrato + nitrito, y metales disueltos en los sitios en el brazo de Barrosa y en la parte media de la laguna (referencia), durante dos periodos de muestreo (mañana/pleamar y tarde/bajamar).

		Morning–afternoon (High tide–low tide)	
		Barrosa	Middle lagoon
Temperature	(°C)	19–20	18–19
Salinity		34.5–33.0	35.1–35.4
SPM	(mg L <sup>-1</sup> )	4–17	4–12
pH		7.9–8.4	8.0–8.2
O <sub>2</sub>	(%)	94–95	97–102
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	(μM)	44–53	28–16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	(μM)	5.1–13	1.8–2.0
Mn	(μM)	0.31–0.18	0.22–0.17
Cu		9.6–4.6	1.6–2.2
Cr		8.5–6.5	7.5–6.9
Ni	(nM)	12–6.0	6.3–4.4
Cd		0.15–0.17	0.089

**Table 2.** Concentrations of organic carbon (C org) and nitrogen (N org), and metals in sediments from Barrosa branch and the middle of the lagoon (reference site).

**Table 2.** Concentraciones de carbono orgánico (C org), nitrógeno orgánico (N org) y metales en los sedimentos del brazo de Barrosa y de la parte media de la laguna (sitio de referencia).

	Barrosa	Middle lagoon
C org	1.1	0.5
N org	0.14	0.036
Al (%)	12	11
Fe	5.0	4.6
Mn	300	298
Zn	144	125
Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	52	40
Cr	89	83
Ni	35	33
Cd	0.19	0.15

In addition, concentrations in Barrosa were higher in the morning (high tide) than in the afternoon when the volume was smaller (low tide). This means that increases in water metal concentrations were not associated with freshwater inputs, in regard to nutrients, and consequently additional internal sources were considered.

The metal concentrations in surface sediments were relatively low (table 2) and the Barrosa values were comparable to those for the middle lagoon, or only slightly higher (Cu and Zn). Moreover, Al content was identical at both sites, indicating a similar grain size. Those values indicate low industrial influence in Óbidos Lagoon. Sediment from Barrosa presented higher contents of organic carbon and nitrogen, which is in line with the nutrient data.

#### *Condition index, metal levels, and oxidative stress endpoints in hepatopancreas of C. maenas*

The weight (g), cephalothorax width (cm), and condition index (calculated as the ratio between wet weight and cephalothorax width) of *C. maenas* females from the two sampling sites were not significantly ( $P < 0.05$ ) different (table 3). The levels of Cu, Zn, Mn, and Ni in crab hepatopancreas did not vary significantly between sites (table 3), but accumulated Cr and Cd were higher in the hepatopancreas of female crabs captured in Barrosa ( $0.88 \pm 0.19$  and  $0.20 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively) than in the middle lagoon ( $0.50 \pm 0.04$  and  $0.12 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively).

Catalase, GPx, GST, and LPO in the hepatopancreas of crabs from Barrosa (inner branch) were significantly higher than in those from the in the middle lagoon reference site (fig. 2). Although specimens caught at Barrosa presented higher levels of GSH<sub>t</sub>, they were not significantly different ( $P > 0.05$ ). The correlations between all the quantified metals and oxidative stress responses in crab hepatopancreas were statistically significant between Cr and TBARS (fig. 3).

en Barrosa (44–53  $\mu\text{M}$ ) que en la parte media de la laguna (16–28  $\mu\text{M}$ ). Se observó una diferencia similar entre las estaciones de muestreo respecto a las concentraciones de nitrato + nitrito (5.1–13 y 1.8–2.0  $\mu\text{M}$ , respectivamente). En Barrosa se registraron concentraciones más altas durante la bajamar, lo que sugiere la influencia de descargas de agua dulce enriquecidas con nutrientes.

Los niveles de Cu, Cr, Ni y Cd disueltos mostraron una contaminación baja debida a estos metales, aunque los valores para Barrosa siempre fueron mayores que los registrados en el centro de la laguna. Los valores presentaron intervalos menos amplios en la parte media de la laguna que en Barrosa. Además, las concentraciones en Barrosa fueron mayores por la mañana (pleamar) que por la tarde cuando el volumen de agua era menor (bajamar). Esto indica que el aumento en las concentraciones de metales en el agua no está relacionado con los aportes de agua dulce, como lo ocurrido con los nutrientes, y por tanto deberían de considerarse otras fuentes internas.

Las concentraciones de metales en sedimentos superficiales fueron relativamente bajas (tabla 2) y los valores obtenidos para Barrosa fueron comparables con los de la parte media de la laguna, o ligeramente superiores (Cu y Zn). El contenido de Al resultó prácticamente igual en ambos sitios, lo que indica un tamaño de grano similar. Estos valores sugieren una mínima influencia industrial en la Laguna de Óbidos. El sedimento de Barrosa mostró mayores concentraciones de carbono y nitrógeno orgánicos, que concuerda con los datos de nutrientes.

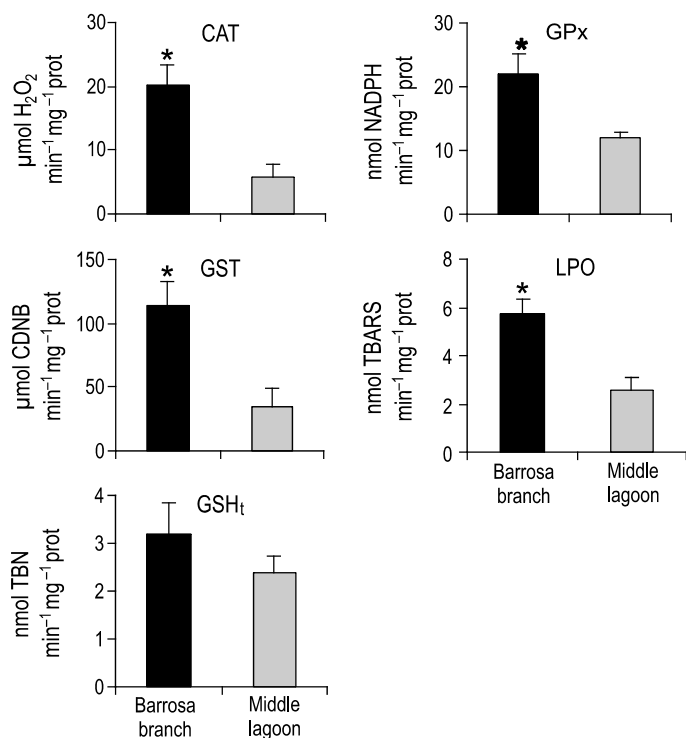
#### *Índice de condición, niveles de metales y respuestas al estrés oxidativo en el hepatopáncreas de C. maenas*

El peso (g), el ancho del cefalotórax (cm) y el índice de condición (calculado como la razón entre peso húmedo y ancho del cefalotórax) de las hembras de *C. maenas* de las dos estaciones de muestreo no resultaron significativamente ( $P < 0.05$ ) diferentes (tabla 3). Los niveles de Cu, Zn, Mn y Ni en el hepatopáncreas no variaron significativamente entre estaciones (tabla 3), pero los de Cr y Cd fueron más elevados en el hepatopáncreas de las hembras capturadas en Barrosa ( $0.88 \pm 0.19$  y  $0.20 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente) que en las capturadas en la parte media de la laguna ( $0.50 \pm 0.04$  y  $0.12 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente).

La CAT, GPx, GST y LPO en el hepatopáncreas de los cangrejos del brazo interno de Barrosa fueron significativamente mayores que en los animales del sitio de referencia en la parte media de la laguna (fig. 2). Aunque los especímenes capturados en Barrosa presentaron niveles más altos de GSH<sub>t</sub>, éstos no resultaron significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ). Las correlaciones entre todos los metales cuantificados y las respuestas al estrés oxidativo en el hepatopáncreas de los cangrejos fueron estadísticamente significativas entre Cr y TBARS (fig. 3).

#### **Discusión**

La calidad del agua del brazo interno (Barrosa) de la Laguna de Óbidos es baja debido a las cargas orgánicas



**Figure 2.** Oxidative stress parameters in *Carcinus maenas* females captured at the Barrosa inner branch and the middle lagoon reference site at Óbidos Lagoon. Hepatopancreas activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione *S*-transferase (GST); total glutathione (GSHt) content; and lipid peroxidation (LPO). Values represent the means and standard errors ( $n = 6$  females/sampling site). Asterisks identify significant differences ( $P < 0.05$ ).

**Figura 2.** Parámetros de estrés oxidativo en hembras de *Carcinus maenas* capturadas en el brazo interno de Barrosa y la estación de referencia en la parte media de la Laguna de Óbidos. Actividades catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión *S*-transferasa (GST), así como contenido de glutatión total (GSHt) y peroxidación lipídica (LPO) en el hepatopáncreas. Los valores representan las medias y los errores estándar ( $n = 6$  hembras/sitio de muestreo). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

The confined branch (Barrosa) of Óbidos Lagoon has poor water quality as a result of organic loads from urban and agricultural activities in the drainage basin and the weak tidal currents, which facilitate the settling of organically enriched particles (Carvalho *et al.* 2006). The elevated levels of ammonium and nitrate + nitrite registered during low tide corroborate these effects, and provide an explanation for the abundant green macroalgae covering the sediment and high levels of chlorophyll *a* (IPIMAR 2006). Nutrients at the reference site were low. That site was previously classified as oligotrophic or mesotrophic, while Barrosa was classified as a eutrophic zone (Pereira *et al.* in press).

The metal concentrations in fine sediments of this branch indicated low metal concentrations associated with anthropogenic sources, as also previously documented for

**Table 3.** Weight, cephalothorax width, condition index (CI), and metal concentrations in hepatopancreas of *Carcinus maenas* females captured in Barrosa branch and in the middle of the lagoon (reference site). Mean and associated standard errors are given ( $n = 6$  females/sampling site).

**Tabla 3.** Peso, ancho del cefalotórax, índice de condición y concentraciones de metales en el hepatopáncreas de hembras de *Carcinus maenas* capturadas en el brazo de Barrosa y en la parte media de la laguna (sitio de referencia). Se presentan las medias y sus errores estándar asociados ( $n = 6$  hembras/estación de muestreo).

		Barrosa	Middle lagoon
Weight	(g)	25 ± 0.07	23 ± 0.49
Width	(cm)	5.1 ± 0.10	5.0 ± 0.04
CI	(g cm <sup>-1</sup> )	5.0 ± 0.10	4.6 ± 0.07
Mn		15 ± 1.7	14 ± 1.5
Zn		101 ± 14	94 ± 8.6
Cu	( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	239 ± 69	262 ± 85
Cr	dry weight)	0.88 ± 0.19	0.50 ± 0.04
Ni		2.5 ± 0.22	3.7 ± 0.46
Cd		0.20 ± 0.04	0.12 ± 0.03

precedentes de las actividades urbanas y agrícolas en su cuenca de drenaje, así como por las débiles corrientes de marea, lo que facilita el depósito de partículas orgánicamente enriquecidas (Carvalho *et al.* 2006). Los niveles elevados de amonio y nitrato + nitrito que se registraron durante la bajamar corroboran estos efectos y proporcionan una explicación tanto para la abundancia de macroalgas verdes que cubren el sedimento como para los altos niveles de clorofila *a* (IPIMAR 2006). Las concentraciones de nutrientes fueron bajas en la estación de referencia, clasificada como oligotrófica, mientras que el brazo de Barrosa se ha clasificado como zona eutrófica (Pereira *et al.* en prensa).

Las concentraciones de metales en los sedimentos finos de Barrosa indicaron concentraciones bajas asociadas a fuentes antropogénicas, como ya ha sido documentado para los contaminantes orgánicos (Carvalho *et al.* 2006). No obstante, los niveles ligeramente mayores de los metales disueltos encontrados en la columna de agua, especialmente en la mañana, son indicativos de aumentos que ocurren durante la noche. De hecho, en verano se registró una disminución en la concentración de oxígeno disuelto durante la noche en el brazo interno y una mayor disponibilidad de metales en la columna de agua (IPIMAR 2006). Los niveles de nutrientes también aumentaron debido a su regeneración en los sedimentos y su flujo hacia al agua sobreyacente. La activación de fuentes internas bajo condiciones de baja oxigenación ha sido descrita para varios sistemas eutróficos (e.g., Lillebø *et al.* 2004, Point *et al.* 2007).

El índice de condición resultó idéntico para los cangrejos de ambas estaciones, lo que sugiere la ausencia de efectos tóxicos a este nivel de organización biológica (Ferreira *et al.* 2006); sin embargo, las diferencias significativas en los parámetros de estrés oxidativo observados en el hepatopáncreas de *C. maenas* sugieren alteraciones a nivel molecular y bioquímico en los especímenes de Barrosa. La presencia de

organic contaminants (Carvalho *et al.* 2006). Nevertheless, the slightly higher levels of dissolved metals found in the water column, particularly in the morning, are indicative of increases occurring during the night. Indeed, in summer a decline in dissolved oxygen concentration was recorded during the night in the inner branch, and enhanced metal availability was observed in the water column (IPIMAR 2006). Nutrient levels also increased due to regeneration in sediments and fluxes to the overlying water. The activation of internal sources under low oxygenation conditions has been described in various eutrophic systems (e.g., Lillebø *et al.* 2004, Point *et al.* 2007).

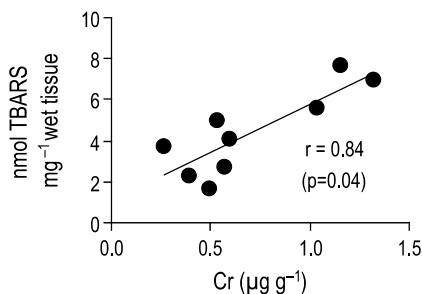
The identical condition index of the crabs from both sampling sites suggests no toxic effects at this level of biological organization (Ferreira *et al.* 2006). However, the significant differences in oxidative stress parameters found for the hepatopancreas of *C. maenas* pointed to alterations at molecular and biochemical levels in the Barrosa specimens. The presence of these early warning signs in crabs is an indication of possible toxicity effects (Moore 1988). The deteriorated conditions of the inner branch appear to induce the enzymatic antioxidant defenses, expressed through the increased activity of CAT, GPx and GST. An increase in the activity of antioxidant enzymes could reflect an adaptation to a repeated pulsed exposure to toxics, conferring increased protection from oxidative stress. Induction of CAT and GPx provides an indication of higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the hepatopancreas of the Barrosa specimens, suggesting the presence of redox-active contaminants. In this context, the role of Cr cannot be overlooked as discussed below. Glutathione S-transferase can play a dual defensive role in cells catalyzing the phase II conjugation of reactive metabolites of organic compounds or the reduction of organic hydroperoxides by GSH (GST of  $\alpha$  class) and thus also acting as GPx (Cnubben *et al.* 2001). Considering the unaltered GSH<sub>t</sub> levels, enzymatic antioxidants, namely GSH-dependent enzymes, seem to be the first line of defense against contaminants in Barrosa. Increased activities of CAT, GPx, and GST have been described in several aquatic species from sites impacted both by metal and organic contaminants (Di Giulio *et al.* 1993, Stephensen *et al.* 2000). Particularly, the hepatopancreas of *C. maenas* showed an *in situ* induction of GST activity, which was associated with metal levels (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, and Pb) in sediments (Martín-Díaz *et al.* 2008), whereas induction of GPx was related to Cr and Pb, as well as to organic contaminants in the same study. Induction of GST and GPx was also recorded in crabs exposed to contaminated sediments, under laboratory conditions, and associated with the presence of metals and organic contaminants (Martín-Díaz *et al.* 2007). Despite the activation of those defense mechanisms, female crabs did not cope efficiently with ROS production since peroxidative damage was observed, which highlights the state of environmental degradation of the inner branch.

The induction of oxidative stress in the hepatopancreas of crabs from Barrosa was not followed by significant increases

estos indicios de alerta temprana en los cangrejos es una advertencia de posibles efectos tóxicos (Moore 1988). Las deterioradas condiciones del brazo interno parecen inducir las defensas antioxidantes enzimáticas, expresadas a través de un incremento en la actividad CAT, GPx y GST. Un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes puede reflejar una adaptación a una exposición recurrente a tóxicos, otorgando una mayor protección contra el estrés oxidativo. La inducción de la actividad CAT y GPx es indicación de una mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el hepatopáncreas de los especímenes de Barrosa, lo que sugiere la presencia de contaminantes activos de redox. En este contexto no se puede ignorar el papel del Cr, como se discute a continuación. El GST puede jugar un doble papel defensor en las células catalizando la conjugación de la fase II de los metabolitos reactivos de compuestos orgánicos o la reducción de hidroperóxidos orgánicos por GSH (GST de clase  $\alpha$ ), y por tanto también actuando como GPx (Cnubben *et al.* 2001). Considerando los niveles de GSH<sub>t</sub> inalterados, los antioxidantes enzimáticos, en particular las enzimas dependientes de GSH, parecen ser la primera línea de defensa contra los contaminantes en Barrosa. Se han descrito aumentos en las actividades CAT, GPx y GST en varias especies acuáticas de sitios impactados tanto por contaminantes orgánicos como por metales (Di Giulio *et al.* 1993, Stephensen *et al.* 2000). En particular, el hepatopáncreas de *C. maenas* mostró una inducción *in situ* de la actividad GST, que se asoció con los niveles de metales (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn y Pb) en el sedimento (Martín-Díaz *et al.* 2008), mientras que en ese mismo estudio la inducción de GPx se relacionó con el Cr y Pb, así como con los contaminantes orgánicos. También se registró una inducción de actividad GST y GPx en cangrejos expuestos a sedimentos contaminados, en condiciones de laboratorio, la cual se asoció con la presencia de metales y contaminantes orgánicos (Martín-Díaz *et al.* 2007). A pesar de la activación de tales mecanismos de defensa, los cangrejos hembras no manejaron de forma eficiente la producción de ROS ya que se observó daño peroxidativo, lo que pone de manifiesto el estado de degradación ambiental del brazo interno.

La inducción del estrés oxidativo en el hepatopáncreas de los cangrejos capturados en Barrosa no fue seguida por un incremento significativo en los niveles de metales, excepto en el caso del Cr que mostró una correlación positiva ( $r = 0.84$ ) con las TBARS (fig. 3). Aunque el Cr puede aumentar la generación intracelular de ROS a través de reacciones tipo Fenton (Winston y Di Giulio 1991, Ahmad *et al.* 2005, 2006), los niveles de estos contaminantes en el hepatopáncreas de los cangrejos fueron bajos en comparación con especímenes de ambientes contaminados (Pedersen *et al.* 1997, MacFarlane *et al.* 2006) o expuestos a sedimentos contaminados de estuarios españoles (Martín-Díaz *et al.* 2006). La mayor disponibilidad de metales en Barrosa aparentemente no fue suficiente para registrar incrementos en los niveles del hepatopáncreas; por tanto, no fue posible establecer una relación directa causa-efecto entre las respuestas biológicas y la acumulación de metales en el hepatopáncreas de *C. maenas*.





**Figure 3.** Relationship between accumulated Cr in *Carcinus maenas* and lipid peroxidation (TBARS measurement).

**Figura 3.** Relación entre el Cr acumulado en *Carcinus maenas* y la peroxidación lipídica (medición de TBARS).

in metal levels, except for Cr that showed a positive correlation ( $r = 0.84$ ) with TBARS (fig. 3). Although Cr can enhance intracellular ROS generation via Fenton-like reactions (Winston and Di Giulio 1991, Ahmad *et al.* 2005, 2006), the accumulated levels in crab hepatopancreas were low in comparison with specimens from contaminated environments (Pedersen *et al.* 1997, MacFarlane *et al.* 2006) or crabs exposed to contaminated sediments from Spanish estuaries (Martín-Díaz *et al.* 2006). Presumably, enhanced availability of metals in Barrosa was insufficient to record increases in levels of crab hepatopancreas. Consequently, no direct cause-effect relationship could be established between biological responses and metal accumulation in crab hepatopancreas.

The additive and synergetic action between metals or with other toxics should be hypothesized in the induction of oxidative stress (Livingston 2001). The accumulated effects have been demonstrated in the laboratory for Cr, Cu, and polycyclic aromatic hydrocarbons (Ahmad *et al.* 2005, 2006) and observed in field studies (Nimptsch *et al.* 2005, Lima *et al.* 2006). A relation between the higher levels of nitrogenous compounds in Barrosa and the observed oxidative stress evidence should be considered, since it has been established that these compounds may also induce biochemical responses. It has been suggested that ammonia and nitrite can be important sources of pro-oxidants for fishes, mussels, and aquatic plants, leading to the production of nitric radicals (Das *et al.* 2004, Lima *et al.* 2006, Nimptsch and Pflugmacher 2007). In aquatic plants, the toxicity of ammonia was described as a complex phenomenon, involving the decrease in pH resulting from the excess of intracellular  $H^+$  originated by the enhanced  $NH_4^+$  content (Nimptsch and Pflugmacher 2007). In fishes, exposure to nitrite was reported to cause anoxia in tissues due to methemoglobinemia (Das *et al.* 2004).

In summary, the applied battery of biological responses pointed to toxic effects at biochemical levels in crabs from the impacted inner branch of Óbidos Lagoon and eventual ecological risk for autochthonous populations. However, cause-effect relationships between pressures and biological responses were difficult to establish under these field conditions.

Es recomendable considerar la acción aditiva y sinérgica entre los metales o con otros tóxicos en la inducción del estrés oxidativo (Livingston 2001). Se han demostrado los efectos acumulados del Cr, el Cu y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el laboratorio (Ahmad *et al.* 2005, 2006) y se han observado en el campo (Nimptsch *et al.* 2005, Lima *et al.* 2006). Debería de considerarse una relación entre los mayores niveles de compuestos nitrogenados en Barrosa y la evidencia de estrés oxidativo observada, ya que se ha establecido que estos compuestos también pueden inducir respuestas bioquímicas. Se ha sugerido que el amoníaco y los nitritos pueden ser importantes fuentes de prooxidantes para peces, mejillones y plantas acuáticas, resultando en la producción de radicales nítricos (Das *et al.* 2004, Lima *et al.* 2006, Nimptsch y Pflugmacher 2007). En las plantas acuáticas se ha descrito la toxicidad del amoníaco como un fenómeno complejo que involucra una disminución en pH a causa del exceso de  $H^+$  intracelular originado por un mayor contenido de  $NH_4^+$  (Nimptsch y Pflugmacher 2007). En peces, la exposición al nitrito produce anoxia en los tejidos debido a la metemoglobinemia (Das *et al.* 2004).

En resumen, las respuestas biológicas estudiadas indicaron efectos tóxicos a niveles bioquímicos en cangrejos de un brazo interno impactado de la Laguna de Óbidos y un eventual riesgo ecológico para las poblaciones autóctonas; sin embargo, no fue posible establecer relaciones causa-efecto entre presiones y respuestas biológicas bajo estas condiciones de campo.

### Agradecimientos

La primera autora fue apoyada por una beca doctoral de la Fundación para la Ciencia y Tecnología de Portugal (FCT, No. SFRH/BD/17616/2004).

Traducido al español por Christine Harris.

### Acknowledgements

The first author acknowledges receipt of a Ph.D. fellowship from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT, grant No. SFRH/BD/17616/2004).

### References

- Ahmad I, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. 2005. *Anguilla anguilla* L. Oxidative stress biomarker responses to copper exposure with or without  $\beta$ -naphthoflavone pre-exposure. *Chemosphere* 61: 267–275.
- Ahmad I, Maria VL, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to  $\beta$ -naphthoflavone. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 608: 16–28.
- Astley KN, Meigh HC, Glegg GA, Braven J, Depledge MH. 1999. Multivariate analysis of biomarker responses in *Mytilus edulis* and

- Carcinus maenas* from the Tees Estuary (UK). Mar. Pollut. Bull. 39: 145–154.
- Baeta A, Cabral HN, Neto JM, Marques JC, Pardal MA. 2005. Biology, population dynamics and secondary production of the green crab *Carcinus maenas* (L.) in a temperate estuary. Estuar. Coast. Shelf Sci. 65: 43–52.
- Caetano M, Fonseca N, Cesário R, Vale C. 2007. Mobility of Pb in salt marshes recorded by total content and stable isotopic signature. Sci. Total Environ. 380: 84–92.
- Carrit DE, Carpenter JH. 1966. Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining oxygen in sea water. J. Mar. Res. 24: 286–318.
- Carvalho S, Moura A, Gaspar MB, Pereira P, Cancela da Fonseca L, Falcão M, Drago T, Leitão F, Regala J. 2005. Spatial and inter-annual variability of macrobenthic communities within a coastal lagoon (Óbidos Lagoon) and its relationship with environmental parameters. Acta Oecol. 27: 143–159.
- Carvalho S, Gaspar MB, Moura A, Vale C, Antunes P, Gil O, Cancela da Fonseca L, Falcão M. 2006. The use of the marine biotic index AMBI in the assessment of the ecological status of the Óbidos Lagoon (Portugal). Mar. Pollut. Bull. 52: 1414–1424.
- Claiborne A. 1985. Catalase activity. In: Greenwall RA (eds.), CRC Handbook of Methods in Oxygen Radical Research. CRC Press, Boca Raton, pp. 283–284.
- Cnubben NHP, Rietjens IMCM, Wortelboer H, van Zanden J, van Bladeren PJ. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Environ. Toxicol. Pharmacol. 10: 141–152.
- Das PC, Ayyappan S, Das BK, Jena JK. 2004. Nitrite toxicity in Indian major carps: Sublethal effects on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*. Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 138: 3–10.
- Davison W, Zhang H. 1994. *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. Nature 367: 546–548.
- Di Giulio RT, Habig C, Gallagher EP. 1993. Effect of black rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. Aquat. Toxicol. 26: 1–22.
- Ferreira A, Cortesão C, Castro O, Vale C. 1990. Accumulation of metals and organochlorines in tissues of the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado Estuary. Sci. Total Environ. 97/98: 627–639.
- Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA. 2006. The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. Mar. Environ. Res. 61: 326–338.
- Filho DW, Tribess T, Gáspari C, Cláudio FD, Torres MA, Magalhães ARM. 2001. Seasonal changes in antioxidant defences of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). Aquaculture 203: 149–158.
- Gornall AC, Bardawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751–766.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130–7139.
- IPIMAR. 2006. Caracterização da Lagoa de Óbidos e do emissário submarino da Foz do Arelho. Relatório Final (Janeiro 2006–Outubro 2006) (in Portuguese).
- Laffon B, Aldao I, Pérez-Cadahía B, Pasaro E, Méndez J. 2006. First step in the evaluation of the effects of *Prestige* oil on the shore environment: Availability, bioaccumulation and DNA damage. Cienc. Mar. 32: 389–399.
- Lillebø AI, Neto JM, Flindt MR, Marques JC, Pardal MA. 2004. Phosphorus dynamics in a temperate intertidal estuary. Estuar. Coast. Shelf Sci. 61: 101–109.
- Lima I, Moreira SM, Osten JR, Soares AMVM, Guilhermino L. 2006. Biochemical responses of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* to petrochemical environmental contamination along the north-western coast of Portugal. Chemosphere 66: 1230–1242.
- Livingston DR. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42: 656–666.
- MacFarlane GR, Schreider M, McLennan B. 2006. Biomarkers of heavy metal contamination in the red-fingered marsh crab, *Parasesarma erythodactyla*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51: 584–593.
- Martín-Díaz ML, Riba I, Casado-Martinez MC, DelValls TA. 2006. Bioavailability of metals in sediments from Spanish estuaries using *Carcinus maenas*. Cienc. Mar. 32: 412–420.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA. 2007. Biomarkers study for sediment quality assessment in Spanish ports using the crab *Carcinus maenas* and the clam *Ruditapes philippinarum*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53: 66–77.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, Sales D, DelValls TA. 2008. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. Environ. Pollut. 151: 631–640.
- Mohandas J, Marshall JJ, Duggins GG, Horvath JS, Tiller D. 1984. Differential distribution of glutathione and glutathione related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic neuropathy. Cancer Res. 44: 5086–5091.
- Moore MN. 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46: 81–89.
- Morales-Caselles C, Martín-Díaz ML, Riba I, Sarasquete C, DelValls TA. 2008. Sublethal responses in caged organisms exposed to sediments affected by oil spills. Chemosphere 72: 819–825.
- Nimptsch J, Pflugmacher S. 2007. Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. Chemosphere 66: 708–714.
- Nimptsch J, Wunderlin DA, Dollar A, Pflugmacher S. 2005. Antioxidant and biotransformation enzymes in *Myriophyllum quitense* as biomarkers of heavy metal exposure and eutrophication in Suquia River basin (Córdoba, Argentina). Chemosphere 61: 147–157.
- Oliveira A, Fortunato AB, Rego JRL. 2006. Effect of morphological changes on the hydrodynamics and flushing properties of the Óbidos Lagoon (Portugal). Cont. Shelf Res. 26: 917–942.
- Pedersen SN, Lundebye A-K, Depledge H. 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. Aquat. Toxicol. 37: 183–200.
- Point D, Monperrus M, Tessier E, Amouroux D, Chauvaud L, Thouzeau G, Jean F, Amice E, Grall J, Leynaert A, Clavier J, Donard OFX. 2007. Biological control of trace metal and organometal benthic fluxes in a eutrophic lagoon (Thau Lagoon, Mediterranean Sea, France). Estuar. Coast. Shelf Sci. 72: 457–471.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Biol. Med. 2: 321–336.
- Stephensen E, Svavarsson J, Sturve J, Ericson G, Adolfsson-Erici M, Förlin L. 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. Aquat. Toxicol. 48: 431–442.

- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.
- Verardo DJ, Froelich PN, McIntyre A. 1990. Determination of organic carbon and nitrogen in marine sediments using the Carlo Erba NA-1500 Analyzer. *Deep-Sea Res.* 37: 157–165.
- Walker CH, Livingstone DR. 1992. *Persistent Pollutants in Marine Ecosystems*. SETAC Spec. Publ., Pergamon Press, Oxford.
- Winston GW, Di Giulio RT. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19: 137–161.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3rd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

*Recibido en febrero de 2008;*  
*aceptado en julio de 2008.*