

Induction of metallothioneins in *Mullus barbatus* as specific biomarker of metal contamination: A field study in the western Mediterranean

Inducción de metalotioneínas en *Mullus barbatus* como biomarcador específico de contaminación metálica: Estudio de campo en el Mediterráneo occidental

J. Benedicto*
C. Martínez-Gómez
J. Campillo

Instituto Español de Oceanografía
Centro Oceanográfico de Murcia
Varadero 1
30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain
* E-mail: benedicto@mu.ieo.es

Recibido en junio de 2003; aceptado en julio de 2004

Abstract

Red mullet (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758) is one of the fish species used as bioindicator in the Mediterranean Pollution Monitoring Programme (MEDPOL). This paper presents the results of a field study on the induction of hepatic metallothioneins (MT) in red mullet as specific biomarker of metal contamination. Specimens of *M. barbatus* were collected in six areas with different degrees of anthropogenic activities along the Iberian Mediterranean coast. The environmental exposure to heavy metals of the populations was determined through the analyses of surface sediments collected in each study area. The MT levels obtained showed statistically significant differences between areas, but not between specimens of different sex. Furthermore, the highest MT levels were found in the most polluted areas. Hepatic MT levels in red mullet reflect the metal contamination present in surface sediments, especially for Cu, for which a significant linear regression was found. The MT levels are better correlated with Cu and Cd concentrations than with Zn and Hg concentrations. The MT values obtained in this study are the first to be reported for this species in the Iberian Mediterranean and they should help in the interpretation of MT levels and to establish MT background levels for *M. barbatus* in the western Mediterranean.

Key words: biomarker, heavy metals, metallothioneins, Mediterranean Sea, *Mullus barbatus*.

Resumen

El salmónete de fango (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758) es una de las especies utilizadas como bioindicador en el Programa de Seguimiento de la Contaminación del Mar Mediterráneo (MEDPOL). Este trabajo presenta los resultados de un estudio de campo sobre la inducción hepática de metalotioneínas (MT) en salmónete de fango como biomarcador específico de contaminación metálica. Los especímenes de *M. barbatus* fueron capturados en seis áreas de la costa Mediterránea Ibérica con diferentes grados de actividad antropogénica. La exposición de las poblaciones a la contaminación metálica se determinó analizando los sedimentos superficiales de cada una de las áreas de estudio. Los niveles de MT obtenidos mostraron diferencias significativas entre áreas pero no entre especímenes de diferente sexo. Además, los mayores niveles de MT registrados correspondieron a las áreas más contaminadas. Los niveles de MT reflejan la contaminación metálica existente en los sedimentos superficiales, especialmente por cobre, para el que se demostró la existencia de una regresión lineal significativa. Los niveles de MT están mejor correlacionados con cobre y cadmio, que con zinc y mercurio. Los niveles de MT obtenidos en este estudio son los primeros medidos en esta especie en el Mediterráneo Ibérico y podrán ayudar a interpretar los niveles hepáticos de MT así como a establecer los niveles basales para *M. barbatus* en el Mediterráneo occidental.

Palabras clave: biomarcador, Mediterráneo, metales pesados, metalotioneínas, *Mullus barbatus*.

Introduction

Pollution of the marine environment with heavy metals from land-based sources (industrial, agriculture, mining, etc.) is one of the specific problems of the Iberian Mediterranean

Introducción

La contaminación del medio marino por metales pesados provenientes de fuentes terrestres (industria, agricultura, minería, etc.) es uno de los problemas específicos de la costa

coast that needs to be addressed. A topic of research that has received considerable attention in the last years is the binding of metals by metallothioneins. Metallothioneins (MT) are cytosolic, low molecular weight, metal-binding proteins that appear to be present in virtually all vertebrates and invertebrates. MT synthesis is induced by the exposure of organisms to excess levels of common metal ions such as Cu, Zn, Cd, Hg, Co, Ni and Ag (Bucheli and Fent, 1995). The mechanism of metal detoxification by MT occurs via metal-initiated transcriptional activation of MT genes (Hogstrand and Haux, 1991). Although under normal conditions only Cu and Zn appear to be associated with MT, a wide range of metal ions can bind to MT *in vitro* or after excess exposure (Nielson *et al.*, 1985). Microcosm experiments have demonstrated that fish spending some time in a polluted area will accumulate pollutants and will display biological effects which can be documented by biomarker analyses such as MT, cytochrome P₄₅₀ proteins (CYP1A) and 7-ethoxyresorufin O-deethylase hepatic activity (EROD) (Goksoyr *et al.*, 1996). The induction of hepatic MT levels in fish due to heavy metal exposure is a well-established biomarker (George and Olsson, 1994), and it is included in several monitoring programmes (JAMP/OSPAR, MEDPOL/PAM) as an early indicator of biological effects of metal pollution. The use of MT for pollution monitoring is based on the assumption that an increased level is primarily caused by exposure to contaminants (Hylland *et al.*, 1998).

Red mullet, *Mullus barbatus*, is a demersal fish associated with muddy sediments and recommended for use as bioindicator in the Mediterranean Pollution Biomonitoring Programme (MEDPOL) (UNEP/RAMOG, 1999). For the study of biological effects of pollution, the use of a biomarker test battery is recommended to determine the global effects on the target species. Studies carried out using *M. barbatus* have already shown that this fish is a good bioindicator for monitoring CYP1A, EROD, acetyl cholinesterase (AChE), catalase, glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase, glutathione peroxidase and DT-diaphorase activities, as well as DNA adducts (Mathieu *et al.*, 1991; Burgeot *et al.*, 1994, 1996). Several projects have evaluated the suitability of MT as biomarker of metal pollution in marine fish (Chang, 1995; Hylland *et al.*, 1992, 1996); however, few works have been published in which this biomarker has been applied to *M. barbatus*.

In order to differentiate nonlethal responses to anthropogenic perturbations from natural variability, it is necessary to establish baseline databases for each type of biochemical measurement that is used (Engel, 1988). On the other hand, field validation is essential for the application of any biochemical or physiological index as a biomonitoring tool. Taking into account these premises, the aim of our study is to measure hepatic MT in *M. barbatus* from several areas along the Iberian Mediterranean coast and to assess the possible correlation between MT levels in each area and the metal burdens in the total fraction of surface sediment.

Mediterránea Ibérica que debe ser considerado prioritario. Un tema que ha recibido mucha atención en los últimos años es la capacidad de las metalotioneínas de complejar metales pesados. Las metalotioneínas (MT) son proteínas citosólicas de bajo peso molecular que están virtualmente presentes en todos los organismos vertebrados e invertebrados. La exposición de organismos a concentraciones altas de iones metálicos, tales como cobre, zinc, cadmio, mercurio, cobalto, níquel y plata, induce la síntesis de MT (Bucheli y Fent, 1995). El mecanismo de detoxificación metálica de estas metaloproteínas se produce a través de la activación transcripcional de los genes MT, iniciada por la presencia de iones metálicos (Hogstrand y Haux, 1991). Aunque en condiciones normales, sólo cobre y zinc parecen estar asociados con las MT, en condiciones *in vitro* o tras exposición excesiva, es mayor el número de iones metálicos que pueden unirse a las MT (Nielson *et al.*, 1985). Experimentos en microcosmos han demostrado que cuando los peces permanecen tiempo en áreas contaminadas acumulan contaminantes y desarrollan efectos biológicos que pueden ser detectados mediante el análisis de biomarcadores tales como las MT, las proteínas del citocromo P₄₅₀ (CYP1A) y la actividad hepática 7-etoxiresorufin O-deetilasa (EROD) (Goksoyr *et al.*, 1996). La inducción de las MT en el hígado de peces es actualmente un biomarcador de exposición a metales pesados, aceptado (George y Olsson, 1994) e incluido en varios programas de biomonitorio (JAMP/OSPAR, MEDPOL/PAM) como una primera señal de alarma de la existencia de efectos biológicos debidos a la contaminación metálica. El uso de las MT en el monitoreo de la contaminación está basado en la premisa de que el aumento de sus niveles se debe principalmente a la exposición metálica (Hylland *et al.*, 1998).

El salmonete de fango, *Mullus barbatus*, es un pez demersal, asociado con fondos fangosos, y su uso como bioindicador está incluido en el Programa de Biomonitorio de la Contaminación del Mediterráneo (MEDPOL) (UNEP/RAMOG, 1999). Con el fin de determinar los efectos biológicos globales de la contaminación sobre cualquier especie clave se recomienda utilizar series de biomarcadores. Los estudios realizados con *M. barbatus* han demostrado que esta especie es un buen bioindicador para el monitoreo del CYP1A, de las actividades EROD, acetil colinesterasa (AChE), glutathione S-transferasa (GST), catalasa, superóxido dismutasa, glutathione peroxidasa y DT-diaforasa, así como para comprobar la existencia de daños en el ADN (Mathieu *et al.*, 1991; Burgeot *et al.*, 1994, 1996). La capacidad de las MT como biomarcador de contaminación metálica en peces marinos ha sido evaluada en diferentes estudios (Chang, 1995; Hylland *et al.*, 1992, 1996); sin embargo, son escasos los trabajos en los que este biomarcador haya sido aplicado en *M. barbatus*.

Con el fin de diferenciar las respuestas no letales a las perturbaciones antrópicas de la variabilidad natural inherente, es necesario establecer bases de datos para cada tipo de biomarcador que sea utilizado (Engel, 1988). Por otro lado, la aplicación correcta de cualquier índice bioquímico o fisiológico como herramienta de monitoreo necesita su validación previa en

Material and methods

Specimens of *M. barbatus* were caught by trawling during the postspawning season (October 1999) in six areas along the Iberian Mediterranean coast exposed to different degrees of anthropogenic activities (fig. 1). Collected specimens were immediately sacrificed, sexed, weighed, their length measured and liver removed. Sexual maturity was determined on board. Liver samples were stored in liquid nitrogen. Ten livers were used for MT analysis in each group studied for each area. At each study area, sediment samples were collected using a box-corer to determine metal contents. The number of sediment samples for each area were unequal due to logistic reasons (Portman = 9, C. Palos = 9, Segura River mouth = 12, Tabarca Island = 4, Castellón = 9 and Columbretes Islands = 9). Water bottom temperature and salinity were also recorded.

Sediment samples were lyophilized, dried at room temperature and the <2-mm fraction was separated. Once the total fraction was dried at 105°C to constant weight, the sample was digested in a microwave oven system using Teflon reactors. For Hg determination, 0.5 g of sample was digested with 3 mL of 65% nitric acid applying the following programme: 40 psi for 2 min and 100 psi for 15 min. For Cu, Cd and Zn, 0.5 g of sample were digested with 1 mL of aqua regia and 5 mL of hydrofluoric acid, applying the following programme: 50 psi for 5 min and 100 psi for 10 min. The quantitative analyses were carried out by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer model 4110 ZL), using graphite furnace (Cd),

estudios de campo. Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo de nuestro estudio fue medir los niveles hepáticos de MT en *M. barbatus* de diferentes áreas a lo largo de la costa mediterránea ibérica y establecer la posible correlación entre los niveles de MT y la carga metálica existente en la fracción total del sedimento superficial.

Material y métodos

Los ejemplares de *M. barbatus* fueron capturados durante la época de pospuesta (octubre de 1999), mediante arrastre de fondo, en seis áreas de la costa Mediterránea Ibérica expuestas a diferentes grado de perturbación antrópica (fig. 1). Los especímenes fueron inmediatamente sacrificados, medidos, pesados y su sexo determinado, diseccionándose el hígado. El estado de maduración sexual fue determinado a bordo. Las muestras hepáticas fueron almacenadas en nitrógeno líquido. Para realizar los análisis de MT se utilizaron 10 hígados en cada grupo estudiado. En cada área de muestreo se tomaron muestras de sedimento utilizando una draga tipo *box-corer* con el fin de determinar su contenido metálico. El número de muestras de sedimentos tomado para cada zona fue desigual debido a razones logísticas (Portman = 9, C. Palos = 9, Desembocadura del Río Segura = 12, Isla de Tabarca = 4, Castellón = 9 e Islas Columbretes = 9). También se registró la temperatura y la salinidad del agua en el fondo.

Las muestras de sedimentos fueron liofilizadas y secadas a temperatura ambiente, separándose la fracción <2 mm. Una vez que la fracción total fue secada a 105°C, hasta peso constante, la muestra fue digerida en un horno de microondas utilizando reactores de teflón. Para la determinación del Hg, se digirió una submuestra de 0.5 g con 3 mL de ácido nítrico al 65%, aplicando el siguiente programa: 40 psi durante 2 min y 100 psi durante 15 min. Para el resto de los elementos (Cu, Cd y Zn) se digirieron submuestras de 0.5 g con 1 mL de agua regia y 5 mL de ácido fluorhídrico, aplicando el siguiente programa: 50 psi durante 5 min y 100 psi durante 10 min. Los análisis cuantitativos se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Modelo 4110 ZL) con cámara de grafito (para el Cd), técnica de llama (para Cu y Zn) y técnica de vapor frío para el Hg. Cada muestra de sedimento se midió por duplicado. La precisión del método analítico fue evaluada y controlada utilizando materiales de referencia certificados (PACS-1, BCSS-1 y CRM-277) y participando en un ejercicio de intercalibración organizado por la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA-405).

Para extraer las MT, se lavaron fracciones purificadas de hígado en una solución fría de CIK al 1.15% y se homogeneizaron en un tubo homogeneizador de teflón-vidrio Potter-Elvehjem refrigerado con hielo, mediante seis golpes de un émbolo de teflón a una velocidad de 3500 rpm, utilizando un tampón de homogeneización (20% glicerol [v/v], 0.1 mM de PMSF, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 50 mM de Tris-Cl [pH 7.8]) en una proporción de 1:5, p:v. El homogeneizado crudo se centrifugó a 30,000 g, durante 20 min a 4°C, y la

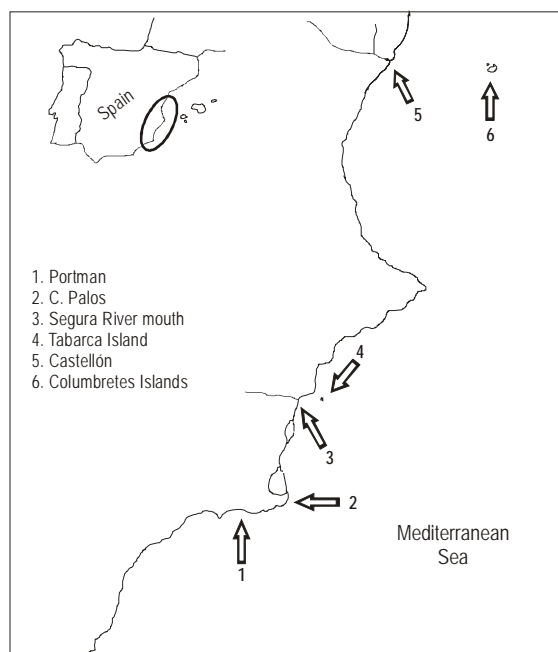


Figure 1. Location of the sampling areas. Cabo de Palos, Tabarca Island and Columbretes Islands are considered marine reserves.

Figura 1. Localización de las áreas de muestreo. Cabo de Palos, Isla de Tabarca e Islas Columbretes son consideradas Reservas Marinas de pesca.

flame (Cu and Zn) and cold vapour (Hg). Each sediment sample was measured in duplicate. The accuracy of the analytical procedures was tested and controlled using certified reference material (PACS-1, BCSS-1 and CRM-277) and participating in the intercomparison exercise IAEA-405 organized by the International Agency of Atomic Energy.

To extract the MT, purified liver fractions were washed in cold 1.15% KCl solution and homogenized with six vertical strokes at 3500 rpm in a Potter-Elvehjem teflon-glass homogenizer tube on ice using a homogenization buffer (20% glycerol [v/v], 0.1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 50 mM Tris-Cl [pH 7.8]) in a ratio of 1:5, w:v. The crude homogenate was centrifuged at 30,000 g for 20 min at 4°C, and the partially purified fraction obtained was used to quantify MT. MT content was measured applying a spectrophotometric assay method (Viarengo *et al.*, 1997; UNEP/RAMOGGE, 1999) modified for fish, based on the estimation of the sulfhydryl content of MT protein using Ellman's reagent (Ellman, 1959). MT levels were determined by assuming its molecular weight to be 6000 DA (Livingstone, 1993). The accuracy of the analytical procedures was tested by participating in the intercomparison exercise organized by Piemonte University, under the direction of Dr. A. Viarengo within the framework of the MEDPOL programme.

To eliminate the effect of specimen size on MT content (Benedicto *et al.*, 2001; Rotchell *et al.*, 2001), only data for specimens in the 14–18 cm size range were used. A confidence limit of 95% was established in the statistical analysis. Differences in hepatic MT levels in *M. barbatus* of different gender and collected from different areas were tested statistically using two-way ANOVA on \log_e -transformed data. For each gender, differences in MT levels between areas was tested applying one-way ANOVA (Sokal and Rohlf, 1981). Differences in metal concentrations in sediment samples from different areas were also tested using one-way ANOVA. In all cases where significant differences were found ($P < 0.05$), the Student-Newman-Keuls (SNK) test was applied in a pairwise comparison. The relationships between the metal mean concentrations in sediment and MT mean levels in each area were evaluated using multiple regression analysis on \log_e -transformed data using hepatic MT levels as dependent variable (Snedecor and Cochran, 1980). In addition, the relationships between sediment metal content (Cu, Zn, Cd and Hg) and MT levels in specimens from the same area were evaluated using Pearson's regression analysis (Siegel, 1956). Statistical treatments also included cluster analysis (CA), using the Bray-Curtis similarity index (SI). Statistical methods were performed using PRIMER v.5.2 and SPSS v.9 software.

Results

Hepatic MT levels in *M. barbatus*, expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ of hepatic tissue, and metal concentrations (mean \pm standard deviation) in the total fraction of sediment collected in each area, referred to a 1% COOX and expressed in $\mu\text{g g}^{-1}$ dry

fracción obtenida, parcialmente purificada, se utilizó para la cuantificación de MT. El contenido de MT se midió aplicando el método espectrofotométrico (Viarengo *et al.*, 1997; UNEP/RAMOGGE, 1999), modificado para peces, basado en la estimación del contenido de los grupos sulfhidrilos de las MT mediante el uso del reactivo de Ellman (Ellman, 1959). Los niveles de MT se determinaron suponiendo que el peso molecular de esta proteína en peces es de 6000 DA (Livingstone, 1993). La precisión del procedimiento analítico fue evaluada a través de la participación en el ejercicio de intercalibración organizado por la Universidad de Piemonte, bajo la dirección del Dr. A. Viarengo, dentro del marco del programa MEDPOL.

Para eliminar el efecto de la talla sobre el contenido de MT (Benedicto *et al.*, 2001; Rotchell *et al.*, 2001) sólo se utilizaron los datos de los especímenes comprendidos dentro del intervalo de 14 a 18 cm. En los análisis estadísticos se estableció un límite de confianza del 95%. Las diferencias en los niveles hepáticos en *M. barbatus* de distinto sexo y de diferente área se evaluaron aplicando a los datos transformados logarítmicamente un ANOVA de dos factores. Las diferencias en los niveles de MT entre áreas, para cada género, se estudió aplicando un ANOVA de un factor (Sokal y Rohlf, 1981). Las diferencias entre las concentraciones metálicas de las muestras de sedimentos de diferentes áreas se evaluó aplicando un ANOVA de un factor. En todos los casos en los que se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) se aplicó la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK) de comparación por parejas. La relación entre la concentración media de metales en el sedimento y los niveles medios de MT en cada una de las áreas se evaluó aplicando Análisis de Regresión Múltiple sobre los datos transformados logarítmicamente, utilizando los niveles hepáticos de MT como variable dependiente (Snedecor y Cochran, 1980). Además, la relación entre las concentraciones de los metales considerados (Cu, Zn, Cd y Hg) en los sedimentos y los niveles de MT en cada una de las poblaciones se evaluó aplicando el análisis del coeficiente de regresión de Pearson (Siegel, 1956). Los tratamientos estadísticos también incluyen análisis de agrupamiento (CA) con medida del índice de similitud de Bray-Curtis (SI). Los métodos estadísticos se realizaron utilizando los programas PRIMER v.5.2 y SPSS v.9.

Resultados

Los resultados de los niveles hepáticos de MT en *M. barbatus*, expresados como $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido hepático, y las concentraciones de metales (media \pm error estándar) en la fracción total del sedimento de cada una de las áreas, referidas a un 1% de COOX y expresadas como $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco, se presentan en la tabla 1. El ANOVA de dos factores mostró diferencias significativas en los niveles de MT entre áreas ($P = 0.000$) pero no entre especímenes de diferente sexo ($P = 0.068$) procedentes de una misma área. El ANOVA de un factor mostró, para ambos sexos, la existencia de diferencias significativas entre los niveles de MT obtenidos en Cabo de Palos (hembras, $P = 0.001$; machos, $P = 0.001$) y las otras áreas estudiadas (fig. 2).

Table 1. Metal concentrations in sediments (referred to a 1% organic carbon content) and metallothionein (MT) levels for both genders of *Mullus barbatus*. *n** = sample size of sediment; *n*** = sample size of red mullet.

Tabla 1. Concentración de metales en sedimento (referida a un contenido del 1% de carbono orgánico), y niveles de MT. *n**: número de muestras de sedimentos; *n*** : número de muestras de *Mullus*.

Areas	<i>n</i> *	Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w.)	Cd	Cu	Zn	<i>n</i> **	MT females	MT males
Portman	9	0.191 ± 0.011	0.878 ± 0.237	22.26 ± 2.66	839.11 ± 277.89	10	183.02 ± 20.08	
C. Palos	9	0.038 ± 0.003	0.114 ± 0.008	7.20 ± 0.31	51.76 ± 4.58	10	97.22 ± 18.12	85.11 ± 21.03
Segura mouth	12	0.073 ± 0.013	0.183 ± 0.009	15.03 ± 0.82	46.75 ± 3.62	10	147.89 ± 11.04	121.03 ± 11.76
Tabarca I.	4	0.098 ± 0.019	0.141 ± 0.002	14.04 ± 1.98	50.625 ± 5.86	10	165.64 ± 8.85	176.26 ± 18.27
Castellón	9	0.045 ± 0.002	0.128 ± 0.002	9.05 ± 0.27	38.42 ± 1.34	10	141.09 ± 5.11	115.05 ± 13.78
Columbretes I.	9	0.020 ± 0.001	0.079 ± 0.002	8.98 ± 0.48	34.46 ± 0.54	10	140.32 ± 19.73	125.85 ± 21.13

weight, are presented in table 1. The two-way ANOVA showed significant differences in MT levels between areas ($P = 0.000$), but not between specimens of different sex ($P = 0.068$) from the same areas. For both genders, the one-way ANOVA showed significant differences in MT levels obtained in Cabo

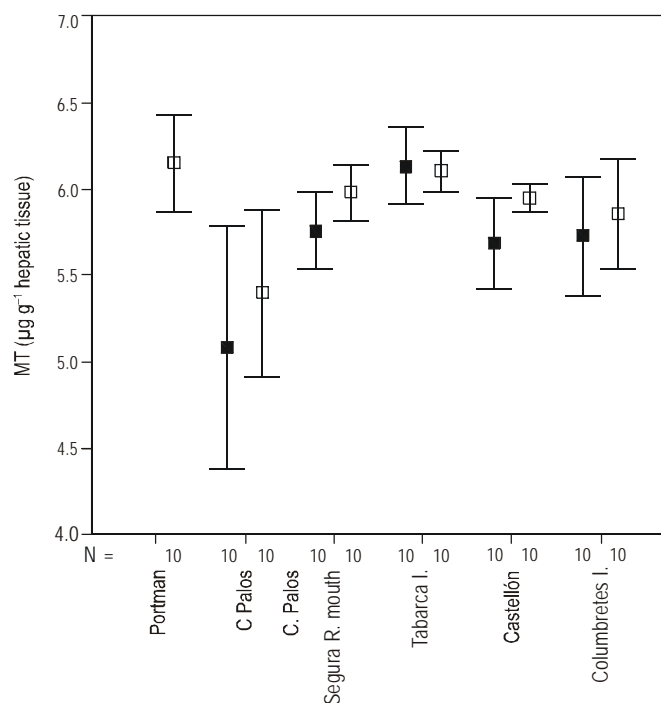


Figure 2. Hepatic metallothionein (MT) mean content of red mullet (*Mullus barbatus*) on the Iberian Mediterranean coast. Error bars are 95% confidence intervals from \log_e -transformed data. White squares are referred to metallothionein data in female red mullet and black squares are referred to metallothionein data in males. *N* = number of organisms analyzed from each area.

Figura 2. Niveles medios de MT en salmonete de fango de la costa Mediterránea Ibérica. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95% sobre los datos transformados logarítmicamente. Los cuadros blancos están referidos a los datos de hembras y los cuadros negros a los de machos. *N* = número de organismos analizados por cada área.



Figure 3. Cluster analysis and Bray-Curtis similarity index for Cd, Cu, Zn, Hg and metallothionein (MT) content in female red mullet.

Figura 3. Análisis de agrupamiento e índice de similaridad de Bray-Curtis para los niveles de Cd, Cu, Zn, Hg y metalotioneínas en hembras.

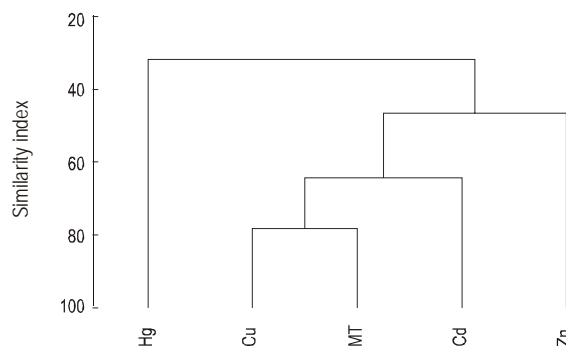


Figure 4. Cluster analysis and Bray-Curtis similarity index for sampling stations: 1 = Portman, 2 = Cabo de Palos, 3 = Segura River mouth, 4 = Tabarca Island, 5 = Castellón and 6 = Columbretes Islands.

Figura 4. Análisis de agrupamiento e índice de similaridad de Bray-Curtis para las áreas de muestreo: 1 = Portman, 2 = Cabo de Palos, 3 = Desembocadura del Río Segura, 4 = Isla Tabarca, 5 = Castellón y 6 = Islas Columbretes.

Las concentraciones más altas para los cuatro metales analizados se encontraron en Portman y las más bajas en las Islas Columbretes, excepto para el Cu, cuyos valores más bajos se encontraron en Cabo de Palos. Los resultados obtenidos con el test SNK muestran la existencia de subconjuntos homogéneos significativos entre áreas en relación a las concentraciones de

de Palos (females, $P = 0.001$; males, $P = 0.001$) and the other study areas (fig. 2). The highest concentrations for the four metals analyzed were found in Portman and the lowest were found in Columbretes Islands, except for Cu, which showed the lowest concentration in Cabo de Palos. The results obtained with the SNK test showed the existence of significant homogeneous subsets among areas with regard to metal concentrations and MT content (table 2). The results of the SNK test were confirmed by the application of CA, grouping the variable "area" according to metal concentrations and MT levels. The CA showed that areas were divided into several groups, the Portman area being the most differentiated (fig. 3). All the previous results show the existence of a gradient of contamination concentrations and of MT levels. The application of CA to MT, Cd, Cu, Zn and Hg revealed that MT levels are better correlated with Cu and Cd ($SI = 78\%$ and 62% , respectively) than with Zn or Hg concentrations (fig. 4). This fact explains why MT levels in Cabo de Palos were lower than in Columbretes Islands, in spite of the fact that the metal load was greater in Cabo de Palos, with the exception of Cu (table 1).

In a multiple regression of MT levels against Cu, Zn, Cd and Hg in female red mullet, Cu alone explained most of the variation resulting from the four metals in the regression

metales en los sedimentos y los niveles de MT (tabla 2). Los resultados del test SNK fueron confirmados con los resultados del CA, agrupando la variable "área" con respecto a las concentraciones de metales y los niveles de MT. El CA mostró que las áreas pueden agruparse en varios subconjuntos, siendo Portman el área más diferenciada de todas (fig. 3). Todos estos resultados previos demuestran la existencia de un gradiente de contaminación y de niveles de MT. La aplicación de un CA para MT, Cd, Cu, Zn y Hg reveló que los niveles de MT están mejor correlacionados con las concentraciones de Cu y Cd ($SI = 78\%$ y 62% , respectivamente) que con las de Zn o Hg (fig. 4). Este hecho explica porqué los niveles de MT en Cabo de Palos fueron menores que en Islas Columbretes, a pesar de que la carga metálica contaminante de los sedimentos era mayor en Cabo de Palos, excepto para el Cu (tabla 1).

El análisis de regresión múltiple, de los niveles de MT en ejemplares hembras frente a las concentraciones de Cu, Zn, Cd y Hg en los sedimentos, muestra que el Cu explica por sí solo la mayoría de la variabilidad resultante de los cuatro metales en la regresión ($r = 0.860$, $P < 0.028$). Este resultado fue confirmado por el análisis de correlación simple paramétrica de los niveles de MT frente a las concentraciones de Cu, Cd, Zn y Hg en los sedimentos. Los niveles de MT correlacionaron mejor

Table 2. Homogeneous subsets applying the SNK test (harmonic mean was used as group size).

Tabla 2. Subconjuntos homogéneos aplicando el test de SNK (se usó la media armónica como tamaño de grupo).

		Subset for $\alpha = 0.05$							
		1	2		3	4			
Cd	Columbretes	$P = 1.000$	C. Palos Castellón Tabarca	$P = 0.403$	Castellón Tabarca Segura mouth	$P = 0.095$	Portman	$P = 1.000$	
Cu	C. Palos Columbretes Castellón	$P = 0.069$	Tabarca Segura mouth	$P = 0.437$	Portman	$P = 1.000$			
Hg	Columbretes	$P = 1.000$	C. Palos Castellón Segura mouth	$P = 0.064$	Tabarca	$P = 0.220$	Portman	$P = 1.000$	
Zn	Columbretes Castellón Segura mouth Tabarca C. Palos	$P = 0.396$	Portman	$P = 1.000$					
MT	C. Palos	$P = 1.000$	Columbretes Castellón Segura mouth Tabarca Portman	$P = 0.458$					

($r = 0.860$, $P < 0.028$). This result was supported by a parametric correlation analysis of MT levels against Cu, Cd, Zn and Hg. MT levels correlated better with Cu ($r = 0.740$, $P = 0.028$) than with Cd ($r = 0.368$, $P = 0.202$) or Zn ($r = 0.276$, $P = 0.284$) (fig. 5).

The temperature and salinity of the bottom water during the sampling were as follows: Portman, 16.11°C and 37.38; Cabo de Palos, 14.88°C and 38.06; Segura River mouth, 20.35°C and 37.51; Tabarca Island, 20.23°C and 37.65; Castellón, 20.85°C and 38.02; and Columbretes Islands, 18.53°C and 36.89. The temperature values showed differences between areas of up to 5°C. Salinity values were homogeneous in all sampling areas (37.72 ± 0.05 SE). Pearson correlation analyses of salinity and water temperature with MT mean values were not significant ($P = 0.541$ and $P = 0.382$, respectively).

Discussion

In a review of the available literature, a correlation between sediment metal concentrations and hepatic MT levels in fishes (Hylland *et al.*, 1992) has not always been evident; however, this might be due to the effects of spawning migration, differences in contaminated diets or a combination of both factors. Seasonal differences in hepatic MT observed can be associated with an increased influx of Zn in relation to vitellogenesis. Previous works done with *M. barbatus* have shown that MT levels increase considerably in the prespawning period, mainly in female specimens (Benedicto *et al.*, 2001). In our field experiment, where the fish were sampled during a non-sexual

con Cu ($r = 0.740$, $p = 0.028$) que con Cd ($r = 0.368$, $p = 0.202$) o Zn ($r = 0.276$, $p = 0.284$) (fig. 5).

Los valores de temperatura y salinidad del agua del fondo en el momento del muestreo fueron los siguientes: Portman, 16.11°C y 37.38; Cabo de Palos, 14.88°C y 38.06; desembocadura del Río Segura, 20.35°C y 37.51; Isla de Tabarca, 20.23°C y 37.65; Castellón, 20.85°C y 38.02; e Islas Columbretes, 18.53°C y 36.89. La diferencia de temperatura del agua del fondo entre áreas fue de hasta 5°C. Los valores de salinidad fueron homogéneos en todas las áreas de muestreo (37.72 ± 0.05 EE). Los análisis de correlación de Pearson para la temperatura y salinidad del agua de fondo con los niveles medios de MT no fueron significativos ($P = 0.541$ y $P = 0.382$, respectivamente).

Discusión

En la revisión de la bibliografía existente no siempre es evidente la correlación entre las concentraciones de metales en los sedimentos y los niveles de MT en peces (Hylland *et al.*, 1992). Sin embargo, este hecho puede deberse a los efectos de las migraciones durante la época reproductora, a diferencias cuando las dietas están contaminadas o a una combinación de ambos factores. Las diferencias estacionales en los niveles hepáticos observados pueden estar asociadas a un incremento del influjo de Zn en relación con la vitelogénesis. Estudios previos realizados con *M. barbatus* han demostrado que los niveles de MT aumentan considerablemente en el periodo de prepuesta, principalmente en las hembras (Benedicto *et al.*, 2001). En este trabajo de campo, en el que los peces fueron capturados durante un periodo de reposo sexual, hemos podido establecer la existencia de una correlación significativa entre los niveles de MT en salmonete de fango y el contenido en metales pesados en los sedimentos. En Portman, donde se registraron los niveles más altos de metales, los especímenes capturados presentaron también los niveles más altos de MT, mientras que en Columbretes y Cabo de Palos, donde los niveles de metales pesados en el sedimento fueron los más bajos, se registraron los niveles más bajos de MT, tanto en especímenes machos como en hembras. El resultado obtenido en este estudio, en el que los niveles de MT correlacionan mejor con los niveles de Cu, también había sido observado por otros autores (Hogstrand *et al.*, 1991; Rotchell *et al.*, 2001). Bajo condiciones de exposición crónica a altos niveles de metales pesados, las MT hepáticas pueden aumentar sus niveles en cuatro o cinco veces, aunque los más comunes son incrementos de dos a tres veces en la mayoría de los sistemas (Hogstrand y Haux, 1992; Hylland *et al.*, 1992). En nuestro estudio, los niveles medios más altos de MT fueron casi del doble que los niveles más bajos encontrados, tanto para machos como para hembras.

No se encontraron indicios claros de la influencia del sexo sobre las concentraciones de MT en *M. barbatus* muestreado durante el periodo de postpuesta. Esta observación está de acuerdo con la realizada por otros autores en peces marinos

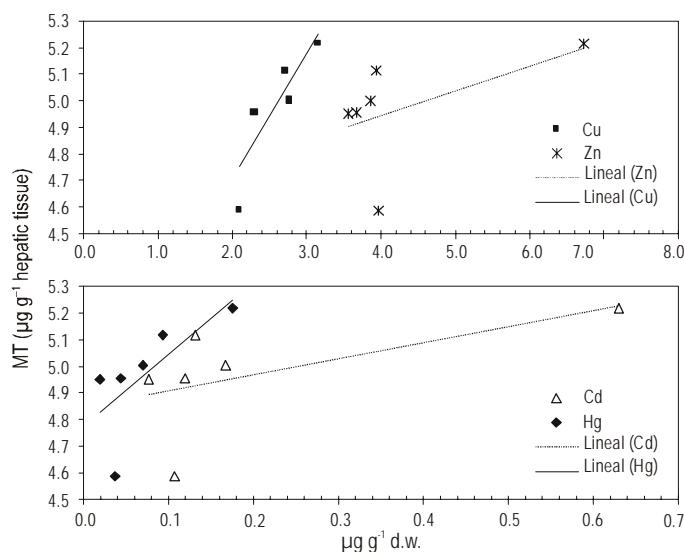


Figure 5. Parametric correlation analysis on \log_{10} -transformed data of metallothionein (MT) levels against Cu, Cd, Zn and Hg. Cu ($r = 0.740$, $P = 0.028$), Cd ($r = 0.368$, $P = 0.202$), Zn ($r = 0.276$, $P = 0.284$).

Figura 5. Análisis de correlación paramétrico, sobre los datos transformados logarítmicamente, de los niveles de MT frente a los de Cu, Cd, Zn y Hg. Cu ($r = 0.740$, $P = 0.028$), Cd ($r = 0.368$, $P = 0.202$), Zn ($r = 0.276$, $P = 0.284$).

maturation period, a significant correlation was established between MT levels in red mullet and heavy metal content in sediments. At Portman, where the highest metal sediment concentrations were found, specimens collected showed the highest mean hepatic MT levels, while at Columbrete Islands and Cabo de Palos, where the lowest metal sediment levels were found, the mean MT levels had the lowest values for both females and males. Our finding that MT correlates best with Cu has also been observed in others studies (Hogstrand *et al.*, 1991; Rotchell *et al.*, 2001). Under chronic exposure to high metal levels, hepatic MT can increase four- to five-fold, although two- to three-fold increases are more common in most systems (Hogstrand and Haux, 1992; Hylland *et al.*, 1992). In our study, the highest mean MT levels were about double that of the lowest mean, for both females and males.

There were no obvious indications of sex influence on the hepatic concentrations of MT in red mullet sampled in the postspawning period. This is in accordance with that observed by others authors in fish (Linde *et al.*, 1999). In other studies, where sex influence on MT levels was identified, it was shown that specimens had been sampled during different periods of sexual maturation (Hylland *et al.*, 1998) or during the prespawning period (Hylland *et al.*, 1992).

There are some indications that temperature (Olsson *et al.*, 1996, in Hylland *et al.*, 1998) may affect MT levels in marine fish. An increase in MT levels with decreasing temperature has been observed in other fish species (Olsson *et al.*, 1996, in Hylland *et al.*, 1998; Rotchell *et al.*, 2001). However, the results of our study did not show such a relationship between bottom water temperature and MT levels. The lowest MT levels were found in Cabo de Palos, where the temperature was lowest (14.88°C). In Castellón, where the highest temperature value was registered, MT levels were relatively high. Our study did not provide evidence for the influence of temperature and salinity on MT levels of *M. barbatus*.

One may ask whether the presence of some other kind of contamination is distorting the real effect of metal contamination on MT levels registered in the study areas. Several authors suggest that high sediment levels of pesticides and organic contaminants inhibit the uptake and accumulation of metals in fish (Brown *et al.*, 1982; Cofino *et al.*, 1992). The effects of such pollutants on metal uptake, or on fish MT levels, are not clear. Recent studies indicate that MT induction in fish should be considered a general stress response, particularly sensitive to heavy metals (Viarengo *et al.*, 1999). Other authors have observed that differences in hepatic MT levels in *Limanda limanda* were not affected by the impact of organic compounds (George and Young, 1986; Ariyoshi *et al.*, 1990). The possible influence of these factors on our results is being evaluated at present by determining organic compounds and pesticides in surface sediments and fish muscle tissues.

If we consider Cabo de Palos as a reference area from a metal contamination point of view, the background MT levels for *M. barbatus* collected in postspawning period would fit

(Linde *et al.*, 1999). En otros estudios, en los que ha sido identificada la influencia del sexo sobre los niveles de MT, se ha comprobado que los especímenes habían sido muestreados durante diferentes periodos de maduración sexual (Hylland *et al.*, 1998) o durante el periodo de prepuesta (Hylland *et al.*, 1992).

Existen algunas evidencias (Olsson *et al.*, 1996, en Hylland *et al.*, 1998) de que la temperatura del agua puede afectar los niveles de MT en peces marinos. En otras especies de peces se ha observado un aumento de los niveles de MT con una disminución de la temperatura (Olsson *et al.*, 1996, en Hylland *et al.*, 1998; Rotchell *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no han demostrado tal relación entre la temperatura del agua del fondo y los valores de MT registrados. Los valores más bajos de MT se registraron en Cabo de Palos, donde la temperatura fue la más baja (14.88°C). En Castellón, donde los niveles de MT eran relativamente altos se registraron los valores más altos de temperatura. Nuestro estudio no proporciona evidencias de la posible influencia de la temperatura y salinidad sobre los niveles de MT en *M. barbatus*.

Uno puede preguntarse si la presencia de algún otro tipo de contaminación está distorsionando el efecto real de la contaminación metálica sobre la inducción hepática de MT en las áreas estudiadas. Varios autores sugieren que la existencia de altos niveles de pesticidas y contaminantes orgánicos inhiben la toma y acumulación de metales en peces (Brown *et al.*, 1982; Cofino *et al.*, 1992). Los efectos de tales contaminantes sobre la captación de metales, o sobre los niveles de MT en peces, no están claros. Estudios recientes indican que la inducción de MT en peces debería ser considerada como una respuesta de estrés general, particularmente sensible a los metales pesados (Viarengo *et al.*, 1999). Otros autores han observado que las diferencias en los niveles hepáticos de MT en *Limanda limanda* no resultaban afectadas por el impacto de compuestos orgánicos (George y Young, 1986; Ariyoshi *et al.*, 1990). Las posibles influencias de estos factores sobre nuestros resultados están siendo evaluadas actualmente mediante la determinación de los compuestos orgánicos y pesticidas en el sedimento superficial y en el tejido muscular de los ejemplares.

Si consideramos Cabo de Palos como un área de referencia desde el punto de vista de contaminación metálica, los niveles base de MT en *M. barbatus* durante el periodo de postpuesta estarían dentro del rango de $90.96 \pm 4.28 \mu\text{g g}^{-1}$ hígado. Estos niveles concuerdan con los valores obtenidos en *Platichthys flesus*, $79 \pm 17 \mu\text{g g}^{-1}$ hígado, en una estación de referencia situada en el Estuario del Forth, Escocia (Sulaiman *et al.*, 1991). Además, en un estudio reciente (Lionetto *et al.*, 2001) se ha encontrado que los niveles de MT en *M. barbatus*, procedentes de ambientes marinos limpios de Italia, oscilan dentro del rango de 29 a $85 \mu\text{g g}^{-1}$ hígado.

Como se mencionó anteriormente, estudios anteriores han demostrado que la respuesta de los biomarcadores puede resultar afectada por factores bióticos y abióticos, tales como la estacionalidad, la temperatura, el sexo, el estado nutricional y

within the range of $90.96 \pm 4.28 \mu\text{g g}^{-1}$ liver. This level is in accordance with the value obtained for *Platichthys flesus*, $79 \pm 17 \mu\text{g g}^{-1}$ liver, from a reference site located in the Forth Estuary, eastern Scotland (Sulaiman *et al.*, 1991). Besides, in a recent study (Lionnetto *et al.*, 2001), hepatic MT levels in *M. barbatus*, from Italian clean marine environments, ranged from 85 to $29 \mu\text{g g}^{-1}$ liver.

As mentioned above, previous studies have shown that the response of biomarkers may be affected by abiotic and biotic factors. A recent study with *P. flesus* demonstrated that for MT, 50–60% of total variability could be explained by factors directly related to season, gender and maturation state (Hylland *et al.*, 1998). By removing the influence of age class, season and maturation state on the variation in MT, it becomes possible to demonstrate more clearly the relationship between MT levels and metals recorded in sediment (Rotchell *et al.*, 2001). In this study, in which we have controlled all these factors, we can conclude that MT is a good biomarker of heavy metal contamination in *M. barbatus*, showing significant differences between areas located along a contamination gradient. Our results are the first to be reported for red mullet from the Iberian Mediterranean coast and they should help in further interpretations of MT levels and related biological effects, as well as to establish MT background levels for *M. barbatus* in the western Mediterranean.

Acknowledgements

We wish to thank the Secretariat General of Fishery of the Ministry of Agriculture, Fishery and Food for financial support of this research.

References

- Ariyoshi, T., Shiiba, S., Hasegawa, H. and Arizono, K. (1990). Profile of metal-binding proteins and hemo-oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 643–649.
- Benedicto, J., Martínez-Gómez C., Campillo, J.A., Martínez, F. and Marull, E. (2001). Influence of biotic factors on metallothionein levels in *Mullus barbatus* collected from the Iberian Mediterranean coast. *Rapp. Comm. Int. Expl. Sci. Mer Médit.*, 36: 182.
- Brown, D.A., Jenkins, K.D., Perkins, E.M., Gosset, R.W. and Hershelman, G.P. (1982). Detoxification of metals and organic compounds in white croakers. In: W. Bascom (ed.), *Coastal Water Research Project, Biennial Report. 1981–1982*. Long Beach, California, pp. 157–172.
- Bucheli, T.D. and Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker of environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25: 201–241.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Truquet, P., Le Deau, L. and Galgani, F. (1994). Induction of EROD activity in red mullet (*Mullus barbatus*) along the French Mediterranean coast. *Sci. Total Environ.*, 142: 231–220.
- Burgeot, T., Bocquéné, G., Porte, C., Dimeet, I., Santella, R.M., García de la Parra, L.M., Pihol-Leshowicz, A., Raoux, C. and Galgani, F. (1996). Bioindicators of pollutant exposure in the northwest Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131: 125–141.
- Chang, K.M. (1995). Metallothionein: Potential biomarker for monitoring of heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, 31: 4–12.
- Cofino, W.P., Smedes, F., de Jong, S.A., Abarnou, A., Whinnet, J.A., Schmiolt, D. and Wilson, S. (1992). The Chemistry Programme. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 47–56.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70–77.
- Engel, D.W. (1988). The effect of biological variability on monitoring strategies: Metallothioneins as an example. *Water Resour. Bull.*, 24(5): 981–987.
- George, S.G. and Young, P. (1986). The time course of effects of cadmium and 3-methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83C: 37–44.
- George, S.G. and Olsson, P.E. (1994). Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In: K.I.M. Kramer (ed.), *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*. CRC Press, Boca Raton, pp. 151–171.
- Goksoyr, A., Beyer, J., Egaas, E., Grsvik, B.E., Hylland, K., Sandvik, M. and Skaare, J.V. (1996). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Mar. Pollut. Bull.*, 33: 36–45.
- Hogstrand, C. and Haux, C. (1991). Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 137–141.
- Hogstrand, C. and Haux, C. (1992). Metallothionein as an indicator of heavy-metal exposure in two subtropical fish species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 139: 69–84.

Agradecimientos

Agradecemos a la Secretaría General de Pesca Marítima, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el apoyo y financiamiento de este trabajo de investigación.

Traducido al español por los autores.

- Hogstrand, C., Lithner, G. and Haux, C. (1991). The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacol. Toxicol.*, 68: 492–501.
- Hylland, K., Haux, C. and Hogstrand, C. (1992). Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 89–96.
- Hylland, K., Sandvik, M., Skre, J., Beyer, J., Egaas, E. and Goksoyr, A. (1996). Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): An evaluation of their use in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.*, 42: 223–360.
- Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P.G. and Sandvik, M. (1998). Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder *Platichthys flesus*, L. *Mar. Environ. Res.*, 46(1–5): 51–55.
- Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., Kleiun, D., García-Vázquez, E. and Summer, H. (1999). Metallothionein and heavy metal in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): A comparative study. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 44: 168–173.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Carriacato, R., Pascariello, M.F., Maronosci, L. and Schettino, T. (2001). Biomonitoring of heavy metal contamination along the Salento coast (Italy) by metallothionein evaluation in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus*. *Aquat. Conserv. Mar. Freshwat. Ecosyst.*, 11: 305–310.
- Livingstone, D.R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 57: 195–211.
- Mathieu, A., Lemaire, P., Carrière, S., Draï, P., Giudicelli, J. and Lafaurie, M. (1991). Seasonal and sex-linked variations in hepatic and extrahepatic biotransformation activities in striped mullet (*Mullus barbatus*). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 22: 45–47.
- Nielson, K.B., Atkin C.L. and Winge, D.R. (1985). Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.*, pp. 5342–5350.
- Rotchell, J.M., Clark, K.R., Newton, L.C. and Bird, D.J. (2001). Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination. Age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Environ. Res.*, 52: 151–171.
- Siegel, S. (1956). *Non-parametric Statistics for the Behavioural Sciences*. McGraw-Hill, New York.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. (1980). *Statistical Methods*. 7th ed. Iowa State Univ. Press, Ames.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. W.H. Freeman, New York.
- Sulaiman, N., George, S. and Burke, M.D. (1991). Assessment of sublethal pollutant impact on flounders in an industrialised estuary using hepatic biochemical indices. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 63: 207–212.
- UNEP/RAMOGÉ, (1999). *Manual on the biomarkers recommended for the MEDPOL Biomonitoring Programme*.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. and Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for MT evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44(1): 69–84.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. and Fabbri, R. (1999). Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4(6): 455–466.