

**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA  
FACULTAD DE  
BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE  
ECOLOGÍA  
E HIDROLOGÍA**

**ANÁLISIS  
ECOTOXICOLÓGICO  
INTEGRADO DE LA  
CONTAMINACIÓN  
MARINA EN LOS  
SEDIMENTOS DE LA  
COSTA DE MURCIA:  
EL CASO  
DE PORTMÁN,  
SUDESTE – ESPAÑA**

**AUGUSTO CESAR**

**MURCIA, 2003**



ISBN 978-84-692-3916-2

Reservados todos los derechos  
© El autor  
Universidad de La Rioja

Logroño, 2009

Universidad de La Rioja  
Biblioteca Universitaria  
C/ Piscinas s/n  
26006 LOGROÑO  
LA RIOJA – ESPAÑA

E-mail: [dialnet@unirioja.es](mailto:dialnet@unirioja.es)  
Página web: [dialnet.unirioja.es](http://dialnet.unirioja.es)

**ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO INTEGRADO  
DE LA CONTAMINACIÓN MARINA EN LOS  
SEDIMENTOS DE LA COSTA DE MURCIA:  
EL CASO DE PORTMÁN, SUDESTE - ESPAÑA**

**AUGUSTO CESAR  
MEMORIA DE TESIS DOCTORAL**

**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA E HIDROLOGÍA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE MURCIA – ESPAÑA**

**ENERO DE 2003**



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

TRIBUNAL

Presidente:
Dr/a. Carmen Pérez Sirvent
Vocales:
Dr/a. Ricardo Beiras García Sabell
Dr/a. Julio Mas Hernández
Dr/a. Tomás Angel Del Valle
Vocal Secretario:
Dr/a. Antonio Juan García Fernández

En la ciudad de Murcia, siendo las 11 horas del día 20 de febrero del año 2003, se reúne el tribunal que se relaciona al margen, nombrado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia según lo previsto en el artº 9 del Real Decreto 778/1998, para calificar la Tesis Doctoral admitida a defensa pública, presentada por D. AUGUSTO CESAR

con el título: "ANÁLISIS ECOTOXICOLÓGICO INTEGRADO DE LA CONTAMINACIÓN MARINA EN LOS SEDIMENTOS DE LA COSTA DE MURCIA: EL CASO DE PORTMAN, SUDESTE-ESPAÑA",

dirigida por el/los Dr/es. D. ARNALDO AITOR MARIN ATUCHA

y bajo la responsabilidad del Departamento de Ecología e Hidrología

Vista la labor preparatoria, contenido, conclusiones, las aportaciones originales así como la opinión de los miembros de este Tribunal y, contestadas por el doctorando, en su caso, las cuestiones y objeciones formuladas, este Tribunal en sesión secreta otorga la CALIFICACIÓN DE:

- SOBRESALIENTE CUM LAUDE POR UNANIMIDAD
SOBRESALIENTE CUM LAUDE (mínimo 4 votos)
SOBRESALIENTE
NOTABLE
APROBADO
NO APTO

Por ello, en prueba de su conformidad, firman el acta los cinco miembros del tribunal, en la fecha arriba indicada.

PRESIDENTE [Signature]

VOCAL SECRETARIO [Signature]

Fdo.: Carmen Pérez Sirvent

Fdo.: Antonio Juan García Fernández

VOCAL [Signature]

VOCAL [Signature]

VOCAL [Signature]

Fdo.: Julio Mas Hernández

Fdo.: Tomás Angel Del Valle

Fdo.: Ricardo Beiras García Sabell

Si ha sido necesaria la actuación de algún miembro suplente y no ha sido comunicada a la Comisión General de Doctorado con anterioridad debe ser documentado por el Secretario con un anexo al acta.



JOSÉ BALLESTA GERMÁN, RECTOR MAGNÍFICO DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

CERTIFICO:

Que, D. AUGUSTO CESAR nacido el 29 de octubre de 1965, en Campinas-Sao Paulo (Brasil) (), de nacionalidad brasileña, con pasaporte número 00856316, ha superado en esta Universidad con fecha 20 de febrero de 2003, los estudios de Doctorado conducentes al Título universitario oficial de

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(Con la Calificación de Sobresaliente Cum Laude)**

y ha pagado los derechos de expedición del Título.

Y para que surta los mismos efectos del Título, con carácter provisional hasta que éste se edite, expido la presente certificación, a solicitud del interesado, en Murcia, a 4 de marzo de 2003.



*Jose Ballesca*



**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA  
E HIDROLOGÍA**

D<sup>a</sup> María Luisa Suárez Alonso, Profesora Titular de Universidad del Área de Ecología y Directora del Departamento de Ecología e Hidrología, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España”** ha sido realizada por D. Augusto Cesar, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Arnaldo Marín Atucha y que el departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 20 de Diciembre de 2002.

Fdo.: María Luisa Suárez Alonso



**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA  
E HIDROLOGÍA**

D. Arnaldo Marín Atucha, Profesor Titular de Universidad del Área de Ecología y Directora del Departamento de Ecología e Hidrología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España”** realizada por D. Augusto Cesar, bajo mi inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Ecología e Hidrología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de Diciembre de 2002.

Fdo.: Arnaldo Marín Atucha



**UNIVERSIDAD  
DE MURCIA**  
**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA  
E HIDROLOGÍA**

D<sup>a</sup> María Luisa Suárez Alonso, Profesor Titular de Universidad del Área de Ecología y Directora del Departamento de Ecología e Hidrología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: **“Análisis ecotoxicológico integrado de la contaminación marina en los sedimentos de la costa de Murcia: el caso de Portmán, sudeste – España”** realizada por D. Augusto Cesar, bajo mi inmediata tutoría y supervisión en el Departamento de Ecología e Hidrología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 20 de Diciembre de 2002.

Fdo.: María Luisa Suárez Alonso





*Todo el conocimiento sobre los océanos,  
que hemos podido acumular a lo largo de  
la historia nos permite estimar sobretodo  
la magnitud de nuestra ignorancia.*

*Sylvia A. Earle*

A mi madre, mi mujer y a mi hijo

## **Agradecimientos**

En primer lugar, me gustaría expresar los más sinceros agradecimientos a mis queridos abuelos, Tito Lemos y Ivone Carvalho, a mi madre Maria Rita y a mi tío Arlindo Lemos Neto, por enseñarme lo mejor que se puede aprender en esta vida y de la mejor forma posible, con mucho amor y cariño.

A mi mujer, Luciane Ferlin de Oliveira, por acreditar, incentivar, acompañarme y principalmente por haber sido el pilar fundamental para el mantenimiento del esfuerzo, de la motivación y de la esperanza, estando presente en todos los momentos y en todos los aspectos, culminando con la llegada de nuestro amado hijo Daniel.

A Arnaldo Marín Atucha, mi director, por apoyarme y orientarme en todas las fases de esta tesis, por la oportunidad de participar conjuntamente en varios trabajos del grupo que contribuyeron en mi formación y principalmente por estar siempre presente como un verdadero padre en todas las situaciones que he pasado en estos cuatro años, aportando su mayor empeño, disposición, dedicación, amistad y cariño. Gracias por haberme admitido en tu grupo de trabajo y por haberme ayudado tanto en mi desarrollo profesional y sobretodo personal.

A mi hermano español, Pablo Sánchez Jerez, por abrirme las puertas de la investigación, por aconsejarme y ayudarme en diversas etapas de este trabajo, y por todos los buenos momentos que pasamos en la universidad, en la mar, en las fiestas y en los viajes que compartimos por diversos rincones de nuestros queridos países.

A magnífica Rectora de la *Universidade Santa Cecília* (Santos, São Paulo - Brasil), Sílvia Angêla Teixeira Penteadó y a toda la familia Teixeira, por siempre acreditar en mi trabajo y por la oportunidad que me fue dada, de realizar el doctorado aquí en España.

A mi gran maestro Aldo Ramos Santos, Coordinador del *Laboratório de Ecotoxicología* de la *Universidade Santa Cecília*, por su confianza, amistad y por las muchas enseñanzas, que me han ayudado culminar esta gran etapa de mi vida.

A los directores de las *Faculdades de Ciências e Tecnologia, e de Engenharias* de la *Universidade Santa Cecília*, Roberto Patella, Antônio Sales Penteado y Aureo Figueiredo por el apoyo en la realización de este sueño que se torno realidad. De igual manera al Pro-rector Comunitario y al Coordinador de Pos-graduación de la *Universidade Santa Cecília*, Aquilino Vásquez y Celso Volpe respectivamente.

A todos los amigos del *Laboratório de Ecotoxicologia* de la *Universidade Santa Cecília*, Sérgio, Vera, Fernando, Camilo, Raquél, André y Carolina por el incentivo y por la fuerza positiva. De igual manera a los compañeros de la *UNISANTA*, Zélia, Jucemara, Fábio, Gilson, Kátia, Meri, Keni, Roberto, Flori..., o sea, a toda comunidad ceciliana.

A mis amigos y compañeros de batalla, Rubén y Lázaro, por la ayuda y paciencia en diversas ocasiones, sin ellos este trabajo aún no estaría terminado, sin hablar de todas las experiencias que hemos vivido juntos, en los laboratorios, en los cursos, en las salidas de campo, en las múltiples inmersiones, en fin, a la nuestra hermandad, complicidad y trabajo duro, incluso en algunos cuantos días de mal tiempo, festivos y a las tantas de la madrugada.

A todo el equipo del grupo de ecología acuática de la Universidad de Murcia, Blanca, María, Javi, David, Pedro, Barahona, Miguel, Jaime, Sara, Manuela, Andrés y Pepa por la agradable convivencia y colaboración durante estos años.

A Pepa Martínez, por su imprescindible ayuda en los laboratorios del Departamento, siempre presente con mucha sabiduría, experiencia y dedicación. De igual forma a Juan, por la asistencia con toda la documentación administrativa.

A los colaboradores José Bendito, Carmen Rodríguez, Julio Más y a todo el equipo del Instituto Español de Oceanografía (IOE - Murcia), por la oportunidad de participar en las tres campañas oceanográficas a las cuales constituyeron parte de este estudio y también, a Manu por la ayuda con las referencias bibliograficas.

A los compañeros Antonio Juan, Miguel, Emma y Toñi del Departamento de Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, por la ayuda en los análisis de Sulfuros y Metales Pesados.

A Ángel DelValls de la Universidad de Cádiz, por las sugerencias y consejos sobre las técnicas multivariantes para la integración de los resultados y por las valiosas informaciones proporcionadas en diversas fases de este estudio.

A Juan Francisco Ortuño y a Mercedes Lloréns del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la Universidad de Murcia, por facilitar la utilización del Sistema Microtox<sup>®</sup>.

A todos los profesores del Departamento de Ecología y Hidrología de la Universidad de Murcia, en particular a M<sup>a</sup> Rosario Vidal Abarca, María Luisa, José Antonio Palazón, Miguel Ángel Estévez, José Francisco, Andrés Millán, Josefa Velasco, Concepción Marcos y Ángel Pérez Ruzafa, por toda la paciencia en entenderme y por todo el conocimiento transmitido en los cursos de doctorado y en otras ocasiones.

A mis compañeros de curso de doctorado, Mari carmen, Andrés, Marcelo, Martina, David, Laura, Inma, José Luis,... por todo lo que hemos pasado juntos. Igualmente a todos los amigos del Departamento de Ecología e Hidrología, Rosa, Felipe, Toni, Ilu, Jimy, Sandra, Diego, Paqui, Cristina, Maria, Joni, Ana, Guti, Alberto..., por el compañerismo en los buenos y malos momentos.

A mis amigos de dentro y de fuera del agua, Juanma y José Charton, por las agradables inmersiones a las cuales, tuve la oportunidad de compartir sus experiencias y conocimientos de las costas y de las especies Mediterráneas, especialmente a Juanma por la buena convivencia en la peña y por las numerosas ocasiones que tuvimos la oportunidad de trabajar juntos durante estos últimos años, lo que me proporcionó una gran experiencia en actividades de investigación submarina.

A los equipos del Servicio de Microscopia Electrónica, Analítica Instrumental y de Cultivos Celulares del SACE (Sector Apoyo a las Ciencias Experimentales) de la Universidad de Murcia, Maruja, Manoli, Isabel, Delia, Toñi, Pepe, Dori,... por la atención y dedicación en los análisis y por las facilidades en la utilización de sus servicios e instalaciones.

A Philip Tomas de la Universidad de Murcia, por las correcciones gramaticales de Inglés realizada en los artículos científicos de esta tesis y a prácticamente todos los compañeros españoles anteriormente citados por la incansable paciencia en corregirme este particular idioma que mas bien puedo definir como una especie de portuñol que nunca he podido dejar de utilizar.

Al Programa de Becas Mutis del Ministerio de Asuntos Exteriores (Agencia Española de Cooperación Internacional – AECI), por la beca que me fue concedida, que me permitió la realización de este estudio.

A toda la gente que me ha ayudado, los conserjes de la Facultad de Biología, funcionarios del Rectorado, Relaciones Internacionales, Tercer Ciclo, entre otras personas que contribuyeron de una forma u otra en alguna de las etapas de este proyecto. También me gustaría agradecer y disculparme a todas aquellas personas que por omisión involuntaria pudiera no haber nombrado en estas líneas.

Y por último, sin menor importancia, a Neptuno o Poseidón y a *lemanjá* por protegerme y conducirme a través de este fascinante, maravilloso y enigmático Mundo Submarino, a lo cual siempre tuve la fortuna de volver ileso a la superficie y a buen puerto, incluso en situaciones adversas.

*Muito obrigado a todos !*

## Índice

<b>Capítulo 1. Introducción general</b> .....	1
1. Introducción general.....	2
2. Área de estudio y problemática.....	8
3. Identificación y caracterización de los sedimentos.....	17
4. Tests de toxicidad acuática.....	21
5. Bioacumulación.....	28
6. Métodos integrados de evaluación medioambiental.....	30
7. Objetivos generales.....	38
8. Referencias.....	39
<b>Capítulo 2. Test de toxicidad con sedimento marino en costa Mediterránea empleando anfípodos: <i>Gammarus aequicauda</i> y <i>Microdeutopus gryllotalpa</i></b> .....	51
1. Resumen.....	52
2. Abstract.....	53
3. Introducción.....	54
4. Material y métodos.....	55
4.1. Área de estudio.....	55
4.2. Anfípodos, aclimatación y agua.....	56
4.3. Recolección y separación de sedimentos.....	57
4.4. Tests de toxicidad con sedimentos.....	58
4.5. Tests de sensibilidad.....	59
4.6. Análisis estadístico.....	59
5. Resultados.....	60
5.1. Tests de toxicidad con sedimentos.....	60
5.2. Test de sensibilidad.....	63
6. Discusión.....	66
7. Referencias bibliográficas.....	68



---

**Capítulo 3. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins for reference toxicants.....70**

1. Resumen.....	71
2. Abstract.....	72
3. Introduction.....	73
4. Material and methods.....	75
4.1. Collection, holding and acclimation of test organisms.....	75
4.2. Amphipod toxicity tests.....	75
4.3. Sea urchin embryo-larval toxicity test.....	76
4.4. Data analysis.....	78
5. Results.....	79
5.1. Amphipod toxicity tests.....	79
5.2. Sea urchin embryo-larval toxicity test.....	81
6. Discussion.....	85
7. References.....	87

**Capítulo 4. Toxicity and larval accumulation of metals in sea urchins.....92**

1. Resumen.....	93
2. Abstract.....	94
3. Introduction.....	95
4. Materials and Methods.....	97
4.1. Sea urchin embryo-larval toxicity test.....	97
4.2. Scanning electron microscope.....	98
4.3. Data analysis.....	101
5. Results.....	102
5.1. Sea urchin embryo-larval toxicity test.....	102
5.2. Scanning electron microscope.....	102
6. Discussion.....	107
7. References.....	109

---

**Capítulo 5. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: The case of Portmán Bay**.....115

1. Resumen.....	116
2. Abstract.....	117
3. Introduction.....	118
4. Materials and Methods.....	120
4.1. Sample collection and processing.....	120
4.2. Toxicity tests.....	121
4.2.1. Amphipod toxicity tests.....	121
4.2.2. Sea urchin embryo-larval toxicity test.....	122
4.3. Statistical analysis.....	125
4.4. Physical and chemical analysis.....	125
5. Results.....	127
5.1. Toxicity Tests.....	127
5.1.1. Amphipod toxicity tests.....	127
5.1.2. Sea urchin embryo-larval toxicity test.....	129
5.2. Physical and chemical analysis.....	132
6. Discussion.....	133
7. References.....	136

**Capítulo 6. Integrative ecotoxicological assessment of the marine contamination on the Portmán Bay**.....141

1. Resumen.....	142
2. Abstract.....	143
3. Introduction.....	144
4. Material and methods.....	146
4.1. Sample collection and field measurements.....	146
4.2. Sediment chemical and physical analysis.....	149
4.3. Toxicity testing.....	150
4.4. Larval bioaccumulation tests.....	151
4.5. Benthic community analysis.....	152

---

4.6. Statistical analysis.....	153
4.7. Interrelationships between components.....	154
5. Results.....	156
5.1. Sediment chemical and physical analysis.....	156
5.2. Toxicity tests.....	156
5.3. Larval bioaccumulation tests.....	160
5.4. Benthic community analysis.....	161
5.5. Interrelationships between components.....	164
6. Discussion.....	170
7. References.....	174
<b>Capítulo 7. Conclusiones.....</b>	<b>179</b>
1. Conclusiones - Capítulo 2.....	180
2. Conclusiones - Capítulo 3.....	182
3. Conclusiones - Capítulo 4.....	183
4. Conclusiones - Capítulo 5.....	184
5. Conclusiones - Capítulo 6.....	186
<b>Anexos.....</b>	<b>188</b>
Anexo I. Fichas de campo.....	189
Anexo II. Fichas de control.....	190
Modelos fichas de control.....	191
Fichas test de sensibilidad - Anfípodos.....	192
Ficha preparación de concentraciones.....	192
Ficha datos físico-químicos.....	193
Ficha datos biológicos.....	194
Análisis estadístico.....	195

Fichas test con sedimento – Anfípodos.....	196
Ficha de identificación de muestras.....	196
Ficha datos físico-químicos.....	197
Ficha datos biológicos.....	199
Análisis estadístico.....	200
Fichas test de sensibilidad – Erizos.....	203
Ficha preparación de concentraciones.....	203
Ficha datos físico-químicos.....	204
Ficha datos biológicos.....	205
Análisis estadístico.....	206
Fichas test con sedimento – Erizos.....	208
Ficha de identificación de muestras.....	208
Ficha datos físico-químicos.....	208
Ficha datos biológicos.....	209
Análisis estadístico.....	210
Referencias.....	213
 Anexo III. Sumario y criterios de aceptabilidad – Tests de Toxicidad.....	214
- Sumario y criterio de aceptabilidad – Test de toxicidad aguda con el anfípodo <i>Microdeutopus gryllotalpa</i> (A. Costa, 1853).....	215
- Sumario y criterio de aceptabilidad – Test de toxicidad aguda con el anfípodo <i>Gammarus aequicauda</i> (Martinov, 1931).....	216
- Sumario y criterio de aceptabilidad – Test de toxicidad sub-crónico con el erizo <i>Arbacia lixula</i> (Linnaeus, 1758).....	217
- Sumario y criterio de aceptabilidad – Test de toxicidad sub-crónico con el erizo <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816).....	218
- Sumario y criterio de aceptabilidad – Test de toxicidad sub-crónico con el erizo <i>Sphaerechinus granularis</i> (Lamarck, 1816).....	219

Anexo IV. Listado de especies.....	220
Phylum SIPUNCULA.....	221
Phylum MOLLUSCA.....	222
Phylum ANNELIDA.....	224
Phylum ARTHROPODA.....	226
Phylum ECHINODERMATA.....	231
Phylum CHORDATA.....	232

## **Capítulo 1. Introducción general**

## 1. Introducción general

El medio ambiente marino está compuesto por varios mares y océanos que corresponden casi las tres cuartas partes (70,8 %) de la superficie global con un volumen de 1.400 millones de Km<sup>3</sup>, constituyendo el mayor y más importante conjunto de ecosistemas del planeta. Estos ecosistemas en cuanto a sistemas físicos y químicos se van comprendiendo cada vez mejor, y los conocimientos de la vida marina también se van extendiendo progresivamente (Odum, 1972).

La vida en el mar esta directamente afectada por las alteraciones de calidad del agua y de los sedimentos donde habitan la mayor parte de los organismos del planeta e indirectamente por las modificaciones ecológicas consecuentes de la contaminación. Estas alteraciones, denominadas generalmente como polución, son provocadas principalmente por el aumento de las radiaciones ionizantes y modificaciones de carácter físico, químico y biológico en estos ambientes. El fenómeno polución constituye de esta forma, una gran paradoja del propio esfuerzo de la humanidad en generar más recursos y comodidades para su exclusivo provecho. Afortunadamente este progresivo y devastador proceso de desarrollo insostenible puede ser controlado y convertido en sostenible, lo que constituye actualmente uno de los principales desafíos para las sociedades desarrolladas.

Según el artículo 1.4 del Convenio de las Naciones Unidas sobre el Derecho del Mar de 1982, la polución marina, es definida como la introducción por el hombre de sustancias o energía en el mar y en los estuarios, que pueden tener efectos adversos para los recursos biológicos, la salud humana, o producir deterioro de la calidad del agua del mar desde el punto de vista de su utilización y de la reducción de las posibilidades que ofrece para el ocio (GESAMP, 1990). Resumiendo, la polución resulta del desequilibrio entre la entrada o producción y la salida o descomposición de materiales y energía (Margalef, 1986), que causan efectos adversos a la biota.

Los océanos han sido considerados verdaderos sumideros de una variedad de residuos provenientes de las sociedades humanas y que el grande volumen de agua de estos ecosistemas era capaz de diluir y absolver todos estos residuos de forma infinita, así como se creía que los recursos marinos eran inagotables (Nibakken, 2001). En estos últimos años la ciencia viene demostrando que los océanos no poseen esta capacidad infinita de absorber el progresivo aumento de estos vertidos y que el descontrol en la explotación de los recursos marinos está conduciendo al borde de la extinción a diversas especies comercialmente importantes entre muchas otras de menor o mayor importancia ecológica.

Las aguas costeras son espacios de gran productividad, principalmente debido al aporte de materiales producto de la erosión continental. Esta franja costera que se extiende por toda la plataforma continental alberga la gran mayoría de los organismos marinos, incluyendo estas especies comercialmente importantes. Sin embargo, este espacio marítimo inmediato al continente se encuentra sometido a un continuo estrés provocado por la creciente actividad humana, donde actualmente se concentra aproximadamente dos tercios de la población mundial (Albaigés, 1985).

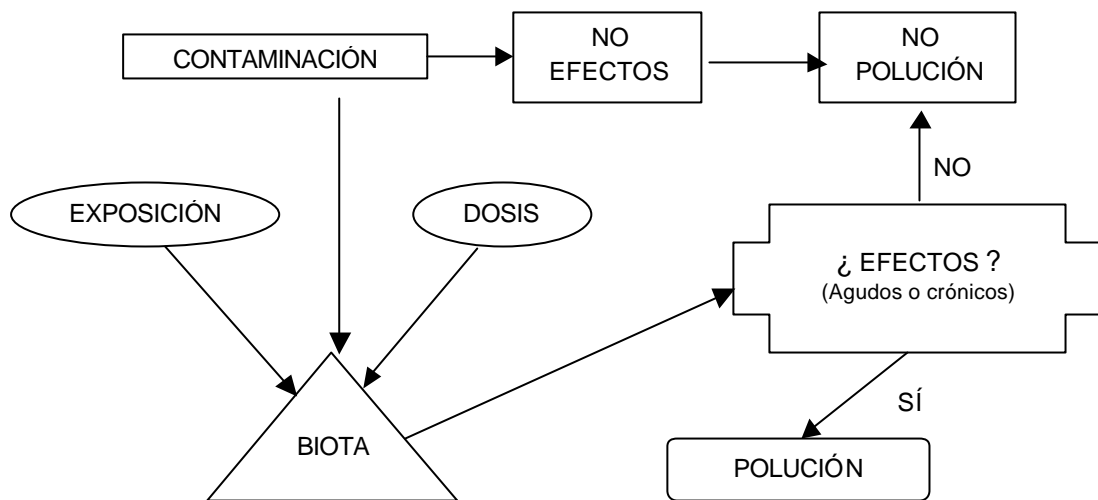
La polución ambiental por agentes químicos ha ocurrido de forma intencional o accidental, principalmente a partir de fuentes no naturales y en consecuencia de la actividad antrópica (Guthrie, 1980). El número de agentes tóxicos está en la orden de centenas de millares, gran parte de ellos poseen potencial para afectar el medio ambiente (Maugh, 1978; Maki, 1985). Por ejemplo, solo en USA, más de 2000 nuevas sustancias sintetizadas son sometidas anualmente a evaluación en la Agencia de Protección Medioambiental Estadounidense. (Newman, 2000). La presencia de esas sustancias, en los diversos ecosistemas, representa siempre un riesgo a los seres vivos, no existiendo la falsa idea de que una determinada sustancia o la mezcla de sustancias sea completamente segura para el medio ambiente (Cairns, 1980). Los ecosistemas costeros presentan una limitada capacidad de asimilación a perturbaciones periódicas o agudas, pero las alteraciones crónicas también pueden ocasionar efectos adversos y persistentes.



Estudios sobre los efectos de los contaminantes a los organismos marinos, ha recibido una gran atención, sobretodo a partir de los años 60, especialmente en Canadá, Estados Unidos, Reino Unido (entre otros países de Europa) con el objetivo de adquirir datos sobre la toxicidad de efluentes y sustancias químicas procedentes de la industria, entre otras fuentes contaminantes (Wells, 1989), como las grandes catástrofes producidas por accidentes de buques petroleros, que infelizmente aún siguen ocurriendo frecuentemente.

El medio acuático y principalmente los sedimentos, son de una forma o de otra los receptáculos temporales o finales de una gran variedad y cantidad de contaminantes, sean estos lanzados en la atmósfera, en el suelo o directamente en el agua que consecuentemente se van acumular en el sedimento, tanto continentales, como oceánicos.

El termino ecotoxicología o toxicología ambiental fue propuesto por Thruhaut en 1969, como una extensión natural de la toxicología, definiéndose como la ciencia que estudia los efectos tóxicos de las sustancias naturales o artificiales sobre la vida de los organismos terrestres o acuáticos (plantas, invertebrados y vertebrados), que constituyen la biosfera. Incluyéndose también el estudio de las interacciones de estos contaminantes con relación al ambiente físico en que estos organismos habitan (Moriarty, 1983; Rand, 1995). La ecotoxicología es un termino relativamente nuevo que se refiere a la integración de la ecología y la toxicología ambiental, siendo considerada la mejor herramienta en la diferenciación entre la contaminación y polución (Chapman, 1995; Fig.1).



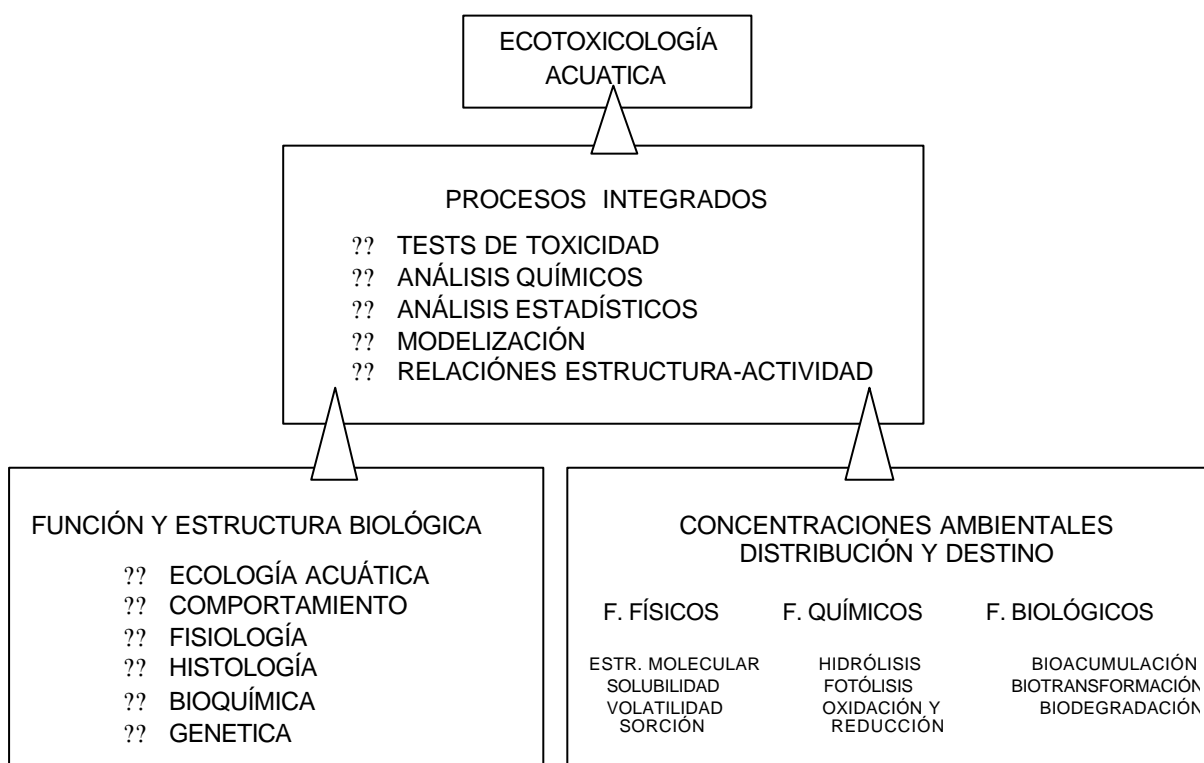
**Figura 1.** Relación entre la contaminación y polución. La ecotoxicología ayuda diferenciar esta relación a través de la determinación de la presencia y ausencia de efectos basados en la exposición y dosis.

A partir de los años 70, los problemas de polución preponderantemente en los medios acuáticos, empezaron a tener grandes repercusiones, juntamente con el inicio de un nuevo periodo de mayor conciencia pública, científica, y gubernamental. Lo que reflejó en un aumento del número de laboratorios que emplean procedimientos ecotoxicológicos dirigidos a la investigación del medio marino y continental. Los primeros laboratorios fueron de las Agencias de Protección Ambiental Estadounidense y Canadiense (Johnstone, 1977). En este período también se empezó a dar más énfasis a los estudios de los efectos subletales (Cole, 1979), a la utilización de nuevas especies-tests (Kenaga, 1978; Buikema y Cairns, 1980), y a la descripción e informatización de métodos estadísticos avanzados para la estimación de la toxicidad (Stephan *et al.*, 1985).

Aunque la ecotoxicología acuática sea una ciencia moderna, ha adquirido en los últimos años una gran relevancia debido a que los resultados de estos estudios suelen tener, en general, un gran impacto en la sociedad y son la base para la formulación de estándares y leyes ambientales.

La evolución de la ecotoxicología como disciplina está relacionada no solo con la toxicología y la ecología, sino también con la utilización de varias otras ciencias dentro de un contexto multidisciplinar integrado (Fig. 2).

Actualmente se nota una creciente aplicación de pruebas biológicas para el control y la protección del medio ambiente, desarrollándose rápidamente en Europa, América del Norte, América del Sur, Japón, Sudeste de Asia, Australia, Nueva Zelanda, entre otras regiones del planeta, lo que viene proporcionando resultados efectivos, principalmente por presentar una excelente relación coste-beneficio, versatilidad, previsibilidad y valor interpretativo (Rand, 1985).



**Figura 2.** Ecotoxicología acuática una ciencia multidisciplinar, según Rand (1995).

Los estudios ecotoxicológicos constituyen importantes herramientas para la monitorización ambiental, pues las informaciones que aportan de los ecosistemas degradados proporcionan subsidios para la comparación, pudiendo generar un diagnóstico más eficaz de los impactos ambientales, así como, en el entendimiento de las relaciones entre la polución y sus efectos a la biota. De esta manera, el conocimiento de la aplicación de los procesos ecológicos en el control de la polución, sumado a la comprensión de las consecuencias de las alteraciones medioambientales, constituyen un instrumento esencial para la toma de decisiones. Dentro de este contexto, los ecólogos y toxicólogos acuáticos deben actuar recíprocamente más frecuentemente, porque la meta de la ecotoxicología acuática es proteger los ecosistemas naturales y sus habitantes (Cairns y Monta, 1990).

La gestión efectiva de la polución depende no solo del tratamiento y control, sino también de la vigilancia apropiada del entorno en general, de modo que sea posible identificar con seguridad cuando se necesita de medidas mitigadoras y si las que existen son suficientes y efectivas.

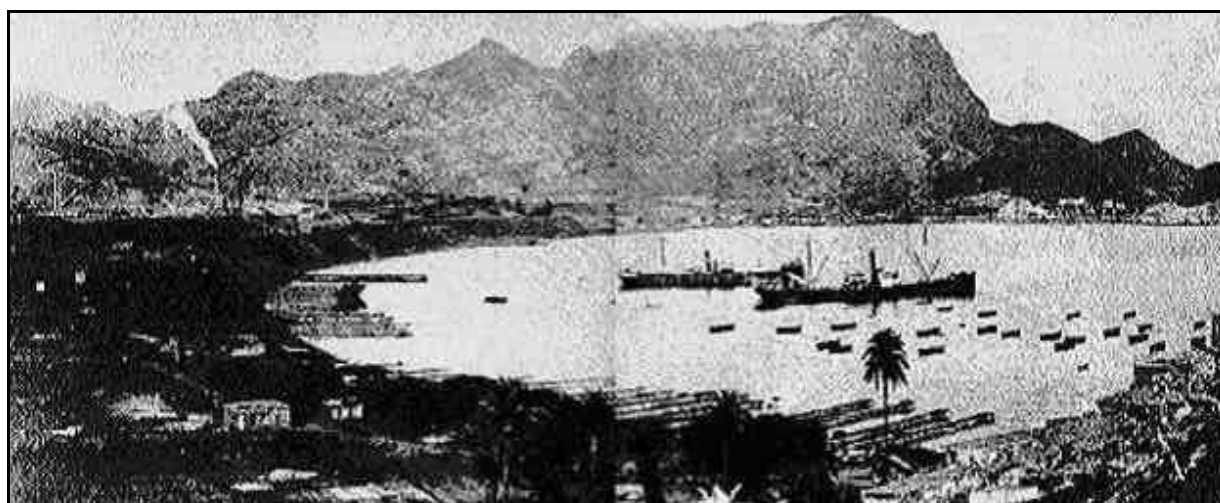
Vivir en el presente constituye la esencia de la existencia en el mar, debido principalmente a la grande imprevisibilidad y complejidad de los factores que determinan constantemente su dinámica (Margalef, 1986).

Sabiendo que la ciencia y la tecnología no son sólo herramientas y estadísticas, y que los nuevos descubrimientos y conquistas deben enfocar la mejora de la calidad ambiental, intentamos desarrollar y aplicar un conjunto de procedimientos dentro de un enfoque multidisciplinar designado a la caracterización e identificación del grado de contaminación de los sedimentos marinos.

## 2. Área de estudio y problemática

La bahía de Portmán esta localizada en litoral de Murcia, sudeste de España y es conocida históricamente por la polución causada por metales pesados provenientes de la intensiva actividad minera desarrollada en la zona.

Portmán se encuentra en el municipio de La Unión, localizado a  $0^{\circ} 51'$  longitud Oeste y  $37^{\circ} 34'$  latitud Norte. Esta ubicado al extremo sur-oriental de la cordillera Bética que lo encierra y aísla por el norte, el oeste y el este, al pie del monte Santi-Spíritu de 436 m de altitud. Era conocido por su exuberante bahía y por albergar unos de los mejores puertos refugio del Mediterráneo español (Fig. 3). La bahía de Portmán está incluida en la cadena montañosa litoral de gran complejidad geológica que forma la Sierra Minera de la Unión y se prolonga desde Cabo de Palos hasta la Punta de la Azohía. Los materiales predominantes proceden del Paleozoico Alpujárride, con las incrustaciones Cuaternarias de Portmán y El Gorguel, Calblanque, Valle de Escombreras y Campo de Cartagena. Desde la perspectiva oceánica aparece ubicada en la Cuenca Occidental del Mediterráneo, en un área de transición entre el Mar de Alborán y la Cuenca Argelino-Provenzal (Auzende y Olivet, 1974).



**Figura 3.** Bahía de Portmán en el año de 1920.

En esta región la plataforma continental posee una anchura variable a lo largo de su extensión, con valores que oscilan entre los 13 km en su zona mas amplia comprendida entre el tramo entre Punta Espada y Cabo Negrete, disminuyendo drásticamente a un valor mínimo de 2,5 km hasta Cabo Tiñoso (Auzende y Olivet, 1974). Las isóbatas que definen el borde externo de la plataforma y que marcan el comienzo del talud continental entre los 130 a 150 m, se sitúan prácticamente paralelas al perfil costero, fenómeno que se puede apreciar hasta la cota de los 1000 m (Rey y Del Río, 1983). La rotura de pendiente aparece bien caracterizada en todo el área, a excepción del sector occidental al meridiano en Cabo del Agua ( $0^{\circ} 55' O$ ), en el cual se observa una bifurcación del escape que da lugar a una doble rotura a 100 y a 150 m, para volver a converger a la altura de Cabo Tiñoso (Rey y Del Río, 1983). Respecto al carácter morfológico general de la plataforma, se verifica una falta de uniformidad que se pone en evidencia por las distintas direcciones que adquieren las isóbatas a lo largo de su trazado, lo cual se debe a que la topografía submarina está condicionada por la estructura geológica del fondo.

El sector comprendido entre cabo de Palos y cabo del Agua puede apreciarse una tendencia anómala de las isobatas, marcada por dos direcciones de escape (NNO-SSE y NNE-SSO) en cuya vertiente sur-occidental se desarrolla otra superficie de pendiente suave hasta la línea de ruptura. Desde Cartagena a Cabo Tiñoso, en la zona interna de la plataforma, las isóbatas se ciñen al perfil costero hasta los 75 m, a partir de los cuales existe un aplaceramiento que cubre prácticamente la totalidad de la misma, y que limita con la primera rotura de pendiente anteriormente citada (Rey y Del Río, 1983).

En el talud continental se encajan las cabeceras de tres valles submarinos, que probablemente estén relacionados, o incluso tengan alguna dependencia como componentes de los cañones submarinos. La morfología de las curvas que lo definen, poseen un notable resalte y un modelo típico, no pudiéndose precisar nada sobre su dinámica y comportamiento como tales cañones (Rey y Del Río, 1983).

La topografía submarina frente a la bahía de Portmán está definida por curvas lobuladas y de sinuosidad acentuada, debido a la sedimentación diferencial de los depósitos terrígenos continentales (Rey y Del Río, 1983). La plataforma continental del área estudiada, esta recubierta por una capa de sedimentos de espesor variable que esta estrictamente relacionado con la topografía del sustrato, y la hidrodinámica de la región.

El tipo de sedimento que compone la capa superficial de la plataforma y parte superior del talud, corresponde a una gradación granulométrica de tamaños que varia desde detríticos semigrosos hasta más finos, constituidos por limos y arcillas que cubren una extensa área. Los aportes de material finamente triturado, procedente de la actividad minera, cubre buena parte de la plataforma continental y hasta una profundidad de unos 150 m. Este material que ha colmatado la bahía de Portmán y la Cala de El Gorguel, debido probablemente a las corrientes de fondo, no se distribuye uniformemente sino que se va acumulándose en la parte sur-oeste de Portmán (Rey y Del Río, 1983).

Hace más de dos mil años, esclavos trabajaban horadando las montañas en la prospera colonia romana de Cartago Nova, en busca de plata. De la bahía de Portmán, entonces conocida como "Portus Magnus", partían las galeras hacia la metrópoli, cargadas con el precioso metal.

Desde entonces, la sierra, la bahía y la población vivieron un frágil equilibrio, que se rompió con la llegada de la minería moderna. Hoy, la hermosa bahía de Portmán se encuentra saturada con millones de toneladas de residuos tóxicos provenientes del lavado de mineral (Martí, 2001).

En esta zona se vienen extrayendo diversas sustancias minerales desde el Imperio Romano, tales como: blenda, galena argentífera, cerusita, casiterita y óxidos de hierro, principalmente para la obtención de plomo, zinc y plata.

Destacando la presencia de los siguientes elementos en la zona: plomo, zinc, hierro, cobre, calcio, magnesio, plata, níquel, antimonio, arsénico, estaño, aluminio, fosfatos, silicatos y sulfuros.

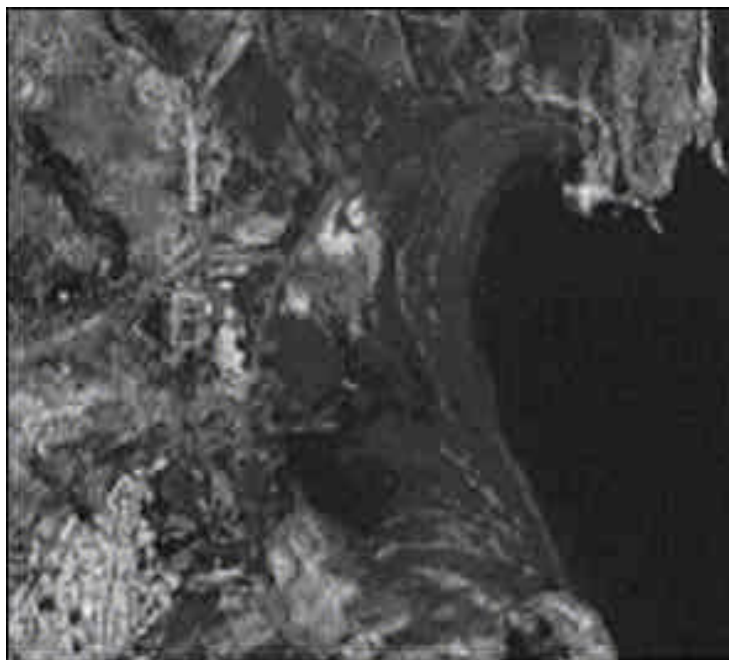
La bahía de Portmán ha sido palco a lo largo de su historia de una variedad de episodios devastadores oriundos de la explotación minera, pero solo recientemente, a partir 1957 con la instalación de la Sociedad Minera-Metalúrgica Peñarroya S.A., los efectos de la polución y colmatación de la bahía se intensificaron drásticamente.

En 18 de febrero 1959, a través de una orden administrativa Ministerial, se da la concesión para los vertidos provenientes del lavadero Roberto, considerado como unos de los mayores del mundo. Los residuos mineros eran vertidos inicialmente en un punto distante a 400 m al oeste de punta Galera, por medio de una tubería de 300 mm de diámetro enterrada en la playa, que llevaba a una salida en el mar Mediterráneo a una profundidad mínima de 3 m. El volumen de vertidos era estimado inicialmente en 3 mil toneladas diarias (Gómez y Páez, 1987).

La empresa tenía la obligación de que estos vertidos no afectasen las características naturales de la bahía, además de la responsabilidad de los trabajos de dragado y restauración de los calados naturales que fuesen afectados. Desafortunadamente todo esto ha estado lejos de la realidad que vislumbramos actualmente (Fig. 4).

El proceso de colmatación en la ensenada de Portmán ha evolucionado de una forma rápida y asombrosa a partir de los años 60, mudando progresivamente el perfil natural de la bahía, provocando un desplazamiento de las isóbatas interiores mar afuera, de tal manera que en la actualidad ya no existe la ensenada.





**Figura 4.** Vista aérea de la bahía de Portmán en 1986.

Posteriormente las tuberías del lavadero Roberto se prolongaron hasta una longitud de más de 2 km, recorriendo todo el antiguo perfil de la bahía, atravesando el monte de Punta Galera y desembocando a la orilla del Mediterráneo (Fig. 5). El lavadero Roberto a través de un proceso de flotación, era capaz de tratar 300 toneladas por hora de mineral, llegando a un total de 8 a 10 mil toneladas por día, que llegaba a alcanzar un volumen de 2.072.000 toneladas de material vertidos al mar por año, y que en los casi 30 años de actividad, sumaron más de 50 millones de toneladas de residuos lanzados al mar Mediterráneo (Gómez y Páez, 1987). En este proceso se utilizaba 2 m<sup>3</sup> de agua por tonelada de mineral y una serie de aditivos: casi 1 tonelada diaria de cianuro sódico y unas 10 toneladas de ácido sulfúrico, así como xantatos y sulfato de cobre, entre otros. Todo ese material era vertido al mar incluyendo restos de metales pesados reconocidamente tóxicos y bioacumulables, tales como: cobre, cadmio, zinc, plomo y mercurio (Gómez y Páez, 1987).



**Figura 5.** Efluente de la compañía Peñarroya lanzados al mar Mediterráneo.

El lanzamiento de todos estos materiales y sustancias tóxicas, provocaban un incremento de la turbidez del agua, contribuyendo al aumento de los efectos adversos al ecosistema marino, provocando de esta forma, la brusca desaparición de la fauna y de la flora local y adyacente.

Actualmente la bahía de Portmán se encuentra aterrada en más de un 80% de su superficie, correspondiente a unas 70 hectáreas de las que eran recubiertas por el mar. Estos vertidos constituyeron un aporte de unos 50% al incremento de metales pesados en el Mediterráneo y unos 90% de la polución por residuos sólidos (Gómez y Páez, 1987).

Las concentraciones de zinc, plomo y cadmio en el sedimento superficial eran muy elevadas en la proximidad del emisario, con valores de 11.349 ppm de zinc, 3.844 ppm de plomo, y de 16 ppm de cadmio, disminuyendo conforme se aleja de la costa (Rey y Del Río, 1983).

En estudio posterior realizado en la misma zona, también en sedimentos superficiales, se detectaron niveles altos, presentando valores máximos de 5.093  $\mu\text{g/g}$  de Zn, 1.182  $\mu\text{g/g}$  de Pb y de 6,25  $\mu\text{g/g}$  de Cd (Pérez y Puente, 1989). Estos niveles son muy superiores a los encontrados normalmente en el medio marino, pero se pueden encontrar situaciones semejantes en el Mar Menor, otro punto crítico de la región de Murcia, que también fue afectado en otras épocas, por estos vertidos derivados de la minería (De León, 1982 y 1984).

A partir del 31 de marzo de 1990, tras muchas protestas y acciones por parte de grupos ecologistas y de la sociedad civil en general, el lanzamiento de estos vertidos al Mediterráneo fue definitivamente interrumpido, después de más de 30 años de actividad. Dando continuidad a un conflicto socioeconómico y ambiental generado por las huellas provocadas por la intensiva actividad minera desarrollada en esta región.

Según Calvín *et al.* (1999), en un estudio de valoración ecológica del litoral sumergido murciano, en esta zona presenta: biocenosis de sustrato rocoso empobrecidas; no se observa praderas de *Posidonia oceanica*, a excepción de un número reducido a pie de acantilado (a unos 15 m de profundidad) en Cabo Negrete; observándose manchas de rizomas muertos en Peña Manceba y Punta Negra; valores bajos en el número de especies encontradas; diversidad de moluscos de media a baja con importante fracción de bivalvos y de especies cosmopolitas; valor paisajístico entre medio y muy bajo; fondos blando muy degradados y presentando un valor ecológico bajo.

Actualmente existe una gran polémica y controversia respecto a la posibilidad de la regeneración de la bahía de Portan y de la Sierra Minera, lo que constituye uno de los más emblemáticos y históricos problemas ambientales de la Región de Murcia.

El proyecto de regeneración de la bahía de Portmán sigue sin encontrar la aprobación final de la Comisión Europea, con base en el hecho incuestionable de que el principal y gran beneficiario del proyecto, la empresa Portmán Golf que es la actual propietaria de todos los terrenos adyacentes a la bahía.

La negativa de la Comisión Europea se basa entre otras razones, en la utilización de los residuos en la construcción del dique de Escombreras, la inexistencia de garantías con relación a la polución por metales pesados inherente a resuspensión de estos materiales, las posibles fugas en el lecho marino, la necesidad de cumplimiento de las obligaciones derivadas del estudio de impacto ambiental, y el riesgo para el hábitat protegido de las praderas de *Posidonia oceánica*, originados por la extracción de 2 millones de m<sup>3</sup> de arena proveniente de la Cala Medina necesarios para la regeneración de la bahía.

Es evidente que la solución no es fácil, principalmente debido al problema de cómo garantizar la perfecta impermeabilidad y estanqueidad (encapsulamiento) de estos residuos altamente tóxicos, durante la extracción de los estériles y en todo el proceso, bien como, con relación a su destino final.

La enorme degradación de amplios sectores de la Sierra Minera asociado al total enterramiento de la bahía de Portmán y el declive de la otrora próspera industria extractiva, constituye sin duda uno de los déficits socioeconómicos y medio ambientales mas importantes y singulares tanto para la Región de Murcia como para la nación, con trascendencia internacional para la región del Mediterráneo occidental, especialmente debido al gran aporte de metales pesados vertido en el mar.

De hecho, la bahía de Portmán está considerada como el punto más negro del Mediterráneo en lo que se refiere a la polución por metales pesados, representando un 93,75% de todos los vertidos industriales a lo largo del litoral mediterráneo español, datos estimados para 1990 (Ramade, 1990).

La forma y la naturaleza del fondo marino juegan un papel muy importante en el control y evolución de los fenómenos que afectan al sistema. La particular configuración y condiciones que caracterizan ciertas áreas como la bahía de Portmán, pueden potenciar las acciones nocivas sobre el medio marino, estableciendo una cadena de fenómenos caóticos que, con el tiempo, pueden alcanzar niveles irreversibles.

En este contexto, las zonas costeras de las inmediaciones a la bahía de Portmán de gran interés natural que forman parte de la Red Natura 2000, como la Franja Litoral Sumergida de la Región de Murcia (LIC) y Medio Marino (LIC), el Parque regional de Calblanque, Monte de las Cenizas y Peña del Águila (LIC). La sierra de la Fausilla (ZEPA), y la costa entre Cabo de Palos y Cabo Negrete (declarada Zona Especialmente Protegida de Importancia para el Mediterráneo; ZEPIM), son susceptibles a cualquier tipo alteración provocada en la Bahía de Portmán.

### 3. Identificación y caracterización de los sedimentos

Los sedimentos se definen como el material originado de la descomposición de todo tipo de roca, materia orgánica y productos sintetizados, formando un sustrato consolidado, que generalmente constituye el fondo submarino (ASTM, 1994).

Power y Chapman (1992), clasifican los sedimentos en cuatro componentes básicos. El primero constituye el agua intersticial que circula entre las partículas, pudiendo llegar hasta un 50% de su volumen. El segundo, la fase sólida inorgánica, formada por fragmentos minerales originados de la erosión continental e insular. El tercero, la materia orgánica que adquiere una gran importancia por regular la absorción y biodisponibilidad de los contaminantes no-iónicos y orgánicos (Di Toro, *et al.*, 1991). El cuarto, componente está relacionado con la actividad humana, incluyendo la polución.

Los sedimentos marinos proveen hábitat a una gran diversidad de organismos, constituyendo el mayor depósito de una variedad de sustancias químicas que son introducidas a través del agua y que pueden persistir en esos ecosistemas (Ingersoll, 1995), pudiendo ser transformadas y transportadas a través de la cadena trófica (Burgess y Scott, 1992).

El destino, distribución y comportamiento de las sustancias químicas en los sedimentos naturales todavía no son bien entendidos, así como sus efectos a largo plazo para la biota, constituyendo un área donde debe enfocarse un esfuerzo considerable (Crane, *et al.* 1996; Burton, 1994; Ingersoll, 1994).

Es evidente que en los sistemas litorales los sedimentos constituyen el lugar donde se acumulan los contaminantes, siendo imprescindible su caracterización en los estudios ambientales (Luoma and Ho, 1992; DelValls, 2001). La contaminación del sedimento es un problema medioambiental muy extendido que generalmente supone una amenaza potencial para los ecosistemas acuáticos (USEPA, 1994).

La composición de los sedimentos es el resultado de los procesos físicos, químicos y biológicos (diagénesis) que ocurren en estos compartimentos y que influyen en el metabolismo de los organismos que viven o dependen de estos ecosistemas acuáticos (Chapman, 1992).

Los sedimentos constituyen uno de los compartimentos más importantes de los ecosistemas acuáticos, debido a su capacidad de almacenar y acumular compuestos orgánicos e inorgánicos, principalmente a través del proceso de decantación. Algunas de estas sustancias o compuestos pueden ser naturales y encontrarse en altas concentraciones, pero la gran mayoría de los problemas de contaminación son provocados por las actividades antrópicas (Power and Chapman, 1992).

Las concentraciones de contaminantes en los sedimentos pueden tener varios órdenes de magnitud a las encontradas en la columna de agua, sin embargo, no se puede correlacionar estas altas concentraciones con la biodisponibilidad de estos contaminantes (Burton, 1991).

En el sedimento los contaminantes generalmente son alterados por diversos procesos físicos, químicos y biológicos, ocasionando la deposición, liberación y transporte de esos materiales (Burguess, 1992). La partición o sorción de los compuestos químicos entre el sedimento y la columna de agua depende de muchos factores como por ejemplo: temperatura, oxígeno, solubilidad, potencial hidrogeniónico, potencial redox, carbono orgánico total, granulometría, constitución mineral del sedimento, hidrodinámica y la cantidad de ácidos volátiles sulfhídricos presente en el mismo (Di Toro, *et al.* 1990).

La biodisponibilidad constituye el concepto crítico para la evaluación de los agentes tóxicos en los sedimentos, determinado la transformación y/o transporte de estas sustancias a los otros sistemas y compartimentos.

Mientras algunas sustancias químicas rápidamente se mineralizan y tienen menos potencial para acumularse en los sedimentos, otras muchas sustancias persistentes (metales pesados) requieren una evaluación más intensiva en todos los compartimientos medioambientales, principalmente en los sedimentos (Pittinger and Adams, 1997). La biodisponibilidad de estos contaminantes en los sedimentos determinan su transferencia y consecuente efectos adversos en los organismos bentónicos.

Uno de los principales factores que establecen la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos es la relación entre sus concentraciones y las concentraciones de los ácidos sulfhídricos volátiles (AVS/SEM), o sea que la biodisponibilidad de los metales solo es apreciable cuando sus concentraciones sobrepasan a de los sulfuros volátiles (AVS<SEM) (Di Toro, 1990).

El comportamiento de los metales pesados constituye uno de los tópicos más estudiados en el medio marino, debido principalmente a su persistencia en el medio y a sus efectos sobre la biota. Muchos estudios (USEPA, 1999) describen que algunos contaminantes, como los metales pesados, persisten asociados a los sedimentos, pudiendo incluso tener efectos mutagénicos, cuando se acumulan en concentraciones superiores a las encontradas, causando normalmente efectos agudos y crónicos en los organismos que viven o dependen de estos ecosistemas.

Los métodos de valoración de calidad que determinan la toxicidad del sedimento y la bioacumulación empezaron a aparecer a principio de los años 1980, prácticamente al mismo tiempo que se desarrollaron los procedimientos de valoración de riesgo medioambiental, pero por caminos separados (Dillon, *et al.*1995; Crane, *et al.*1996).



Los tests de toxicidad con sedimentos pueden proveer una información rápida y segura sobre el potencial tóxico de los contaminantes con los organismos bentónicos (Ingersoll, 1995), incluyendo los efectos de bioacumulación (USEPA, 1994). Estos experimentos pueden revelar efectos tóxicos interactivos, como por ejemplo, los que ocurren en una compleja mezcla de contaminantes, presente en un determinado sedimento (USEPA, 1994).

Otro enfoque clásico utilizado en la caracterización de los sedimentos son los estudios ecológicos relacionados a la estructura y función de la comunidad bentónica (Biliard, 1987). Dependiendo de la fauna de macroinvertebrados encontrados en los sedimentos, se pueden utilizar índices descriptivos para calcular los respectivos factores: abundancia total, riqueza de especies, diversidad y equitatividad. Estos datos proporcionan información sobre el estado de alteración de la comunidad bentónica, que comparados con los datos de un área no afectada (control), nos permite estimar su estado de contaminación.

Los sedimentos no son sistemas cerrados, al contrario ostentan una enorme variabilidad debido a los muchos comportamientos y procesos ecológicos que operan simultáneamente en los sistemas naturales. Por ese motivo, actualmente la tendencia es la integración de todas las herramientas disponibles (análisis físico-químicas, tests de toxicidad, bioacumulación, análisis de la estructura de la comunidad bentónica, biomarcadores, entre otras técnicas), lo que viene posibilitando una mejor caracterización de los efectos provocados por la polución.

#### 4. Tests de toxicidad acuática

El gran paradigma de la toxicología acuática está en la interpretación de la relación entre concentración y respuesta, ya que la toxicidad está directamente relacionada con la concentración y el tiempo de exposición, así como con otros factores como la temperatura, oxígeno, salinidad, composición química y biodisponibilidad de los contaminantes (APHA, 1995). En este sentido, la mayoría de los protocolos referentes a los tests de toxicidad acuática han sido diseñados para generar datos útiles, reuniendo requerimientos ecológicos, toxicológicos y estadísticos para asegurar su validez (Rand, 1995).

Los tests de toxicidad acuática son aplicados en la evaluación de sustancias potencialmente tóxicas, a través de la investigación de los efectos adversos provocados por esos contaminantes a los organismos vivos. Básicamente consiste en la exposición de organismos acuáticos, debidamente seleccionados, a una serie de tratamientos (compartimentos ambientales o sustancias químicas y sus mezclas), durante un determinado período de tiempo. A través de la observación de las respuestas biológicas (subletales o letales) de estos organismos se puede estimar el grado de toxicidad de una serie de compuestos orgánicos y inorgánicos, que generalmente se encuentran presentes en los ecosistemas acuáticos.

Históricamente la caracterización de los contaminantes en los sedimentos estaba limitada sobre todo a la realización de análisis físico-químicos (Ingersoll, 1995), siendo las concentraciones máximas generalmente establecidas en la legislación vigente, por patrones numéricos. No obstante, la cuantificación de las sustancias químicas por separado, no proporcionan suficiente información sobre los efectos potenciales causados a los organismos acuáticos, así como, sus interacciones, tiempo efectivo y biodisponibilidad (Rodgers et al., 1984; Ingersoll, 1995). Teniendo en cuenta la gran diversidad y complejidad de estas sustancias, su completa caracterización se torna inviable, no solo desde punto de vista analítico, sino también del punto de vista económico.

Las investigaciones indican que los resultados obtenidos a través de esos análisis, difícilmente generan informaciones sobre el efecto sinérgico de varias sustancias que interaccionan y pueden afectar a la biota presente en el ambiente acuático. Los análisis químicos sólo identifican y cuantifican aisladamente las sustancias en un determinado medio.

En contrapartida los tests de toxicidad pueden detectar la reacción de los organismos vivos a una situación global, como por ejemplo, una muestra de agua o sedimento de un cuerpo receptor contaminado por residuos industriales.

Los tests de toxicidad con organismos acuáticos, entre otros métodos biológicos de evaluación ecotoxicológicos, son utilizados como complemento a los análisis físico-químicos en la evaluación ambiental. A través de esos ensayos, se puede establecer patrones de emisión que permitan identificar problemas como los de un vertido industrial compuesto de diferentes sustancias tóxicas, establecer prioridades de control en regiones críticas, viabilizar acciones correctivas apropiadas, o monitorizar el ecosistema acuático, teniendo en vista sus usos predominantes (USEPA, 1994).

En este sentido, se ha prestado mucha atención a los ecosistemas acuáticos, debido a que las sustancias normalmente introducidas en esos sistemas pueden eventualmente afectar al medio acuático en su forma original o como productos transformados (Bertoletti, 1990). Por lo tanto, para identificar los efectos de estas sustancias sobre la biota acuática, se han utilizado en estas últimas décadas tests de toxicidad con organismos de aguas continentales, estuarinas y marinas. Estos experimentos posibilitan el establecimiento de límites permisibles para varias sustancias químicas y sobretodo la evaluación del impacto (sobre los organismos) de vertidos que generalmente están compuestos por mezclas de contaminantes (Bertoletti, 1992).

A través de los tests de toxicidad se determina el tiempo en que las concentraciones del agente químico son potencialmente perjudiciales, ya que un producto en contacto con una membrana o sistema biológico puede no producir un efecto adverso si la concentración del producto es baja, o el tiempo de contacto es insuficiente.

Concentración y tiempo de exposición están directamente relacionados y, por lo tanto, altas concentraciones podrían tener efectos perjudiciales en tiempos de exposición extremadamente cortos. Además debemos tener en cuenta que las pequeñas concentraciones generalmente producen efectos crónicos subletales o letales durante largos períodos de exposición.

El control de la toxicidad en sedimento y cuerpos receptores a través de tests de toxicidad con organismos acuáticos es un instrumento importante que los órganos públicos y privados de Control Ambiental, tanto internacionales como nacionales, vienen implantando dentro de su sistemática de acción. Con estas respuestas, se puede estimar, a través de métodos estadísticos, la concentración de esas sustancias, que podrían causar toxicidad a los organismos claves de los sistemas acuáticos. La toxicidad, característica inherente de una sustancia o mezcla de sustancias químicas, se evidencia sobre los organismos vivos y se torna la única variable a ser controlada.

Estudios ecotoxicológicos proporcionan los elementos que representan la base para el desarrollo de los tests de toxicidad, teniéndose en cuenta que no todos los efectos biológicos observados en los organismos vivos pueden ser utilizados con un objetivo práctico, pues, para que eso ocurra, es necesario que los efectos observados tengan un significado ecológico bien definido (Gherard-Goldstein, 1990). De esta manera, para la detección y control de la toxicidad, es importante que los tests de toxicidad estén bien establecidos y estandarizados, a fin de obtener una buena reproducibilidad de los resultados, independientemente de la muestra y del laboratorio responsable por la realización del mismo.

La correcta aplicación de esta metodología implica el conocimiento de los fundamentos teóricos y las limitaciones inherentes a los distintos métodos (Abel, 1991), lo que permite el estudio del comportamiento y de las transformaciones de esos agentes químicos en el ambiente o en condiciones controladas de laboratorio, así como sus efectos sobre los organismos vivos.

Dependiendo de su composición química, algunas sustancias son más tóxicas a un determinado organismo-test, como por ejemplo, algunos productos pueden ser más tóxicos para crustáceos que para equinodermos, o viceversa. Consecuentemente, es recomendable siempre que sea posible, evaluar el efecto de un determinado compuesto, a un mínimo de tres organismos representantes de diferentes niveles tróficos, estableciendo de esta forma, un rango de sensibilidad de los organismos empleados, lo que permite una mejor estimación del impacto de esos contaminantes en el ecosistema acuático.

Los efectos adversos pueden producirse en un período corto de tiempo (efecto agudo), generalmente expresado como mortalidad o supervivencia, o a lo largo de un período de exposición más largo (efecto sub-crónico o crónico), en los cuales se observan efectos subletales como: cambios de comportamiento, crecimiento, desarrollo, reproducción y estructura de tejidos. Se incluye también los efectos adversos a niveles estructurales de los organismos como la inducción o inhibición de enzimas y o sistemas enzimáticos entre otras funciones asociadas (Rand *et al.*, 1995).

Los tests de toxicidad aguda detectan una respuesta severa y rápida de los organismos acuáticos a un estímulo que se manifiesta, en general, en un intervalo de 0 a 96 horas (Rand y Petrocelli, 1985). Normalmente, el efecto observado es la mortalidad o cualquier manifestación del organismo que la anteceda, como el estado de inmovilidad de crustáceos expuesto a un sedimento contaminado. Los efectos agudos en tests de toxicidad, se especifica generalmente, como la concentración efectiva o letal (CL50-CE50) que causa mortalidad o inmovilidad al 50% de los organismos-tests.

Así que, la exposición a una concentración elevada de agentes tóxicos, en un corto período de tiempo, puede causar efectos deletéreos a los organismos acuáticos. Normalmente estos acontecimientos (mortalidad de peces, aves y cetáceos) son divulgados por los medios de comunicación y despiertan la atención de la sociedad en general.

Las pruebas de toxicidad crónica, evalúan la acción de los contaminantes cuyo efecto traduce la respuesta a un estímulo que continua durante largo tiempo, generalmente por un período que va de 1/10 del ciclo vital hasta la totalidad de la vida del organismo (Rand y Petroceli, 1985). De un modo general, pero no exclusivo, esos efectos son subletales y observados en situaciones en que las concentraciones del agente tóxico, a los cuales quedan expuestos los organismos, permiten su supervivencia, pero afectan a una o varias de sus funciones biológicas, interfiriendo, por ejemplo, en la reproducción, desarrollo de huevos, crecimiento, maduración y comportamiento en general.

En el ambiente acuático, se observan los efectos crónicos, cuando los vertidos industriales “tratados” son lanzados continuamente en el medio ambiente. De esa forma, los organismos se exponen a bajas concentraciones de determinados contaminantes durante largos períodos de tiempo ocasionando efectos crónicos a niveles subletales e incluso letales a lo largo del tiempo (Stephan *et al.*, 1985).

Las respuestas de los tests subcrónicos y crónicos se basan normalmente en la observación de los efectos de supervivencia, fertilización, reproducción, crecimiento o desarrollo larval y los resultados de las pruebas normalmente son expresadas como: Concentración de Efecto No Observado (CENO): que es la mayor concentración nominal del agente tóxico que no causa efecto deletéreo estadísticamente significativo sobre los organismos, en las condiciones del test; Concentración de Efecto Observado (CEO), que es la menor concentración nominal del agente tóxico, que causa efecto deletéreo estadísticamente significativo sobre los organismos, en las condiciones de test.

También se pueden utilizar técnicas de punto estimado que generalmente ofrecen mejores posibilidades como: concentración de inhibición (IC), que es la concentración que causa un porcentaje de inhibición, como por ejemplo en el desarrollo embrionario o larval de equinodermos durante un período de exposición, en las condiciones de test.

Como en el caso del cálculo de la CE o CL, esta técnica presenta ventajas por proporcionar una concentración estimada en la que el agente tóxico causa un efecto (inhibición), pudiendo evaluar cuantitativamente la precisión a través del cálculo de los límites de confianza (95%); y entre experimentos, se puede calcular la desviación estándar y el coeficiente de variación (USEPA, 1995).

Los tests de toxicidad acuática pueden ser realizados sobre diversas condiciones, pudiendo ser estáticos (sin renovación), semi-estáticos (con renovación parcial) y dinámicos (con renovación continua), de acuerdo con el objetivo del estudio.

Otro factor importante que determina la calidad de los resultados en los tests de toxicidad acuática es la elección del organismo test apropiado. Varios criterios son empleados en la elección, tales como: sensibilidad, relevancia ecológica, disponibilidad, posibilidad de cultivo, baja variabilidad biológica, cosmopolismo, corto ciclo de vida, tamaño, costes, entre otros factores como el conocimiento bibliográfico de la especie y facilidad de interpretación de sus respuestas biológicas.

Los organismos empleados en este estudio fueron rigurosamente elegidos en base a estos criterios. Se utilizaron especies de organismos representantes de distintos niveles tróficos (bacterias, crustáceos y equinodermos), lo que proporcionó la determinación de un rango jerárquico de sensibilidad de estos organismos en relación a la toxicidad de los sedimentos y a las distintas sustancias tóxicas de referencia probadas.

En una de las etapas de este estudio se emplearon las bacterias luminescentes (*Vibrio fischeri*), a través del sistema Microtox<sup>®</sup>, pero los datos no fueron incluidos debido a su alta resistencia a las muestras estudiadas.

En este estudio se realizaron tests de toxicidad con el agua intersticial, elutriado y con la interfase sedimento-agua, empleando dos especies de anfípodos (crustáceos) y tres especies de erizos del mar (equinodermos). Para los experimentos con la interfase sedimento-agua con erizos del mar, se desarrolló una nueva y sencilla técnica de experimentación que permite recuperar las larvas del sedimento al final del test, lo que no era posible a través de los métodos convencionales utilizados para muestras líquidas (ver capítulos 5 y 6).

Los experimentos de sensibilidad fueron realizados con cinco diferentes sustancias tóxicas de referencia, paralelamente a los ensayos con las muestras ambientales, para determinar la sensibilidad del lote de organismos empleado en los respectivos tests.

Se prepararon por medio de una serie de concentraciones para identificar la sensibilidad de cada una de las especies con relación a las sustancias tóxicas de referencia utilizadas internacionalmente. Estos datos determinaron la sensibilidad de los distintos organismos tests empleados, con relación a las respectivas sustancias químicas de referencia (ver capítulo 3).

Las utilidades y limitaciones entre otros aspectos metodológicos de los tests de toxicidad con sedimentos son descritos con detalle en diversos trabajos (Ej. Burton, 1991; Luoma and Ho, 1993; USEPA, 1994; Ingersoll, 1995).



## 5. Bioacumulación

Una de las características más importantes de los agentes tóxicos esta relacionada a su capacidad de acumulación en los tejidos de los organismos. La acumulación de estas sustancias químicas por los organismos en los ecosistemas acuáticos esta establecida por la interacción de una variedad de características y procesos físicos, químicos y biológicos (Spacie, 1995).

La bioacumulación de sustancias químicas constituye un importante factor que puede incrementar los efectos de la polución en los sistemas vivos. La magnificación biológica es un fenómeno que define el progresivo aumento de las concentraciones de estos contaminantes en los cuerpos de los organismos a través de la cadena trófica (Nibakken, 2001).

Bioacumulación es el término general que representa la absorción neta de sustancias químicas presentes en el ambiente por los organismos a través de cualquiera o todas las rutas posibles (Ej. respiración, dieta, dérmica), provenientes de cualquier fuente en el ambiente acuático, donde las sustancias químicas puedan estar presentes (Ej. disueltos en agua, en forma coloidal o particulada, en sedimento o en otros organismos).

El estudio de los flujos de metales pesados a través de los organismos marinos constituyen una importante herramienta en la ecotoxicología. Nos permite la valoración de la susceptibilidad de un determinado organismo a ser afectado por estas sustancias tóxicas, que pueden constituir una fuente de contaminación a través de los niveles tróficos (Warnau, *et al.*, 1995). Muchos contaminantes se bioacumulan a través del agua y de los sedimentos en organismos marinos como poliquetos, moluscos, anfípodos y peces, así como en organismos de aguas dulce que incluyen larvas de insectos, oligoquetos e anfípodos (Adams, *et al.*, 1987; Oliver, 1987; Connell, *et al.*, 1988; Gobas, *et al.*, 1989; Lago, *et al.*, 1990; Giordano, *et al.*, 1991; Ankley, 1996; USEPA, 2000).

Estudios de laboratorio y de campo demuestran que los erizos de mar adultos expuestos a metales pesados acumulan Cd, Pb y Zn en el esqueleto y en las gónadas (Warnau, *et al.*, 1995; Ablanado, *et al.*, 1990; Chinchón, *et al.*, 2000). Sin embargo, la bioacumulación de metales en larvas de equinóides ha recibido poca atención comparado con los estudios realizados con adultos.

Todos los estadios del ciclo de vida de los erizos de mar han sido usados en la identificación y caracterización de la polución en sistemas marinos (Dinnel, *et al.*, 1988). El uso de erizos de mar en diversos estadios de vida (sobre todo gametos y embriones) en tests ecotoxicológicos fueron establecidos en los años veinte, por medio de una variedad de trabajos que investigan los efectos de los metales en la fertilización y desarrollo (Lillie, 1921; Hoadley, 1923; 1930; Drzewina y Bohn, 1926; 1927).

Desde entonces no hemos encontrado ningún estudio en la bibliografía que utilice los estadios larvales de los erizos de mar en pruebas de bioacumulación, probablemente debido a su reducido tamaño que imposibilita el análisis a través de los métodos convencionales. En este sentido hemos logrado desarrollar una técnica que posibilita determinar la bioacumulación de los metales pesados en sedimento, simultáneamente con la evaluación de la toxicidad y biodisponibilidad de estas sustancias. A través de la utilización de técnicas de microscopía electrónica de barrido hemos podido determinar la bioacumulación de metales pesados en larvas de erizos de mar tras la exposición en tests de toxicidad con sustancias tóxicas de referencia y muestras ambientales (ver capítulos 3 y 6).

Los organismos marinos pueden acumular metales pesados en sus esqueletos calcáreos (Campbell y Evans, 1987; Anderlini, 1992,; Auernheiner y Chinchón, 1997), entre otros tejidos corporales. La biodisponibilidad de los metales puede ser evaluada directamente como la bioacumulación de estas sustancias en los organismos o indirectamente a través de las concentraciones de metales disueltos en el agua intersticial (Peterson, *et al.*, 1996).

## 6. Métodos integrados de evaluación medioambiental

Los métodos integrados de calidad ambiental se basan en la utilización del mayor número de técnicas y métodos analíticos disponibles, a partir de la intercorrelación de los resultados es posible una mejor identificación y caracterización de las condiciones ambientales. Solo a través del máximo conocimiento de las distintas características medioambientales se puede reducir las incertidumbres inherentes a cada método y así, conseguir un mejor y más efectivo diagnóstico de los ecosistemas contaminados.

En este sentido Long y Chapman (1985), desarrollaron una metodología que actualmente es conocida y aplicada en diversas partes del mundo sobre la denominación de *Triad* de calidad de sedimento (SQT- *Sediment Quality Triad*). La base de esta metodología está fundamentada en la integración de datos físico-químicos, toxicológicos y ecológicos de los sedimentos en cuestión. Llevándose en consideración que la toma de muestras sea realizada de forma simultánea lo que posibilita la adecuada correlación entre las variables estudiadas.

Dentro de las posibles ventajas que puede ofrecer esta metodología los autores destacan las siguientes (Chapman, *et al.*, 1992): ofrecen evidencias fiables (basadas en observaciones) de la calidad del sedimento; permiten una interpretación ecológica de las propiedades físicas, químicas y biológicas relativas al medioambiente; puede ser empleada en todo tipo de sedimento y generan datos que pueden ser usados en el desarrollo de índices de calidad de sedimentos.

Esta metodología tiene como inconvenientes principales la multidisciplinariedad analítica y sus consecuentes limitaciones metodológicas, y el elevado coste de estos análisis que son necesarios para su correcta utilización. Teniendo en cuenta que estos procedimientos conllevan la comprensión integral de las informaciones relacionadas con la composición físico-química, la toxicidad y las alteraciones ecológicas que los sedimentos pueden conferir a la biota.

En contrapartida, esta metodología es fundamentalmente importante debido a la gran complejidad y dinamismo que caracterizan los ecosistemas acuáticos, sobre todo los marinos y estuarinos, debido a la inherente dificultad que existe en la interpretación de los efectos de la polución de una forma precisa y segura a través de una sola técnica (Chapman, *et al.* 1992).

En 1990, Chapman propone la primera guía general para la utilización de la *Triad* con sus subsiguientes actualizaciones (Chapman, *et al.*, 1991; Chapman, 1996; Chapman, *et al.*, 1997).

Dentro de esta filosofía de los métodos integrados se deben incluir, por lo menos, dos técnicas que permitan evaluar a través de un enfoque más meticuloso la calidad medioambiental. Tras una revisión de los principales métodos empleados en estos estudios, Chapman, *et al.*, 1992, destacan los métodos más apropiados: tests toxicidad con sedimentos, análisis químicos del sedimento, bioacumulación en tejidos y organismos, pruebas histológicas y el análisis de la estructura de la comunidad bentónica.

La utilización de todos estos métodos de forma rutinaria resulta complejo y demasiado costoso, además de que algunas de estas informaciones pueden ser redundantes (Chapman, *et al.*, 1992). Por ese motivo, la mayoría de los trabajos que aplican esta metodología utilizan los tres componentes que contemplan informaciones sobre la contaminación físico-química, toxicológica y de la estructura de la comunidad bentónica de los sedimentos (Long y Chapman, 1985; Swarts, *et al.*, 1986; Chapman, *et al.*, 1987; Chapman, 1992, Carr, *et al.*, 1996; DelValls, *et al.* 1998; Anderson, *et al.* 2001).

Los resultados de cada uno de estos parámetros, utilizados separadamente, no aportan mucha información, pero cuando utilizados de forma integrada permiten identificar y cuantificar los sedimentos de una forma global y mucho más realista (Chapman, 1990).

La combinación de los tres parámetros (contaminación, toxicidad y composición de la comunidad bentónica) es capaz de proporcionar una idea suficientemente válida de la calidad de los sedimentos, aportando fuertes evidencias sobre el grado de degradación, lo que es prácticamente imposible cuando se emplean separadamente (Chapman, 1987; DeIvalls, 1994).

La caracterización físico-química solo puede identificar y cuantificar las características y las sustancias que se encuentran en los sedimentos, pero no puede detectar los posibles efectos adversos a la biota. Los tests de toxicidad pueden evaluar los efectos de estas sustancias a los organismos, pero no pueden identificar cuales son los agentes tóxicos y los resultados de laboratorio tan poco pueden ser extrapolados al campo. Para completar, la evaluación de la estructura de la comunidad bentónica sí puede proporcionar las respuestas de las alteraciones *in situ*, pero es dependiente de las respuestas anteriores para descartar los efectos naturales que frecuentemente causan estas alteraciones. De esta forma, es posible, a través de los métodos integrados, minimizar las limitaciones de cada técnica de manera que estas informaciones tengan un valor aún mayor que la propia suma de las informaciones obtenidas para cada parámetro individualmente (Harris, *et al.*, 1990; DeIvalls, 1994).

Dado lo expuesto anteriormente, es evidente que los métodos integrados ofrecen mayor información, lo que consecuentemente proporciona una mejor evaluación de los efectos de la contaminación. En la tabla 1, se presenta de forma general las conclusiones y recomendaciones para la toma de decisiones (modificado a partir de Chapman, 1990; 1997) generadas a partir de las posibles combinaciones entre las respuestas obtenidas a través de la utilización del método de la *Triad*.

Las formas de integrar estos datos (físico-químicos, toxicológicos y ecológicos) generalmente utilizan la combinación de métodos matemáticos, estadísticos, gráficos, tablas de decisiones y más recientemente a través de análisis multivariantes.

**Tabla 1.** Posibles combinaciones entre las respuestas de los componentes de la *Triad*. Las respuestas se identifican con positivo (+) o negativo (-), de acuerdo con la existencia o no de diferencias significativas con relación a las estaciones de control o referencia.

Componentes de la <i>Triad</i>			Posible conclusión	Medidas mitigadoras
Químico	Toxicidad	Alteración		
+	+	+	Gran evidencia de polución	Necesidad de tratamiento, dependiendo del estado de degradación y agente toxico responsable
-	-	-	Gran evidencia de no haber polución	Tratamiento no es necesario
+	-	-	Contaminantes no biodisponibles	Tratamiento no es necesario
-	+	-	Ciertos contaminantes no fueron detectados o que el potencial de contaminación existe	Necesita mayores estudios tomándose como base los resultados anteriores
-	-	+	La alteración no es provocada por sustancias toxicas	Tratamiento no es necesario
+	+	-	Las sustancias toxicas son biodisponibles en laboratorio, pero no <i>in situ</i>	Tratamiento probablemente no sea necesario dependiendo de la fuente contaminante y de los efectos de laboratorio
-	+	+	Sustancias toxicas no detectadas son las causadoras de la degradación	Tratamiento probablemente sea necesario dependiendo de la fuente contaminante y el grado de los efectos biológicos
+	-	+	Las sustancias toxicas no están biodisponibles o no son la causa de la alteración	Tratamiento probablemente no sea necesario, pero estudios confirmatorios son requeridos

\* Adaptado a partir de Chapman, (1990; 1997).

Los métodos de integración de los resultados de la *Triad* utilizados inicialmente seguían originalmente la propuesta de Long y Chapman (1985) que convertían todos los datos de cada parámetro en números adimensionales denominados RTR (*Ratio to Reference*), dividiéndose el valor medio del parámetro en cada punto de muestreo, por la media del mismo en el punto control o de referencia. De esta forma para cada punto de muestreo se obtiene un índice general para la contaminación físico-química, toxicidad y estructura de la comunidad bentónica a través del cálculo de la media de sus respectivos RTRs. Posteriormente estos índices se expresan gráficamente en tres ejes separados por ángulos de  $120^\circ$ , y el área del triángulo formado por la unión de los tres puntos, constituye la medida de degradación de cada punto de muestreo en relación al control (Fig. 6). Por tanto, cuanto mayor sea el área del triángulo en relación al control mayor es el grado de degradación.



**Figura 6.** Representación gráfica hipotética de los tres índices de la *Triad*, el triángulo central negro representa el control y el triángulo transparente representa un determinado punto de muestreo contaminado.

El tipo de normalización anterior, presenta una alta variabilidad para los valores de RTR, puesto que la integración de estos valores en los distintos índices es realizada a través de la media aritmética de los valores de RTR, presentando el inconveniente de dar un peso excesivo sobre los ejes con relación a respuestas concretas, enmascarando otras que deberían tener, al menos, una contribución similar (DeValls, 1994).

Por ese motivo, DeValls (1994), entre otros (DeValls y Chapman, 1998; DeValls, *et al.*, 1998), centran los esfuerzos en limitar el peso relativo de los distintos parámetros, que forman parte de cada uno de los tres ejes y pasan a normalizar estos valores con respecto al valor máximo que se experimenta para el conjunto completo de estaciones estudiadas.

De esta forma, los valores normalizados adquieren un peso que varía entre 0 y 1 para cada uno de los parámetros, permitiendo así minimizar el peso relativo de cada medida o grupo de medidas sobre el valor final de los tres ejes.

Esta otra forma de normalizar los datos, tomando como referencia el valor medio máximo de cada parámetro observado entre todos los puntos estudiados, es denominada RTM (*Ratio to Maximum-value*), y la representación gráfica puede seguir el mismo patrón de relación entre las áreas de los triángulos utilizada anteriormente (Fig. 6). Las formulas matemáticas empleadas para los cálculos de los dos tipos de índices son relativamente simples y de fácil aplicación (Ver cuadro siguiente).



\* Procedimientos simplificado para el cálculo de los índices de la *Triad*

$$RTR_{yi} = \frac{V_{yi}}{V_{yo}} \quad / \quad I = \frac{\sum_{i=1}^n RTR_i}{n}$$

$$RTM_{yi} = \frac{V_{yi}}{V_{my}} \quad / \quad NI = \frac{\sum_{i=1}^n RTM_i}{RTM_o}$$

Donde: **RTR** = *Ratio to reference*

**y** = parámetro evaluado

**V** = valor medio del parámetro

**i** = punto de muestreo

**o** = punto de control o de referencia

**I** = índice de Chapman

**n** = número de parámetros  
empleados para cada  
índice

**RTM** = *Ratio to maximum*

**V<sub>yi</sub>** = valor medio del parámetro

**V<sub>my</sub>** = valor medio máximo del  
parámetro entre todos los  
muestreados

**NI** = índice de DelValls

\* Adaptado a partir de DelValls, *et al.*, 1998; Zamboni y Abessa, 2002.

Actualmente la tendencia está centrada en la utilización de métodos estadísticos más sofisticados y robustos que conllevan a una menor pérdida de información. A parte de todos los métodos de integración descritos anteriormente las técnicas multivariantes vienen siendo utilizadas cada vez más por aportar una interpretación más realista y efectiva (Chapman, *et al.*, 1996; DelValls y Chapman, 1998; Nipper, *et al.*, 1998; Carr, *et al.*, 2000; Anderson, *et al.*, 2001; Hunt, *et al.*, 2001).

Entre los métodos empleados actualmente destacan los análisis de componentes principales (PCA - *Principal Components Analysis*), escalamiento multi-dimensional (MDS - *Multi-Dimensional Scaling*), junto con los métodos estadísticos tradicionales, como, análisis de varianza de una y dos vías (ANOVA), regresiones y correlaciones múltiples.

En este sentido hemos empleado esta metodología integrada (ver capítulo 6) siguiendo las últimas tendencias en el campo de la ecotoxicología y de la estadística, objetivando la identificación y caracterización de la calidad de los sedimentos que constituyen unos de los compartimentos más importantes de los ecosistemas marinos costeros.

## 7. Objetivos generales

Los principales objetivos de esta memoria son:

1. Desarrollar y aplicar una metodología apropiada para la realización de tests de toxicidad empleando distintos organismos bentónicos característicos de los fondos blandos del Mediterráneo.
2. Evaluar la sensibilidad de estas especies locales a las diferentes sustancias tóxicas de referencia utilizadas internacionalmente.
3. Identificar y caracterizar el grado de toxicidad de los sedimentos de la bahía de Portmán, entre otras áreas del litoral murciano, a través del uso de especies representativas de estos ecosistemas costeros.
4. Determinar los cambios en la estructura de las comunidades bentónicas ocasionados por la contaminación por metales pesados procedentes de la actividad minera desarrollada en la zona.
5. Caracterizar la composición físico-química de los sedimentos contaminados por metales pesados de la bahía de Portmán, entre otras áreas del litoral murciano abordadas en este estudio.
6. Realizar un estudio integrado correlacionando los parámetros toxicológicos, físico-químicos y de la estructura de las comunidades bentónicas a través de la utilización de técnicas uni- y multivariantes.
7. Determinar el nivel de alteración ambiental en la zona, basándose en el método de la *Triad* de calidad de sedimento a través de un gradiente espacial, partiendo del antiguo punto de emisión del emisario de los vertidos mineros en la bahía de Portmán.

## 8. Referencias

- Abel, P.D. 1991. Letal toxicity tests: theory and methodology. In: Abel, P.D. and Axiak, V. (eds.), *Ecotoxicology and the marine environment*, Ellis Horwood. London. pp. 39-58.
- Ablanedo, N., González, H., Ramírez, M., Torres, I. 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de contaminación por metales pesados, Cuba. *Aquat. Living. Resour.*, 3:113-120.
- Adams, W.J. 1987. Bioavailability of neutral lipophilic organic chemicals contained in sediments. In: Dickson, K.L., Maki, A.W., Brungs, W.A. (eds.), Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems. Proceedings of the 6th Pellston workshop, Florissant, CO, August 12-17, 1984, Pergamon Press, New York, pp. 219-244.
- Albaigés, J., Aubert, M. y Aubert, J. 1989. Las huellas de la vida y del hombre. In: Margalef, R. (ed.), *El Mediterráneo occidental*, Ediciones Omega, SA., Barcelona. pp. 321-357.
- American Public Health Association. 1995. AWWA/WPCF, *Standard Methods*, 18<sup>th</sup> ed, Washington, DC.
- Anderlini, V. 1992. The effect of sewage on trace metal concentrations and scope for growth in *Mytilus edulis aoteanus* and *Perna canaliculus* from Wellington Harbour, New Zealand. *Scien. Tot. Environ.*, 155: 236-288.
- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Fairey, R., Roberts, C.A., Oakden, J.M., Pucktt, H.M., Stephenson, M., Tjeerdema, R.S., Long, E.R., Wilson, C.J. and Lyons, J.M. 2001. Sediment quality in Los Angeles harbor, USA: A triad assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 359-370.

- Ankley, G.T. 1996. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:2138-2146.
- Auernheiner, C. and Chichón, S. 1997. Calcareous skeletons of sea urchins as indicator of heavy metals pollution. Portman Bay. Spain. *Environ. Geol.*, 29: 78-83.
- Auzende, J.M. and Olivet, J.L. 1974. Structure of the western Mediterranean Basin. In: C.A. Burk and C.L. Drake (eds.), *The geology of continental margins*. Springer-Verlag. pp. 723-731.
- Bertoletti, E., Gherardi-Goldstein, E. e Zagatto, P.A. 1990. Variabilidade de Testes de Toxicidade com Peixes. *Revista Ambiente*, 3: 52-58.
- Bertoletti, E., Nipper, M.G., Magalhães, N.P. 1992. A Precisão de Testes de Toxicidade com Daphnia. *Revista Ambiente*, 6: 55-59.
- Buikema, A.L. and Cairns J. 1980. Aquatic invertebrate bioassays, ASTM STP 715. Philadelphia.
- Burguess, R.M. and Scott, K.J. 1992. The significance of in-place contaminated marine sediments on the water column. In: Burton, G.A. (ed.), *Sediment toxicity assessment*, Lewis Publishers. pp. 313-340.
- Burton, G.A. 1991. Assessment of freshwater sediment toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1585-1627.
- Burton, G.A. and Ingersoll, C.G. 1994. Evaluating the toxicity of sediments. The ARCS Assessment guidance document. EPA/905-B94/OO2, Chicago. USEPA.
- Cairns, Jr. J. 1980. Estimating hazard. *Bioscience*, 30: 101-107.

- Cairns, Jr. J. and Mount, D.I. 1990. Aquatic toxicology. *Environ. Sci. Technol.* 24: 154-161.
- Calvín, J.C., Navarro, I.F., Marín, A., Martínez, A.M., Belmonte, A. y Ruiz, J.M. 1999. El litoral sumergido de la región de Murcia: cartografía bionómica y valores ambientales. 2º Ed., Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente. Región de Murcia. p.122.
- Campbell, J. and Evans, R.D. 1987. Inorganic and organic ligand binding of Pb and Cd and resultant implications for bioavailability and variability. *Scie. Tot. Environ.*, 62: 219-227.
- Carr, R.S., Long, R.E., Windon, H.L., Chapman, D.C., Thursby, G., Sloane, G.M. and Wolfe, D.A. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1218-1231.
- Cesar, A., Silva, S. R. e Santos, A.R. 1997. Testes de toxicidade aquática no controle da poluição. Universidade Santa Cecília, UNISANTA, São Paulo, Brasil. p. 35.
- CETESB. 1986. Avaliação da toxicidade das águas, sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão. *Companhia de tecnologia de saneamento ambiental*, CETESB, São Paulo. p 226.
- Cole, H.A. 1979. The assessment of sublethal effects of pollutants in the sea. London, The Royal Society.
- Connell, D.W., Bowman, M. and Hawker, D.W. 1988. Bioconcentration of chlorinated hydrocarbons from sediment by oligochaetes. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 16:293-302.

- Crane, M., Everts, J., Van de Guchte, C., Heimbach, F., Hill, I., Matthiessen, P. and Stronkhorst, J. 1996. Research needs in sediment bioassay and toxicity testing. In: Munawar, M. and Dave, G. (eds.), *Development and progress in sediment quality assesement: rationale, challenges, techniques & strategies*, SPB Academic Publishing. pp. 49-56.
- Chapman, P.M. 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Scien. Tot. Environ.*, 98: 815-825.
- Chapman, P.M.; Power, E.A. and Burton Jr., G.A. 1992. Integrative assessments in aquatic ecosystems. In: Burton Jr., G.A. (ed.). *Contaminated Sediment toxicity assesment*, Lewis Publishers Inc. Chelsea. pp. 313-340.
- Chapman, P.M.; Power, E.A. and Burton Jr., G.A. 1992. Integrative assessments in aquatic ecosystems. In: Burton Jr., G.A. (ed.). *Contaminated Sediment toxicity assesment*, Lewis Publishers Inc. Chelsea. pp. 313-340.
- Chapman, P.M. 1995. Ecotoxicology and pollution – Key issues. *Mar. Pollut. Bull.*, 31: 167-177.
- Chapman, P.M. 1996. Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxcol.*, 5: 327-339.
- Chapman, P.M., Anderson, B, Carr, S., Engle, V., Green, R., Hameedi, J., Harnon, M., Haverland, P., Hyland, J., Ingersoll, C., Long, E., Rodgers Jr., J., Salazar, M., Sibley, P.K., Smith, P.J., Swartz, R.C., Thompson, B. and Windom, H. 1997. General guidelines for using the sediment quality triad. *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 368-372.

- Chapman, P.M., Dexter, R.N. and Long, E.R. 1997. Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community structure (The sediment quality triad) in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 37: 75-96.
- Chichón, S., Auernheiner, C., Alastuey, A. and Galí, S. 2000. Accumulation of Pb and Zn in sea urchin plates and spines related to their crystalline structure. *Mar. Pollut. Bull.*, 40:647-649.
- De Leon, A.R., Gerrero, J. and Faraco, F. 1982. Evaluation of the pollution of the coastal lagoon Mar Menor. *VI Journées Etud. Pollution. Cannes*, CIEMS.
- De Leon, A.R., Mas, J., Gerrero, J., and Jornet, J. 1984. Monitoring of heavy metals in superficial sediment and some marine organisms from the western Mediterranean coast. *VII Journées Etud. Pollution. Lucerne*, CIMES.
- DelValls, T.A. 1994. Aplicación de un método integrado para la medida de la calidad ambiental en ecosistemas litorales del Golfo de Cádiz. Tesis de doctorado. Universidad de Cádiz. España. p. 388.
- DelValls, T.A., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. 1998. Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz, Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 1073-1084.
- DelValls, T.A. 2001. Determinación de la calidad ambiental de sistemas costeros marinos utilizando índices integrados y estableciendo guías de calidad ambiental. In: Ruzafa, A.P., Marcos, C., Salas, F. and Zamora, S. (eds.). *Contaminación marina: orígenes, bases ecológicas, evaluación de impactos y medidas correctoras*, Universidad de Murcia. pp.151-170.



- Di Toro, D. M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Tomas, N.A. and Paquin, P.R. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1541-1583.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Hicks, M.B., Mays, S.M. and Redmond, M.S. 1990. Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1489-1504.
- Dinnel, P.A., Pagano, G.G. and Oshida, P.S. 1988. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: Burke, R.D., Mladenov, P.V, Lambert, P., Parsley, R.L., (eds.), *Echinoderm Biology. Proceeding of the sixth international echinoderm conference*, Victoria, A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield. p. 611.
- Drzewina A, Bohn G 1927. Effets tardifs de l'argent métallique sur les oeufs d'oursins. *C.R. Soc. Biol.*, 97: 1522-11524.
- Drzewina A, Bohn G. 1926. Action de l'argent métallique sur le sperme et les larves d'oursins. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci.*, 182:1651-1652.
- GESAMP.1990. Long-term consequences of low-level marine contamination: an analytical approach. IMCO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UNEP. Report series, FAO, Roma. nº. 40.
- Gherardi-Goldstein, E., Bertolotti, E., Zagato, P.A., Araújo, R.P. e Ramos, M.L. 1990. Procedimentos para utilización de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. CETESB-PROCOP. p. 17.
- Giordano, R., Arata, P., Ciaralli, L., Rinaldi, S., Giani, M., Cicero, A.M. and Constantini, S. 1991. Heavy metals in mussels and fish from Italian coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.*, 22: 10-14.

- Gobas, P.C., Bedard, D.C., Ciborowski, J.H., Haffner, G.D. 1989. Bioaccumulation of chlorinated hydrocarbons by the mayfly (*Hexagenia limbafa*) in Lake St. Clair. *Jour. Great. Lakes Res.*, 15:581-588.
- Gomez, I.G. y Paez, P.B. 1987. Problemática de Portman. *Asociación Naturalista del Sureste*. ANSE. p. 81.
- Guthrie, F.E. and Perry, J.J. 1980. Introduction to environmental toxicology, Nort Holland, Elsevier. p. 484.
- Harris, H.P., Sager, P.E., Regier, H.A. and Francis, G.R. 1990. Ecotoxicology and ecosystem integrity: the Great Lakes examined. *Environ. Sci. Technol.*, 24: 598-603.
- Hoadley, L. 1930. Some effects of HgCl<sub>2</sub> on fertilized and unfertilized eggs of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 58:123-130.
- Hoadley, L. 1923. Certain effects of the salts of the heavy metals on the fertilization reaction in *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 44:255-280.
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Tjeerdema, R.S., Taberski, K.M., Wilson, C.J., Puckett, H.M., Stephenson, M., Fairey, R. and Oakden, J. 2001. A large-scale categorization of sites in San Francisco bay, USA, based on the sediment quality triad, toxicity identification evaluations, and gradient studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1252-1265.
- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment tests. In: Rand, G.M. (ed.), *Fundamentals of toxicology, effects, environmental fate and risk assessment*, 2<sup>sd</sup> ed. Taylor & Francis. pp. 231-255.

- Ingersoll, C.G., Dillon, T. and Biddinger, G.R. 1997. Ecological risk assessment of contaminated sediments. SETAC Press. p. 313
- Johnstone, K. 1977. The aquatic explorers: A history of the fisheries research board of Canada. Toronto, University of Toronto Press.
- Kenaga, E.E. 1978. Test organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 12: 1322-1329.
- Lillie, F.R. 1921. Studies of fertilization X. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol. Bull.*, 41: 125-143.
- Luoma, S.N. and Ho, K.T. 1992. The appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In: P. Calow (ed.). *The handbook of ecotoxicology*, pp. 193-226.
- Luoma, S.N. and Ho, K.T. 1993. Appropriate uses of marine and estuarine sediment biassays. In: Calow, P. Ed., *Handboock of Ecotoxicology*. Blackweel Scientific, Oxford, Uk, pp. 193-226.
- Long , E.R. and Chapman, P.M. 1985. A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Mar. Poll. Bull.* 16:405-415.
- Maki, A.W. and Bishop, W.E. 1985. Chemical safety evaluation. In: Rand, G.M. and Petrocelli, J.R. (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology*, Washington, McGraw Hill. pp. 619-35.
- Margalef, R. 1986. Explotación humana, regresión y conservación. In: Margalef, R. (ed), *Ecología*, Ediciones Omega, SA, Barcelona. pp. 789-819.

- Moriarty, F. 1983. *Ecotoxicology the study of pollutants in ecosystems*, Academic Press. p. 233.
- Martí, M. 2001. *Portman, a la sombra de Roberto*. Documental. Presentado en la semana internacional de cine de Valladolid.
- Maugh, T.H. 1978. Chemicals: how many are there? *Science*. 199,. New York. p.162.
- Newman, E.I. 2000. Pollution. In: Newman, E.I. (ed.), *Applied ecology & environmental management*, 2<sup>sd</sup> Ed. Blackwell Science. pp. 245-280.
- Nipper, M.G., Roper, D.S., Williams, E.K. and Martin, M. L. 1998. Sediment toxicity and benthic communities in mildly contaminated mudflats. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 502-510.
- Odum, E.P. 1972. Contaminación e higiene ambiental. In: Odum, E.P. (ed.), *Ecología*, Nueva Editorial Interamericana, SA. México. pp. 475-489.
- Oliver, E.G. 1987. Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.*, 21:785-790.
- Osborn, S.B. 2001. Human impact on the sea. In: Nibakken, J.W. (ed.), *Marine biology an ecological approach*, Benjamin Cummings. Addison Wesley Longman, Inc. pp. 458-493.
- Pérez, J.G. y Puente, C.R. 1989. Estudio de la contaminación marina entre Cabo de Palos y Cabo Tiñoso (SE-España). Concentraciones de cadmio, plomo y cinc en sedimentos superficiales. *Informes Técnicos Instituto Español de Oceanografía*. MAPA. p.13

- Peterson, S.G., Ankley, G.T., Edward, N.L. 1996. Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 2147-2155.
- Pittinger, C.A. and Adams, W.J. 1997. Assessing ecological risks to benthic species in product and technology development. In: Ingersoll, C.G., Dillon, T. and Biddinger, G.R. (eds.), *Ecological risk assesement of contaminated sediments*. SETAC Press. pp.11-21.
- Power, E.A. and Chapman, P.M. 1992. Assessing sediment quality. In: Burton, Jr., G.A. (ed.), *Sediment toxicity assessment*, Lewis Publishers. pp. 1-18.
- Ramade, F. 1990. Conservación des ecosystèmes mediterranéens. *Ecomomica*. Paris.
- Rand, G.M. and Petrocelli, S.R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. In: Rand G.M. and Petrocelli, S.R. (eds.), *Methods and applications*, Hemisphere, Washington, DC.
- Rand, G.M., Wells, P.G. and McCarty, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: G.M. Rand (ed.), *Fundamentals of aquatic toxicology*, pp. 3-67, 2<sup>sd</sup> Ed, Taylor & Francis.
- Rey, J. y Del Rio, V.D. 1983. La plataforma continental Mediterránea, entre cabo de Palos y cabo Tiñoso: morfología y estudios sísmicos de la cobertura sedimentaria, Instituto Español de Oceanografía. p. 21.
- Rodgers, Jr., J.H., Dickson, K.L., Saleh, F.Y. and Staples, C.A. 1984. Bioavailability of sediment-bound chemicals to aquatic organisms-some theory, evidence, and research needs. In: Dickson, K.L., Maki, A.W. and Brungs, W.A. (eds.), *Fates and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems*, New York. Pergamon. pp. 245-266.

- Spacie, A., McCarty, L.S., and Rand, G.M. 1995. Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems. In Rand: G.M. (ed.), *Fundamentals of aquatic toxicology*, 2<sup>sd</sup> Ed., Taylor & Francis. pp. 3-67.
- Stephan, C.E., Mount, D.I., Hansen, D.J., Gentile, J.H., Chapman, G.A. and Brungs W.A. 1985. Guidelines for deriving national water quality criteria for the protection of aquatic organism and their use. NITIS, PB85-227049, Washington, DC. US EPA.
- Swarts, R.C., Cole, F.A., Schults, D.W., DeBen, W.A. 1986. Ecological changes in the southern California bight near a large sewage outfall: benthic conditions in 1980 and 1983. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 31: 1-13.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1999. Integrated approach to assessing the bioavailability and toxicity of metals in surface waters and sediments (Including the metals mixtures equilibrium partitioning sediment guideline document). Briefing materials presented to the Science Advisory Board, April 6-7.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/-94/025.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/ R-99/ 064. Duluth, MN.
- Warnau, M., Teyssié, J.L. and Fowler, S.W. 1995. Effect of feeding on cadmium bioaccumulation in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 126:305-309.

Wells, P.G. 1989. History and practice of biological effects assessment for aquatic protection in Canada: a synopsis. In Day, K.E., Ongley, E.D., Scroggins R.P. and Eisenhauer, H.R., (eds.), *Biology in the new regulatory framework for aquatic protection*. Burlington. NWRI. pp. 25-29.

Zamboni, A.J. e Abessa, D.M.S. Tríade da qualidade de sedimentos. In: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M. e Nipper, M., (eds.), *Métodos em Ecotoxicología Marina-Aplicações no Brasil*. pp. 233-243.

**Capítulo 2. Tests de toxicidad con sedimento marino de la  
costa Mediterránea, empleando anfípodos:  
*Gammarus aequicauda* y  
*Mycrodeutopus gryllotalpa***



## 1. Resumen

Los sedimentos proporcionan hábitats para muchos organismos marinos y constituyen el principal depósito de sustancias químicas persistentes que son introducidos en el agua a través de diversas fuentes. Los anfípodos son excelentes organismos para ser utilizados en tests de toxicidad de corta duración con sedimento y son recomendados como organismos tests en experimentos con agua marina y estuarina. Los estudios de toxicidad en sedimentos empleando anfípodos son escasos en el Mediterráneo. Fueron realizados tests de toxicidad con sedimento total usando las dos especies de anfípodos *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*. La sensibilidad de estos anfípodos epibentónicos y escavadores, fueron evaluadas en tests de 48h de exposición utilizando las siguientes sustancias de referencia: cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y dodecilo sulfato de sodio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ). *G. aequicauda* y *M. Gryllotalpa* presentaron sensibilidad similar a la de otras especies de anfípodos encontradas en la bibliografía. Estos anfípodos fueron empleados en la evaluación de un gradiente de polución proveniente de la actividad minera en la bahía de Portmán (Murcia, SE – España). En cada estación fueron recolectadas cinco réplicas de sedimento, a través de una draga *core box*, de las que se empleo solamente la capa superficial de 2 cm. Los sedimentos fueron muestreados sinópticamente y las muestras fueran separadas para la realización de los tests de toxicidad y para los análisis físico-químicos (metales pesados y granulometría). Los sedimentos de esta localidad contienen altas concentraciones de metales pesados (Cd, Pb y Zn). La toxicidad aguda de los sedimentos provenientes de la bahía de Portmán fueron evaluados mediante tests de toxicidad estáticos de diez días. El muestreo fue realizado a través de un gradiente de 8 a 80 m de profundidad. Las estaciones de referencia y control no presentaron diferencias significativas. En contrapartida, todas las muestras de la bahía de Portmán presentaron diferencias significativas con relación a los controles, presentando los mayores efectos en los menos profundos. Los sedimentos de Portmán causaron efectos deletéreos a *G. aequicauda* y *M. Gryllotalpa* confirmando el gran potencial de la aplicación de esta metodología en la evaluación de la calidad ambiental en la costa Mediterránea.

## 2. Abstract

Sediment provides habitat for many marine organisms and is a major deposit of the more persistent chemicals that are introduced into waters by diverse sources. Infaunal amphipods are excellent organisms for short term toxicity tests with whole sediment and are strongly recommended as appropriate test species for acute toxicity tests in marine and estuarine waters. The studies of sediment toxicity with amphipods are scarce in the Mediterranean sea. Whole-sediment toxicity tests were conducted with the species *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa*. The sensitivity of this epibenthic and burrowing amphipods was evaluated by 48-h exposure tests using the reference substances: ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) and sodium dodecyl sulfate ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ). *G. aequicauda* and *M. gryllotalpa* display a sensitivity similar to other species of amphipods found in the bibliography. These amphipods were used to evaluate the submarine distribution of historical waste mining in Portmán Bay (Murcia, SE Spain). At each station five replicates were taken with a box core, removing the top 2 cm for the analyses. Sediment was collected synoptically for both sediment physico-chemical (granulometry and heavy metals) and sediment toxicity analyses. The sediments from this locality contain high levels of heavy metals (Cd, Zn and Pb). The acute toxicity of sediments from Portmán Bay was evaluated by static 10-d toxicity tests. The sediments were collected along the submarine fan (8 to 80 m depth). References and control stations did not show significant differences. In contrast, all samples from Portmán Bay indicate significant differences with controls, showing the higher effects in shallower points. The sediments from Portmán cause a deleterious effect on *G. aequicauda* and *M. gryllotalpa* confirming the potential application of this tool to evaluate the environmental quality of Mediterranean coast.

### 3. Introducción

La calidad del sedimento es de fundamental importancia para la salud de los ecosistemas marinos, principalmente por constituir el primer depósito de los diversos contaminantes que gradualmente se transfieren a través de los niveles tróficos (ASTM, 1997; USEPA, 1994).

Los anfípodos son excelentes para su utilización como organismos-tests, siendo comúnmente recomendados y empleados en tests de toxicidad aguda con sedimento total en muestras de ambientes marinos y estuarinos (ASTM, 1997; USEPA, 1994). En este estudio se empleó el anfípodo epibéntico *Gammarus aequicauda*, por primera vez y el anfípodo excavador *Microdeutopus gryllotalpa* para evaluar la toxicidad de los sedimentos de la bahía de Portmán (Murcia-España, Fig.1), que se encuentra prácticamente colmatada con sedimentos contaminados por metales pesados provenientes de la histórica actividad minera desarrollada en el área. Se realizaron tests de toxicidad estáticos de 10 días de exposición a partir de un gradiente de profundidad (-8 a -80 m.), en la bahía de Portmán. La sensibilidad de las poblaciones empleadas en los tests con sedimentos fue evaluada en paralelo, utilizando las siguientes sustancias de referencia: cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), dodecilo sulfato de sodio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) y dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Los puntos de control y referencia no presentaron diferencias significativas entre si, pero los puntos contaminados fueron significativamente diferentes a los anteriormente citados.

Los objetivos de este estudio son: adaptar e implantar una metodología apropiada para la evaluación de la toxicidad de sedimentos marinos, basada en los métodos estandarizados (ASTM, 1997; USEPA, 1994), y caracterizar la toxicidad de los sedimentos provenientes de la bahía de Portmán, a través de la utilización de dos especies de anfípodos. Los datos identifican que la metodología aplicada es eficaz y representa una excelente herramienta de control medioambiental.

## 4. Material y métodos

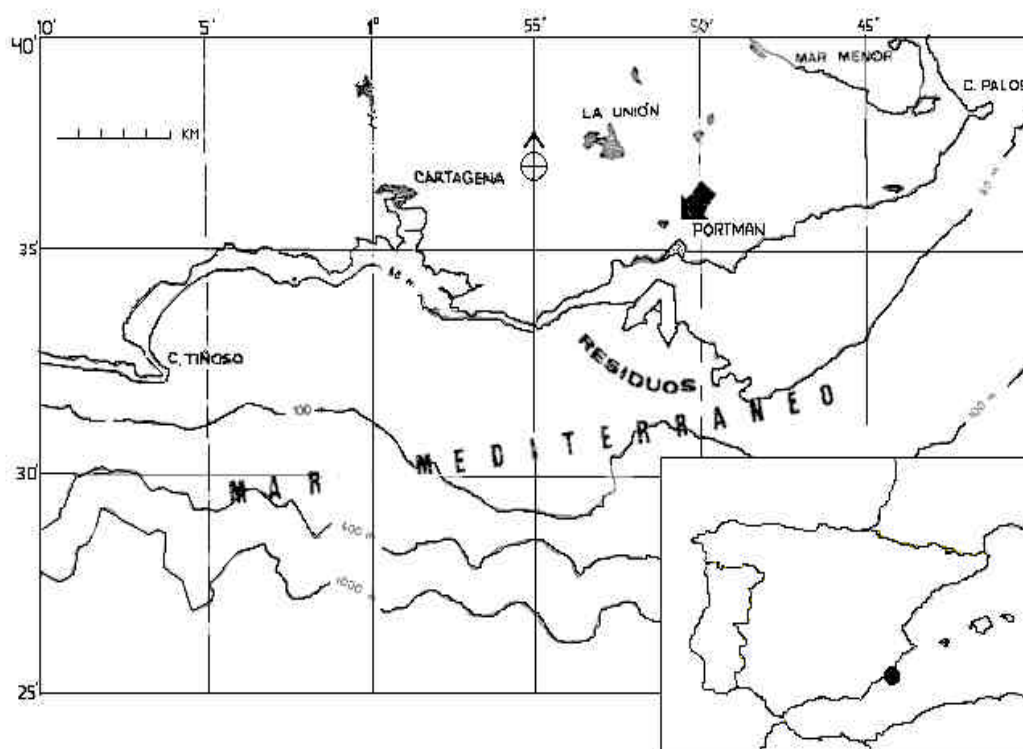
### 4.1. Área de estudio

La bahía de Portmán esta localizada a 0° 51' longitud oeste y 37° 35' latitud norte en la costa mediterránea de Murcia, Sudeste-España (Fig.1). Esta zona contaba con una espléndida bahía que conformaba uno de los mejores puertos naturales de refugio del Mediterráneo español. Actualmente la bahía de Portmán esta completamente colmatada por estériles procedentes de la intensa actividad minera.

Portmán, el antiguo Portus Magnus que ya era conocido desde el imperio Romano por la explotación de diversas sustancias minerales, principalmente: blenda, galena argentífera, cerusita, casiterita y óxidos de hierro. Entre los elementos que aparecen en la zona destacan: plomo, zinc, hierro, cobre, calcio, plata, magnesio, níquel, antimonio y arsénico (Gómez y Páez, 1987).

En 1957, la Sociedad Minero-Metalúrgica Peñarroya, pone en marcha el lavadero "Roberto", uno de los mayores del mundo que llegó a tratar de 8 a 10 mil toneladas diarias, por un proceso de flotación en el que se utiliza: agua del mar, 2 m<sup>3</sup> por tonelada de mineral, más de 600 kg diario de cianuro sódico y unos 10.000 de ácido sulfúrico, así como xantatos, sulfato de cobre, entre otros metales pesados tóxicos y bioacumulables como: cadmio, cobre, plomo, mercurio y zinc (Gómez y Páez, 1987).

Aunque la deposición de estos vertidos fue interrumpida definitivamente el 31 de marzo de 1990, los estériles mineros colmatan prácticamente toda la bahía de Portmán y áreas adyacentes, extendiéndose hasta el borde de la plataforma continental.



**Figura 1.** Posición geográfica de la bahía de Portmán (Gómez y Páez, 1987).

#### **4.2. Anfípodos, aclimatación y agua**

*Microdeutopus gryllotalpa* (A. Costa, 1853) se recolectó en el Parque Natural de Salinas y Arenales de San Pedro del Pinatar y *Gammarus aequicauda* (Martinov, 1931), en el Parque Natural de Salinas de Santa Pola que son dos áreas protegidas poco alteradas, cerca del laboratorio. Los organismos se capturaron con la ayuda de un tamiz de 0,5 mm y posteriormente se introducían en botes de polietileno junto con algas, agua y sedimentos del lugar, eliminando los posibles depredadores. Inmediatamente los anfípodos son transportados al laboratorio a temperatura controlada.

En el laboratorio los organismos son aclimatados gradualmente a las condiciones del test, con aireación constante y alimentación (mezcla 1:1 de pienso de conejo y de trucha - Purina<sup>?</sup>).

*G. aequicauda* esta disponible en abundancia durante todo el año y *M. gryllotalpa*, también es encontrado con frecuencia, excepto en verano. Los anfípodos fueron seleccionados de acuerdo con la talla y estado de salud. El período de aclimatación no sobrepasó los diez días. El agua empleada tanto en el mantenimiento, como en los experimentos fue recogida en áreas no contaminadas del Mediterráneo y previamente filtrada (filtro, Watman<sup>?</sup> / GFC) y oxigenada antes de su utilización.

#### **4.3. Recolección y separación de sedimentos**

Los sedimentos controles se recogieron, en el mismo lugar que los organismos y fueron previamente tamizados (malla de 1 mm) antes de su utilización en los tests de toxicidad. Para las referencias, se recolectaron sedimentos de la reserva marina de Islas Hormigas – Cabo de Palos, que es una área protegida poco alterada de la costa murciana, que esta localizada cerca y presenta características semejantes al área de estudio.

Los sedimentos se muestrearon a través de un gradiente de 8 a 80 metros de profundidad en la bahía de Portmán. Se tomaron 4 puntos sobre un transecto batimétrico (punto 1 = 8 m; punto 2 = 40 m; punto 3 = 70 m y punto 4 = 80 m) a lo largo del abanico submarino producido por el vertido proveniente del lavadero Roberto. Se realizaron dos campañas junto con el Instituto Español de Oceanografía (IEO), siendo la primera durante los días 12 y 14 de Septiembre de 1999 y la segunda, el día 3 de Diciembre del mismo año. En las dos campañas, se empleó una draga (*Reineck - box core*). Para cada estación, se tomaron 5 réplicas, de las que se utilizó la parte superficial (2 cm).

Las muestras fueron separadas para la realización de los tests de toxicidad, materia orgánica, granulometría y contenido de metales pesados. Todas las sub-muestras fueron almacenadas a 4°C, hasta el inicio de los experimentos, excepto las destinadas a los análisis de metales pesados, que fueron congeladas. El periodo de almacenamiento de las muestras fue inferior a 10 días.

#### **4.4. Tests de toxicidad con sedimentos**

Básicamente se emplearon los métodos estandarizados (ASTM, 1997; USEPA, 1994), con algunas adaptaciones para nuestras condiciones específicas. Los tests se realizaron en frascos de polietileno desechable de 1 litro de capacidad, donde se añadieron aproximadamente 2 cm (175 ml) de sedimento y 800 ml de agua. Se emplearon 5 réplicas para cada tratamiento, incluyendo el control y la referencia. El agua y el sedimento fueron adicionados cuidadosamente, a fin de evitar al máximo la resuspensión del sedimento. En cada réplica se utilizaron 10 individuos, sin renovación del agua y sin alimentación. Los anfípodos fueron seleccionados al azar, excluyendo las hembras ovígeras y una vez introducidos, se confirmó la movilidad y el número de animales en cada bote. El periodo de exposición fue de 10 días y los experimentos se mantuvieron en una cámara (ALS "snijders"), en condiciones de temperatura (20°C), fotoperíodo (1000 lux) de 16 luz por 8 horas de oscuridad y humedad relativa (>90%), controladas. Durante los experimentos los organismos se mantuvieron con un flujo continuo de aire, de aproximadamente 2 burbujas por segundo, suministradas por bombas de acuario a través de tubos capilares.

Los parámetros de calidad del agua: temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH y concentración de amonio, se midieron al inicio, durante y al final de todos los tests con sedimento, según el Standard Methods (APHA, 1995). El número de supervivientes en cada réplica fue anotado también, tres veces durante el test, obteniendo una media de supervivencia para cada tratamiento.

#### 4.5. Tests de sensibilidad

Durante los tests con sedimentos, se realizaron experimentos para evaluar la sensibilidad de cada lote de organismos, calculando las concentraciones efectivas que causan efectos adversos al 50% de los organismos, en 48 horas (CE50; 48h). Se utilizaron las siguientes sustancias tóxicas de referencia: cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), y dodecyl sulfato de sodio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ). Para ello se prepararon por progresión geométrica, siete concentraciones con cuatro réplicas, incluyendo el control. El volumen usado en cada réplica fue de 200 ml, donde se adicionaron 5 organismos en los tests con *G. aequicauda* y 10 para la especie *M. gryllotalpa*. El período de exposición fue de 48 h sin alimentación, y al final del experimento, se apuntó el número de supervivientes en cada réplica.

Los parámetros de calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y pH), se midieron también, al inicio y al final de todos los experimentos, como en los tests con sedimento (APHA, 1995).

#### 4.6. Análisis estadístico

Los datos en porcentajes de supervivencia fueron tratados a través del programa estadístico Toxstat<sup>2</sup> (Gulley, 1991), empleando los tests de Shapiro-Wilks y Bartlett, para evaluar la normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Cuando fue necesario, los datos de supervivencia se transformaron mediante la raíz cuadrada del arco seno. Posteriormente los datos fueron sometidos al test de Dunnet's (ANOVA), y se obtuvo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. La estimativa de la concentración efectiva CE(50)48h, fue analizada con el programa estadístico Trimmed Spearman-Kärmbler (Hamilton *et al.*, 1977).

Las comparaciones entre especies y campañas fueron evaluadas con ANOVA, empleando el método de Newman-Keuls (Probabilities for Post Hoc Tests).



## 5. Resultados

### 5.1. Tests de toxicidad con sedimentos

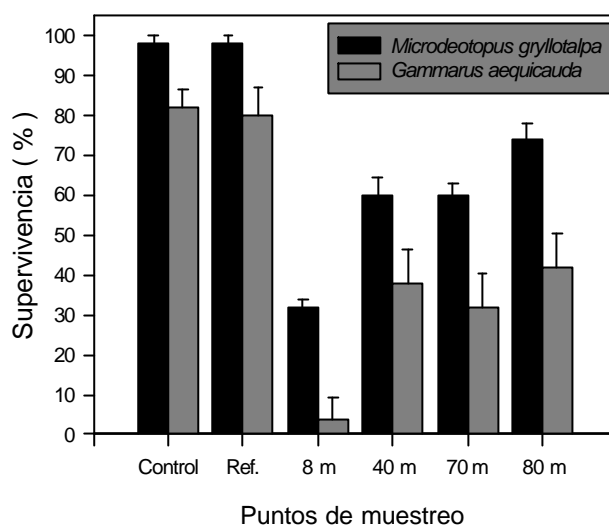
Los sedimentos de Portmán presentaron efectos adversos similares para ambas especies, mostrando mayor toxicidad en los puntos más someros (Fig.2; Tabla 1).

*Gammarus aequicauda* fue empleado en las dos campañas y *Microdeutopus gryllotalpa* solamente fue utilizado en la segunda, debido a la disponibilidad de los organismos en esta ocasión. Los datos de supervivencia para las dos especies en la segunda campaña, están expuestos en la figura 3.

Para la comparación de los datos de supervivencia entre los puntos, se agruparon, según diferencias significativas (Tabla 1). Los resultados reflejan un incremento de toxicidad en dirección al punto de origen del vertido, disminuyendo en los puntos más profundos. *G. aequicauda*, presentó un alto valor de mortalidad en el punto 1 (8 m), de 85 y 96%, decreciendo en los puntos más profundos. La comparación entre campañas para *G. aequicauda*, se realizó aplicando el mismo procedimiento anterior de agrupamiento (figura 3 y tabla 2).

Los controles y las referencias no presentaron diferencias entre sí. En contrapartida, todas las muestras de Portmán presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), con respecto al control y la referencia. La estación situada a 8 m presentó mayor toxicidad para ambas especies.

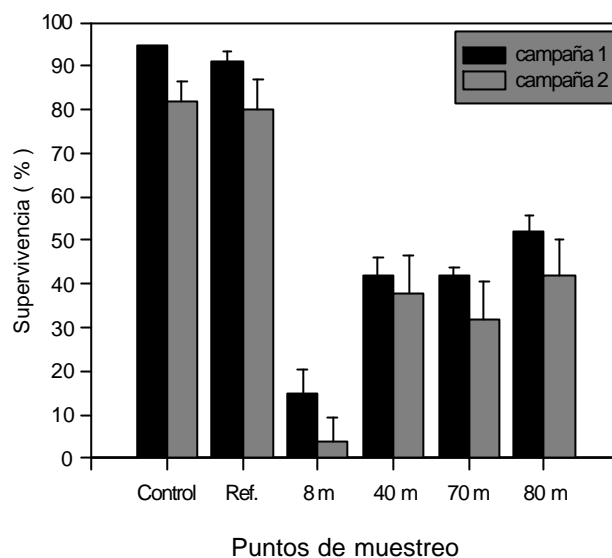
Los datos de calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH y amonio), se mantuvieron constantes dentro de los límites aceptables durante los experimentos.



**Figura 2.** Porcentaje de supervivencia de *G. aequicauda* y *M. gryllotalpa* en la 2ª campaña, (Valores medios y error estándar).

**Tabla 1.** Resumen de los datos de supervivencia de la 2ª campaña, para ambas especies. Los datos no agrupados en la misma línea presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

<i>M. gryllotalpa</i> % supervivencia	Contr.	Referen.	80 m	70 m	40 m	8 m
	98%	98%	74%	60%	60%	32%
<hr/>						
<i>G. aequicauda</i> % supervivencia	Contr.	Referen.	80 m	70 m	40 m	8 m
	82%	80%	42%	38%	32%	4%
Incremento de Toxicidad ↗						



**Figura 3.** Porcentaje de supervivencia en las dos campañas para *G. aequicauda* (Valores medios y error estándar).

**Tabla 2.** Resumen de los datos de supervivencia de las dos campañas para *G. aequicauda*. Los datos no agrupados en la misma línea presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Campaña 1 % Supervivencia	Contr.	Referen.	80 m	70 m	40 m	8 m
	95%	91%	52%	42%	42%	15%
<hr/>						
Campaña 2 % supervivencia	Contr.	Referen.	80 m	40 m	70 m	8 m
	82%	80%	42%	38%	32%	4%
<hr/>						
Incremento de Toxicidad ↗						

## 5.2. Test de sensibilidad

Las concentraciones efectivas (CE50, 48h), para ambas especies, con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y dodecil sulfato de sodio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ), se muestran en las tablas 3 y 4. La representación gráfica con los resultados de las dos especies para las tres sustancias de referencia, queda reflejada en la figura 4.

Tanto para *G. aequicauda*, como para *M. gryllotalpa* la sustancia tóxica de referencia que se mostró más apropiada, fue el dodecil sulfato de sodio (DSS), agente tensioactivo surfactante de cadena lineal, el cual presentó resultados más estables entre experimentos. La media de los valores de DSS fue de 2,98 mg/l y de 5,45 mg/l, para *M. gryllotalpa* y *G. aequicauda*, respectivamente. *M. gryllotalpa* presentó para todas las sustancias empleadas una sensibilidad ligeramente superior, con relación a la otra especie. Los parámetros de calidad del agua no variaron significativamente y se mantuvieron dentro de los límites aceptables.

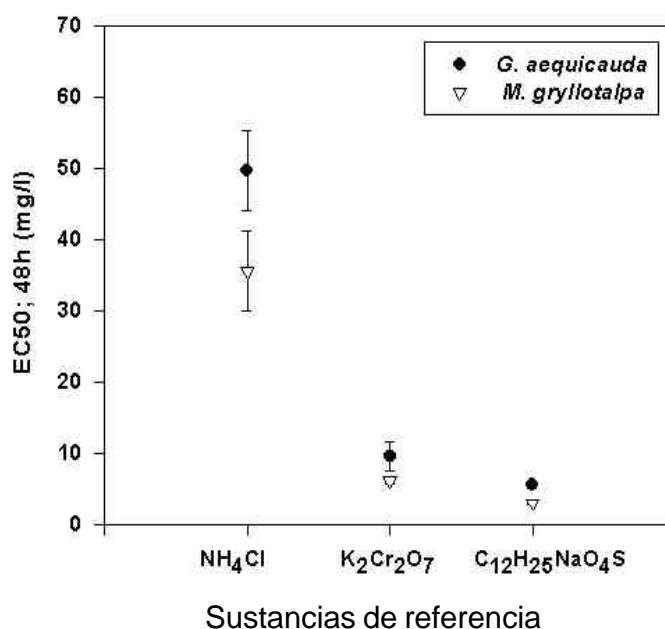


Figura 4. Datos de sensibilidad de *G. aequicauda* y *M. gryllotalpa*.

**Tabla 3.** Resultados de los tests de sensibilidad con *Gammarus aequicauda* (Martinov, 1931).

Sustancia de Referencia: Cloruro Amonio (NH <sub>4</sub> Cl)				
Test	Fecha	EC(50); 48h.	Lim. Inf. 95%	Lim. Sup. 95%
01	06/10/99	41,67	35,00	49,60
02	16/11/99	66,30	42,41	103,66
03	24/11/99	44,60	37,09	53,62
04	24/02/00	46,13	38,90	54,71

Sustancia de Referencia: dicromato de potasio (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )				
Test	Fecha	EC(50); 48h.	Lim. Inf 95%	Lim. Sup. 95%
01	16/06/99	14,69	17,07	17,87
02	22/09/99	3,59	2,55	5,06
03	10/11/99	7,86	6,62	9,33
04	24/11/99	13,96	11,39	17,12
05	24/02/00	7,49	5,87	9,58

Sustancia de Referencia: Dodecilo sulfato de sodio (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)				
Test	Fecha	EC(50); 48h.	Lim. Inf 95%	Lim. Sup. 95%
01	16/06/99	6,23	5,53	7,01
02	22/09/99	4,70	4,02	5,49
03	06/10/99	4,99	4,37	5,70
04	29/03/00	5,91	5,07	6,88

**Tabla 4.** Resultados de los tests de sensibilidad con *Microdeutopus gryllotalpa* (A.Costa, 1853).

Sustancia de referencia: Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)				
Test	Fecha	EC(50); 48h.	Lim. Inf. 95%	Lim. Sup. 95%
01	24/02/00	29,88	25,55	34,95
02	14/03/00	41,20	34,88	48,67
Sustancia de referencia: Dicromato de potasio (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )				
Test	Fecha	EC(50); 48h.	Lim. Inf. 95%	Lim. Sup. 95%
01	05/05/99	5,32	4,40	6,43
02	26/05/99	6,42	5,30	7,78
03	24/02/00	6,43	5,60	7,39
Sustancia de referencia: Dodecil sulfato de sodio (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S)				
Test	Fecha	EC(50); 48h.	Lim. Inf. 95%	Lim. Sup. 95%
01	05/05/99	3,15	2,64	3,76
02	26/05/99	2,10	1,89	2,33
03	24/02/00	3,15	2,73	3,63
04	14/03/00	3,24	2,85	3,67
05	29/03/00	3,26	2,85	3,73

## 6. Discusión

Los sedimentos provenientes de la bahía de Portmán, contaminados con metales pesados, provocaron efectos adversos, significativos en ambas especies de anfípodos utilizados en este estudio. *Microdeutopus gryllotalpa*, ya empleado previamente en otro trabajo (DelValls *et al.*, 1998), confirmó su gran potencial como especie-test y *Gammarus aequicauda*, empleado por primera vez, también demostró una buena sensibilidad a los sedimentos y a las sustancias de referencia. Los resultados fueron semejantes al de otras especies encontradas en la bibliografía (ASTM, 1997; Leight y Van Dolah, 1999; Ingersoll, 1995), siendo incluso más sensibles que otros anfípodos.

Aún presentando *M. gryllotalpa* mayor sensibilidad a las sustancias de referencia, fue *G. aequicauda* la especie más sensible a los sedimentos de la zona de estudio. *G. aequicauda* presentó resultados compatibles en las dos campañas, identificando una variabilidad biológica pequeña entre los dos períodos del año en los cuales fueron empleados y lo mismo se puede decir con relación a la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en las muestras de Portmán.

Ambas especies son tolerantes al estrés, inherente, provocado por las actividades de captura, transporte, aclimatación y adaptación a las condiciones de laboratorio, superando todos estos factores abióticos satisfactoriamente. Las dos especies son tolerantes a los cambios de salinidad, de 42‰ en el ambiente natural donde son recolectadas a 38‰, característico del Mediterráneo, que es la empleada en los experimentos. *G. aequicauda* presentó una mayor tolerancia al cloruro de amonio, sin embargo, esta característica puede ser favorable en la utilización de esta especie en tests con sedimentos que contengan altos índices en materia orgánica, cuando la toxicidad del amoniaco pueda ser limitante e interferir en los resultados de forma sinérgica con otros contaminantes (ASTM, 1997; Ingersoll, 1995).

Los vertidos contaminantes oriundos de la minería, depositados intensivamente a partir del año de 1957 hasta 1990 han colmatado la bahía de Portmán. Estos vertidos, según la hidrodinámica y geomorfología local, ciertamente se han distribuido a cotas más profundas de la plataforma continental.

En este trabajo hemos demostrado un gradiente de profundidad desde el antiguo emisario hasta la cuota de los 80 metros de profundidad. Actualmente existe una gran polémica a cerca de la oportunidad de dragar la bahía. El dragado de todo este material lleva consigo la problemática de la resuspensión de los contaminantes y de cuál es el destino final de estos estériles.

Con los datos biológicos de toxicidad y la estructura de la comunidad bentónica, juntamente con los parámetros físico-químicos (Ej. granulometría, amonio, carbono orgánico total, materia orgánica, metales pesados, ácido volátil sulfhídrico), se pondrán obtener mayores conclusiones a través de la debida integración de todas estas importantes variables (Capitulo 5 y 6).



## 7. Referencias bibliograficas

American Public Health Association. 1995. American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. Standard Methods, 18<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, DC.

American Society for Testing and Materials. 1997. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. E1367-92. In Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.05. Philadelphia, PA, pp. 731-756.

Leight, A.K. and Van Dolah, R. F. 1999. Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18:958-964.

Schlekat, C. E., Mcgee, B.L. and Reinharz, E. 1999. Testing sediment toxicity in chesapeake bay with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*: an evaluation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 225-236.

Bellan-Santini, D. 1980. Relationship between populations of amphipods and Pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 11: 224-227.

Gulley, D., Boelter, A.M. and Bergman, H.L. 1991. TOXSTAT® Computer Program, Version 3.3. University of Wyoming, Laramie, WY.

Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicological bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 11:714-719; Correction 12: 417-1978.

- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment Tests. In: Rand, G.M. (Ed). Fundamentals of Aquatic Toxicology. Taylor & Francis, USA, pp. 231-255.
- Gómez, I.G. y Páez, P.B. 1987. Problemática de Portmán. Asociación de Naturalistas del Sureste.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/94/025, p.158.
- Van den Hurk, P., Chapman, P.M., Roddie, B. and Swartz, R.C. 1992. A comparison of North American and West European infaunal amphipod species in a toxicity test on North Sea sediments. Marine Ecology Progress Series, 91, 237-243.
- DeValls, T. A., Forja, J.M. y Gómez-Parra, A. 1998. Integrative assessment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz, Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*,17:6,1073-1084.

**Capítulo 3. Sensitivity of Mediterranean  
amphipods and sea urchins  
for reference toxicants**

**Capítulo 3. Sensibilidad de anfípodos y  
erizos de mar Medirráneos  
a sustancias tóxicas de  
referencia**

## 1. Resumen

Los experimentos se realizaron con dos especies de anfípodos, *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*, y tres especies de erizos de mar, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*. La sensibilidad de estos organismos marinos se evaluaron por medio de tests de toxicidad aguda empleando anfípodos juveniles y con tests crónicos de corta duración con erizos (embriolarval). Se emplearon las siguientes sustancias tóxicas de referencia: cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), dicromato potásico ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), dodecilo sulfato de sodio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) y sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ). El análisis ANOVA de dos vías mostró que *M. Gryllotalpa* es mas sensibilidad que *G. aequicauda* a todas las sustancias tóxicas de referencia estudiadas ( $p < 0,0001$ ). Tanto en el caso de los anfípodos como en el de los erizos de mar se estudió un gradiente de concentraciones para las sustancias tóxicas de referencia, presentando los erizos de mar en todos los casos una mayor sensibilidad que los anfípodos. La interacción entre las especies de erizos y las sustancias tóxicas de referencia no presentaron un efecto significativo (ANOVA dos vías,  $p = 0,9$ ). La sensibilidad de estos grupos de organismos mediterráneos son similares a otras especies de anfípodos y erizos encontradas en la bibliografía. El objetivo de nuestro estudio es proporcionar herramientas ecotoxicológicas para la evaluación de la toxicidad potencial de los ecosistemas bentónicos mediterráneos y en este trabajo se caracteriza la toxicidad de cinco sustancias tóxicas de referencia con relación a cinco especies autóctonas de anfípodos y erizos de mar.

## 2. Abstract

Toxicity tests were performed with two amphipod species, *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa*, and three sea urchin species, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*. The sensitivity of these marine organisms was evaluated by acute toxicity tests with amphipod juveniles of and a short-chronic embryo-larval tests in sea urchins using the reference toxicants, ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ), potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), sodium dodecyl sulfate ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) and zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ). The acute toxicity tests in amphipods clearly demonstrated the gradient of toxicity for these substances. The two-way ANOVA analysis showed that *M. gryllotalpa* was more sensitive than *G. aequicauda* to all the reference toxicants studied ( $p < 0.0001$ ). The tests conducted with sea urchins also pointed to a toxicant gradient and these organisms were seen to be more sensitive than the tests involving amphipods. The two-way ANOVA analysis showed no significant differences in the IC25 and IC50 values for each reference toxicant in the three sea urchins. The interaction of sea urchin species and reference toxicant had no significant effect (two-way ANOVA,  $p = 0.9$ ), the sensitivity of these Mediterranean species and groups being similar to the sensitivity of other species of amphipods and sea urchins found in the bibliography. The objective of our study is to provide ecotoxicological tools to evaluate the potential toxicity of Mediterranean benthic ecosystems, and in this work, we characterize the toxicity of reference toxicants towards autochthonous species of amphipods and sea urchins.

### 3. Introduction

In the aquatic environment, most anthropogenic chemicals and waste materials, including toxic organic and inorganic chemicals, eventually contribute to environmental degradation. The sensitivity of an organism is related to the exposure route (interstitial water, sediment particles or overlying water) and its biochemical response to contaminants. Toxicity tests have become effective tools, providing direct, quantifiable evidence of the biological consequences of contamination, and can be used to measure the interactive toxic effects of complex contaminant mixtures in water and at the sediment-water interface. An important consideration for developing test methods using specific species is to know the relative sensitivity of the organisms to both individual chemical and complex mixtures (USEPA, 1994).

The experiments were performed with two juvenile amphipod species, *Gammarus aequicauda* (Martinov, 1931) and *Microdeutopus gryllotalpa* (A. Costa, 1853), and embryos of three sea urchin species, *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758), *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) and *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816), through embryo-larval toxicity tests. The life history characteristics of these marine organisms have been described in detail by several authors (Ruffo, 1982; Riedl, 1986; Martín *et al.*, 1999). Exposure tests used the reference toxicants, ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), sodium dodecyl sulfate (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) and zinc sulfate (ZnSO<sub>4</sub>). Infaunal amphipods are excellent for short term toxicity tests and are strongly recommended as appropriate test species for acute toxicity tests in marine waters and sediments (U.S. EPA, 1994; ASTM, 1997). Echinoderm embryo-larval development tests have been widely used to characterize a variety of toxicants, including liquid and solid phase protocols (Bryn *et al.*, 1998; Hunt *et al.*, 2001a, b). Many contaminants may affect the survival of larvae and adult sea urchins (Nacci *et al.*, 1986). Generally, amphipods and echinoderms constitute an ideal tool for marine ecotoxicological tests (Gannon and Beeton, 1971; Swartz *et al.*, 1982; Nipper *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; DeValls *et al.*, 1998; Cesar *et al.* 2000; Hunt *et al.*, 2001a; b).

For marine pollution studies, experiments involving sea urchin eggs and embryos are straightforward, rapid and extremely sensitive, providing results of great uniformity and accuracy. Sea urchins are the ideal candidates for this kind of study because they have been used extensively for several decades to study embryonic development (Lee, 1984). In general, such experiments have been accepted internationally as appropriate for toxicity tests (U.S. EPA, 1995; Environment Canada, 1992; CETESB, 1999). The suitability of test organisms obtained from collecting in the field or culture must be verified by conducting a reference toxicity test.

The United States Environmental Protection Agency and the American Society for testing and Material have developed testing methods for species of equinoids and amphipod indigenous to their Atlantic and Pacific coasts (U.S. EPA, 1988 and ASTM, 1990). In contrast, there are no standard protocols for conducting toxicity tests with the native amphipod and sea urchin species of Mediterranean coasts.

The objective of our study was to provide ecotoxicological tools for evaluating the potential toxicity of Mediterranean ecosystems. In this work we characterize the toxicity of five reference toxicants towards autochthonous species of two amphipods and three sea urchins.

## 4. Materials and methods

### 4.1. Collection, holding and acclimation of test organisms

Amphipods were collected from saline coastal lagoons in Santa Pola and San Pedro Natural reserves, S.E. Spain using a 0.5 mm sieve and placed in polyethylene buckets containing algal species, water and sediment from the collection site. Large predators were discarded. The amphipods were immediately transported in constant-temperature containers to the laboratory, where they were maintained in glass aquaria with filtered natural seawater (0.45 µm/GFC Whatman®) under constant aeration. Their food supply consisted of Purina® Rabbit Chow and Tetra-Min® fish food (mixed 1:1). The amphipods were gradually acclimated to the test conditions for 72 h and then randomly selected for testing.

The sea urchins were obtained by SCUBA divers off the Islands of Fraile-Aguilas and Farallón-Cabo de Palos (Murcia, Spain), and were transported to the laboratory immediately in constant-temperature containers covered with macroalgae. In the laboratory, the sea urchins were maintained in glass aquaria with filtered natural seawater, which was constantly renewed (approximately 50 l/min). They received a daily algal food supply collected at the same sampling sites during the acclimation period. At the end of the experiments the sea urchins were returned to the sea.

### 4.2. Amphipod toxicity tests

The water-only reference toxicant tests of the amphipods, *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa*, were carried out using three reference toxicants, ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) and sodium dodecyl sulfate (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaSO<sub>4</sub>), in accordance with slightly adapted protocols of ASTM (1997) and U.S. EPA (1994). The results of a preliminary test were used to set the definitive concentrations of each substance.



The control water and dilution water used in the experiments consisted of natural seawater (38 psu) collected in unpolluted areas (from where the sea urchins were also collected) and filtered through a GFC Whatman® (0.45 µm) filter. Six concentrations and one seawater control were used for each test. Four replicates were prepared per concentration of reference toxicant, using 1 L polyethylene vessels containing 400 ml solution, and ten organisms (2 to 5 mm in length) were selected for each replicate test chamber. Amphipods were excluded if they were gravid females or in noticeably poor health.

Tests were maintained in constant conditions of 20 °C and a 1000 lux 16:8 h light:dark photoperiod, in a culture chamber (ASL - Snijders). All static acute tests were of 48-h duration with no food added. A continuous airflow of approximately two bubbles per second was provided by air pumps and capillary tubing. The number of survivors in each chamber was examined at the end of the exposure period.

At the beginning and the end of every test the overlying water quality parameters, including temperature, salinity, dissolved oxygen and pH content were measured to ensure the acceptability of the tests, following standard methods (APHA, 1995; Buchanan, 1984).

#### **4.3. Sea urchin embryo-larval toxicity test**

Short-term chronic toxicity tests were developed with four reference toxicants, ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), sodium dodecyl sulfate (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaSO<sub>4</sub>) and zinc sulfate (ZnSO<sub>4</sub>), in accordance with slightly adapted guidelines (U.S. EPA, 1995; Environment Canada, 1997 and CETESB, 1999). The sea urchin embryo-larval toxicity tests were conducted with the three echinoid species *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*. Adult female and male urchins were stimulated to spawn with a mild electric shock (35 V) and the gametes were collected separately. Eggs were collected in 200 ml beakers containing dilution seawater and sperm was collected directly from the sea urchin gonopore with a

micropipette and held on ice until egg fertilization. The organisms were allowed to spawn for up to 10 min, during which time careful observations were made of the amount of released gametes, their color, and the overall behavior of the spawners. Animals providing relatively little or dilute gametes were excluded from testing. Each batch of eggs was observed under a microscope in a Sedgwick-Rafter cell; eggs showing abnormalities were discarded. The selected egg batches were then filtered through a 100 µm screen to remove pellets and pooled in a beaker containing 400 ml dilution seawater. Eggs were washed three times by decantation, removing the supernatant and adding dilution seawater. Gametes obtained from at least two or three organisms of each sex were combined and their densities determined. A standard sperm solution was prepared by adding 0.5 ml of sperm to 24.5 ml of dilution seawater. At the beginning of the study, pretrial testing was conducted in order to determine the fecundation ratio and only rates higher than 90% were employed. The volume of solution added to the test tubes for each experiment was calculated according to the desired number of organisms required, approximately 400 fertilized eggs being added to each test chamber. This volume did not exceed 100 µl.

The control water and dilution water used in the experiments consisted of natural seawater (38 psu) collected in unpolluted areas (from where the sea urchins were also collected) and filtered through a GFC Whatman® filter. Six concentrations and ten seawater controls were used for each test. Three replicates were prepared per concentration, using 15 ml polyethylene sterilized centrifuge tubes containing 10 ml solution, to which 400 embryos were added. All short-term chronic tests were of 28 to 38 h duration according to the species, and the number of normally developed embryos was counted at the end of the test. Tests were carried out at 20 °C, with a (1000 lux) 16 h light: 8 h dark photoperiod in a culture chamber (ASL - Snijders). The exposure period varied from 28 h for *P. lividus* to 38 h for *A. lixula* and *S. granularis*. The tests finished when at least 90 % of control embryos reached the normal pluteus larvae stage (evidenced by formation of a three-part gut and skeletal rods), at which point each test tube was fixed with 10 % buffered formalin to preserve the samples.

They were then examined microscopically in a Sedgewick-Rafter cell to determine the percentage that developed, calculating the normal / abnormal ratio for the first 100 embryos encountered in each tube. The results of a preliminary test were used to set the definitive concentrations of each substance.

At the beginning and the end of every test the overlying water quality parameters, including temperature, salinity, dissolved oxygen and pH content were measured to ensure the acceptability of the tests, following standard methods (APHA, 1995; Buchanan, 1984).

#### **4.4. Data analysis**

As an estimate of the effective toxic concentration of amphipods, 48-h EC50 values and their respective 95% confidence limits were calculated for all substances using the Trimmed Spearman-Kärber method (Hamilton *et al.*, 1977). Differences in EC50 and between amphipod species and reference toxicants were evaluated by two-way ANOVA. The inhibiting concentration (IC) for a specified effect (IC25 and IC50) on sea urchins was calculated using the Linear Interpolation Method (U.S. EPA, 1993). Two-way ANOVA analyses were used to evaluate significant differences in IC25 and IC50 among sea urchin species for each reference toxicant. The precision of the laboratory data was calculated for all species from the coefficient of variation (CV%), using the mean and relative standard deviation with the following equation:

$$CV\% = \text{standard deviation} / \text{mean} \times 100.$$

## 5. Results

### 5.1. Amphipod toxicity tests

The reference toxicants adversely affected both species to a similar extent (Fig. 1), with higher survival rates being recorded in the control (greater than 80%). The two-way ANOVA analysis showed that *Microdeutopus gryllotalpa* was more sensitive than *Gammarus aequicauda* to all the reference toxicants studied ( $p < 0.0001$ ). There were significant differences in the effective concentration (EC50) values of ammonium chloride, potassium dichromate and sodium dodecyl sulfate ( $p = 0.02$ ). No significant differences were found in the amphipod species-reference toxicant interaction ( $p = 0.2$ ).

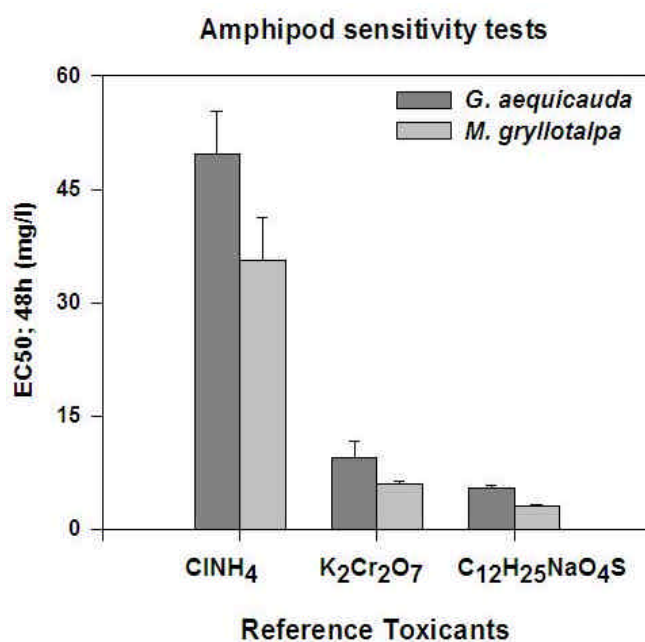
The effective concentrations (EC50, 48h) for *G. aequicauda* and for *M. gryllotalpa*, together with the standard deviations, number of experiments and the coefficient of variations are described below and in the table and figure 1. The results for *G. aequicauda* were 49.68 ? SD 11.24 mg/l in the case of ammonium chloride (n= 4), CV%= 22.62; of 9.52 ? SD 4.7 mg/l for potassium dichromate (n= 5), CV%= 49.36 and 5.46 ? SD 0.73 mg/l for sodium dodecyl sulfate (n=4), CV%= 13.36 (fig. 1). The effective concentrations for *M. gryllotalpa* were lower: 35.54 ? SD 8.0 mg/l for ammonium chloride (n=3), CV%= 22.50; 6.0 ? SD 0.6 for potassium dichromate (n=3) CV%= 10.56 and 2.98 ? SD 0.49 for sodium dodecyl sulfate (n=6), CV%= 16.44 (Fig.1). The sensitivity of these Mediterranean species was similar to the that of other species of amphipods described in the bibliography (ASTM, 1997; Andrew, 1999; U. S. EPA, 1994). The coefficient of variation (CV%) for the amphipod toxicity tests using the reference toxicants pointed to an acceptable degree of precision. Water quality data (T°C, D.O., salinity and pH) were constant and within acceptable limits during the experiments.

**Table 1.** Average EC50 concentration mg/L ( $\pm$  standard deviation) of the reference substances, number of tests and associated coefficient of variation for the amphipod species.

Species	<i>G. aequicauda</i>			<i>M. gryllotalpa</i>		
Toxicants	NH <sub>4</sub> Cl	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaSO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaSO <sub>4</sub>
Mean $\pm$ sd	49.68 $\pm$ 11.24	9.52 $\pm$ 4.70	5.46 $\pm$ 0.73	35.54 $\pm$ 8.00	6.06 $\pm$ 0.64	2.98 $\pm$ 0.49
* N=	5	5	5	5	5	6
** CV%	22.62	49.36	13.36	22.50	10.56	16.44

\* Number of experiments

\*\* Coefficient of variation (%).

**Figure 1.** Reference toxicant results ( $\pm$  standard deviation) of the amphipod *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa* for reference toxicants, ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) and sodium dodecyl sulfate (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaSO<sub>4</sub>).

## 5.2. Sea urchin embryo-larval toxicity test

The sensitivity of embryo-larval sea urchin tests was similar for all three species, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*. The two-way ANOVA analysis showed no significant differences in the IC25 and IC50 values for each reference toxicant in the three sea urchins. The interaction of sea urchin species and reference toxicants had no significant effect (two-way ANOVA,  $p=0.9$ ). The two-way ANOVA analysis of IC50 of sea urchins demonstrated highly significant differences between reference toxicants ( $p<0.00001$ ). However, there were no significant differences between the individual IC25 and IC50 values for the three species for each reference toxicant ( $p>0.05$ ). Also, the ANOVA analysis did not show any significant toxicant-species interactions ( $p>0.05$ ).

The inhibiting concentrations (IC25 and IC50  $\pm$  SD and CV%, respectively) for *A. lixula* were 1.71 / 2.48  $\pm$  0.07 / 0.04 mg/l in the case of ammonium chloride (n=4), CV%= 4.09 / 1.6; for 1.07 / 1.80  $\pm$  0.11 / 0.06 mg/l for cadmium chloride (n=5), CV%= 10.28 / 3.33; for 1.10 / 1.56  $\pm$  0.04 / 0.06 mg/l for sodium dodecyl sulfate (n=6), CV%= 3.63 / 3.84 and 0.03 / 0.05  $\pm$  0.001 / 0.002 for zinc sulfate (n=6), CV%= 6.66 / 2 (Table 2 and figures 2, 3, 4 & 5). For *P. lividus* were 1.95 / 2.71  $\pm$  0.17 / 1.19 mg/l in the case of ammonium chloride (n=4), CV%= 8.71 / 7.01; for 1.18 / 2.06  $\pm$  0.06 / 0.14 mg/l for cadmium chloride (n=3), CV%= 5.08 / 6.79; for 1.01 / 1.49  $\pm$  0.04 / 0.04 mg/l for sodium dodecyl sulfate (n=6), CV%= 3.96 / 2.68 and for 0.03 / 0.05  $\pm$  0.001 / 0.001 for zinc sulfate (n=6), CV%= 3.33 / 2 (Table 2 and figures 2, 3, 4 and 5). For *S. granularis* were 1.87 / 2.24  $\pm$  0.06 / 0.04 mg/l in the case of ammonium chloride (n=4), CV%= 3.20 / 1.78; for 1.87 / 2.24  $\pm$  0.06 / 0.04 mg/l for cadmium chloride (n=3), CV%= 3.21 / 1.78; for 1.06 / 1.65  $\pm$  0.06 / 0.04 mg/l for sodium dodecyl sulfate (n=5), CV%= 5.66 / 2.42 and for 0.03 / 0.06  $\pm$  0.001 / 0.001 for zinc sulfate (n=5), CV%= 3.33 / 2 (Table 2 and figures 2, 3, 4 and 5). Zinc sulfate was slightly more toxic than the other four chemicals. The larval responses to dodecyl sulfate were very uniform in the three sea urchin species, with a low standard deviation, the sensitivity of these Mediterranean species being similar to

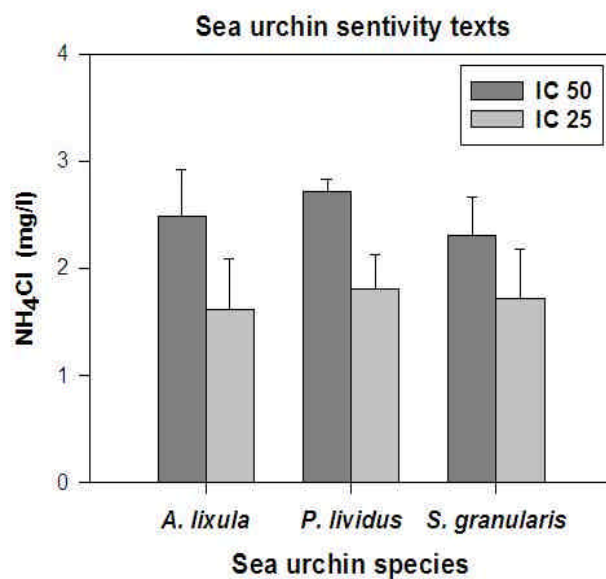
the sensitivity of other species of sea urchins found in the bibliography (Kobayashi, 1980; 1984 and Nacci, 1986). The coefficient of variation (CV%), for the sea urchin toxicity tests, based on IC25 and IC50, show a good degree of precision. Water quality data (T°C, D.O., salinity and pH) were constant and within acceptable limits during the experiments.

**Table 2.** Average IC50 and IC25 concentrations mg/L ( $\pm$  standard deviation) of the reference substances, number of tests and associated coefficient of variation for sea urchins species.

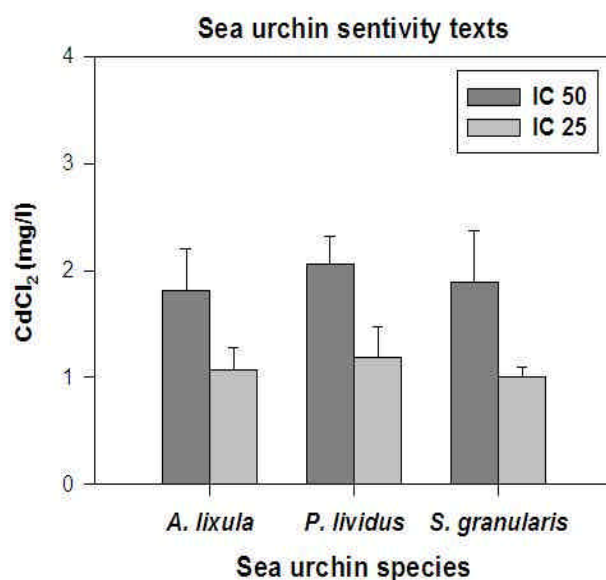
Species	<i>A. lixula</i>		<i>P. lividus</i>		<i>S. granularis</i>	
	IC50	IC25	IC50	IC25	IC50	IC25
NH <sub>4</sub> Cl	2.48 $\pm$ 0.04	1.71 $\pm$ 0.07	2.71 $\pm$ 0.19	1.95 $\pm$ 0.17	2.24 $\pm$ 0.04	1.87 $\pm$ 0.06
*N =	4	4	4	4	3	3
**CV%	1.61	4.09	7.01	8.71	1,78	3.20
CdCl <sub>2</sub>	1.80 $\pm$ 0.06	1.07 $\pm$ 0.11	2.06 $\pm$ 0.14	1.18 $\pm$ 0.06	2.24 $\pm$ 0.04	1.87 $\pm$ 0.06
*N =	5	5	3	3	3	3
**CV%	3.33	10.28	6.79	5.08	1.78	3.21
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	1.56 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.04	1.65 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.06
*N =	6	6	6	6	5	5
**CV%	3.84	3.63	2.68	3.96	2.42	5.66
Zn SO <sub>4</sub>	0.05 $\pm$ .001	0.03 $\pm$ .002	0.05 $\pm$ .001	0.03 $\pm$ .001	0.05 $\pm$ .001	0.03 $\pm$ .001
*N =	6	6	6	6	5	5
**CV%	2	6.66	2	3.33	2	3.33

\* Number of experiments.

\*\* Coefficient of variation.

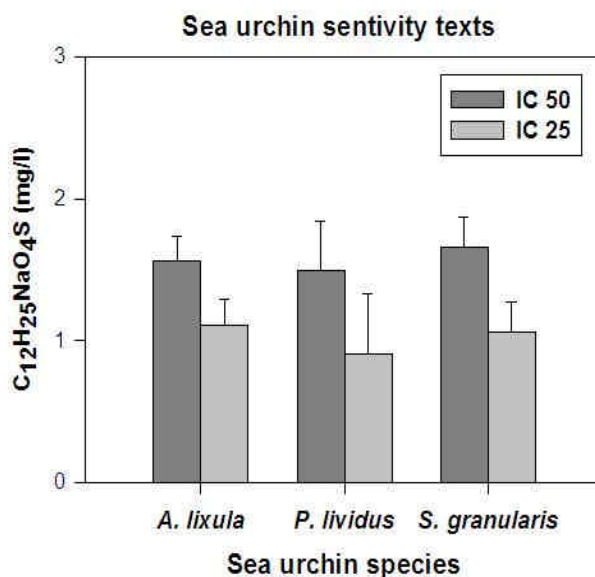


**Figure 2** Reference toxicant results (IC-25/50  $\pm$  standard deviation) for ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) with *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*.

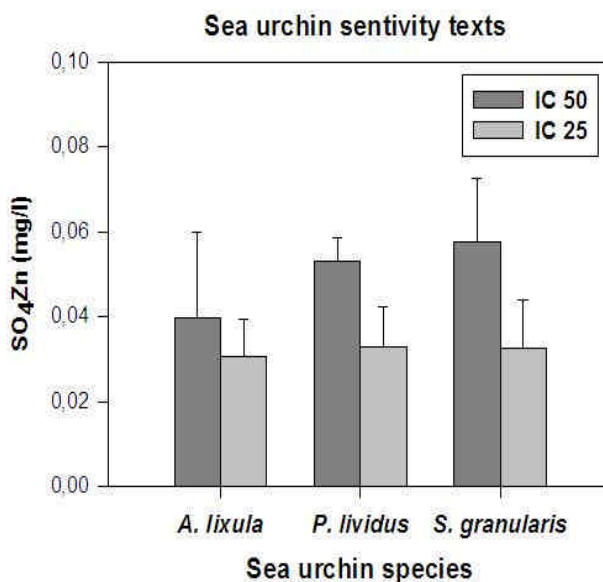


**Figure 3.** Reference toxicant results (IC-25/50  $\pm$  standard deviation) for cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) with *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*.





**Figure 4.** Reference toxicant results (IC-25/50  $\pm$  standard deviation) for sodium dodecyl sulfate ( $C_{12}H_{25}NaSO_4$ ) with *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*.



**Figure 5.** Reference toxicant results (IC-25/50  $\pm$  standard deviation) for zinc sulfate ( $ZnSO_4$ ) with *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*.

## 6. Discussion

Amphipods have been routinely used to evaluate toxicity because of their sensitivity to many contaminants, short generation time, ease of culture in the laboratory, tolerance to a wide range of sediment physico-chemical characteristics, and because they live in direct contact with the liquid-solid interface.

The USA and Canada have recognized toxicity guidelines for sediment quality assessment. Although several standard methods have been developed for assessing the toxicity of contaminants using amphipod species from the Atlantic and Pacific coasts, no such tests have been reported for use in Europe, more specifically in the Mediterranean Sea.

The results of the present study demonstrate that the amphipod *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa* are suitable for toxicity determinations in the Mediterranean Sea. The reference toxicants had a similar effect on sea urchins to that observed in amphipods, although the sea urchins showed greater sensitivity in all the experiments. The sea urchin tests were more effective in other ways, too; for example, they gave an answer more rapidly and at lower cost; they take up less space and may be useful for low to moderate toxicity testing. Sea urchin embryos are ideal for the development of a rapid bioassay system for pollutants in the marine environment (Lee, 1984). The effect of reference toxicants on the Mediterranean amphipod and sea urchin species used was similar to that recorded for species found in the bibliography (Kobayashi, 1980 ; 1984; Nacci, 1986; U. S. EPA, 1994; ASTM, 1997; Andrew, 1999).

The assessment of sediment quality generally involves an evaluation of solid-phase sediments, although porewater is also important, because it represents a major route of exposure to benthic organisms (Whiteman *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 1985) and substantially influences the bioavailability of contaminants (Carr, Chapman, *et al.*, 1996, Ankley *et al.*, 1994; Di Toro *et al.*, 1991; Carr *et al.* 2001).

The use of water column organisms such as sea urchin larvae for porewater toxicity has been recommended for understanding potential biological impact (Adams *et al.*, 1985). A comparison of the sensitivity to chemical substances of marine organisms representative of the water column and benthonic species (epibenthonic and burrowing), showed that the sensitivity of planktonic species is similar to that of epibenthic species and higher than that of burrowing species (Zarba, 1992; Nagell *et al.*, 1974). Reference toxicants such as cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), copper ( $\text{CuSO}_4$ ) and sodium dodecyl sulfate ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$ ) have been recommendable (USEPA, 1994), although no single reference toxicant showed be used to measure the condition of tests organisms in respect to another toxicant with a difference mode of action (Lee, 1980). However, it may be unrealistic to use more than one or two reference toxicants routinely (USEPA, 1994).

Reish 1988 reported the relative toxicity of six metals (arsenic, cadmium, chromium, copper, mercury, and zinc) towards crustaceans, polychaetes, pelecypods and fishes and concluded that no one species or group of test organisms was more sensitive to all of the metals.

We have reported the sensitivity of the amphipod *G. aequicauda* and *M. gryllotalpa*, and the sea urchins, *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis*, to common reference toxicants. In conclusion, the methodology developed using these amphipods and sea urchins is useful for the evaluation and characterization of marine contamination in Mediterranean ecosystems.

## 7. References

- Adams, W.J., Kimerle, R.A. and Mosher, R.G. 1985. Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. In: Cardwell, R.D., Purdy, R. and Bahner, R.C. (eds.), Aquatic toxicology and hazard assessment: Seventh symposium. Philadelphia (PA): ASTM.STP 854, p. 429-453.
- Andrew, K., Leight, R.F. and Van, Dolah. 1999. Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18:958-964.
- Ankley, G.T., Tomas, N.A. and Di Toro, D.M. 1994. Assessing potential bioavailability of metals in sediments: A proposed approach. *Environ. Manage.*, 18: 331-337.
- ASTM. 1990. Proposed standard guide for conducting toxicity tests with sperm and eggs of sea urchins and other echinoids. American Society Testing and Materials. Philadelphia, PA, p. 61.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. 1995. Standard Methods, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- American Society for Testing and Materials. 1997. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. E1367-92. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05. Philadelphia, PA, pp. 731-756.
- Bryn M.P., Brian, S.A. and Hunt, J.W. 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with Zinc. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 453-459.
- Buchanan, J.B. 1984. Sediment analysis. In: Holme, N. A. and McIntyre, A. D. (eds.); *Methods for the study of marine benthos*, Blackwell Scientific Publications, pp. 41-65.

- Carr, R.S., Willians, J.W. and Fragata, C.T.B. 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment porewater toxicity test with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 533-543.
- Carr R.S., Chapman, D.C., Presley, B.J., Biedenbach J.M., Robertson, L., Boothe, P., Kilanda, R., Wade, T., and Montagna, T. 1996. Sediment porewater toxicity assessment studies in the vicinity of offshore oil and gas production platforms in the Gulf of Mexico. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 53: 2618-2628.
- Carr, R.S., Long, E.R., Windom, H.L., Chapamn, D.C., Thursby, G., Sloane, G.M. and Wolfe, D.A. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1218-1231.
- Adams, W.J., Berry, W.J., Burton Jr., G.A., Ho, K., MacDonald, D., Scroggins, R. and Winger, P.V. 2001. Summary of a SETAC technical workshop: Porewater toxicity testing: Biological, chemical and ecological considerations with a review of methods and applications, and recommendations for future areas of research. In: Carr, R.S., and Nipper, M., (eds.), Pensacola, FL. SETAC Press, p. 38.
- Chapman, G.A. 1991. Sea urchin sperm test protocol for interlaboratory comparison, U. S. EPA. Branch, Newport. OR.
- Chapman, P.M. 1996. Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicol.*, 5: 327-339.
- Cesar, A., Marín, L., Vita, R., and Marín, A. 2000. Test de toxicidad con sedimento marino en la costa Mediterránea empleando anfípodos: *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*. In: Espíndola, G., Paschoal, R., Rocha, O., Bohrer, C. and Neto, L. (eds.), Ecotoxicología: Perspectivas para o século XXI, São Carlos, RiMa. pp.17-27.

- CETESB. 1999. Método de ensaio: Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). L5.250. Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil. p. 22.
- DeIvals, T.A., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. 1998. Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz, Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 1073-1084.
- Di Toro, D. M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. and Paquin, P.R. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1541-1583.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars), amended November 1997. EPS 1/RM/27. North Vancouver, BC, p. 97.
- Gannon, J.E. and Beeton, A.M. 1971. Procedures for determining the effects of dredge sediments on biota - benthos viability and sediment selectivity tests. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 43: 392-389.
- Hamilton, M. A., Russo, R.C. and Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicological bioassays. *Envir. Sci. Technol.*, 11: 714-719; correction 12: 417, 1978.
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Tjeerdema, R.S., Taberski, K.M., Wilson, C.J., Puckett, H.M., Stephenson, M., Fairey, R. and Oakden, J. 2001-a. A large-scale categorization of sites in San Francisco Bay, USA, based on the sediment quality triad, toxicity identification evaluations, and gradient studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1252-1265.

- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Newman, J., Tjeerdema, R.S., Fairey, R., Puckett, H.M., Stephenson, M., Smith, R.W., Wilson, C.J. and Taberski, K.M. 2001-b. Evaluation and use of sediment toxicity reference sites for statistical comparisons in regional assessments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1266-1275.
- Kobayashi, N. 1980. Comparative sensitivity of various developmental stages of sea urchins to some chemicals, *Mar. Biol.*, 58: 163- 171.
- Kobayashi, N. 1984. Marine ecotoxicological testing in echinoderms. In: G. Persoone., E. Jaspers. and C. Claus (eds.), *Ecotoxicol. Test. for the Mar. Environ.*, Bredene, Belgium. pp. 341- 381.
- Lee, D.R. 1980. Reference toxicants in quality control of aquatic bioassay. In: Buikema, A.L. and Cairns Jr., J. (eds.), *Aquatic invertebrate bioassays*. ASTM, STP, 715, Philadelphia, PA. pp. 188-199.
- Lee, H.H. 1984. Effects of metals on sea urchin development: A rapid bioassay. *Mar. Pol. Bul.*, 15: 18-21.
- Martín, A.O.; Tocino, L.S.; Gonzalez, S.L. and Martín, J.F.V. 1999. Guía Submarina de Invertebrados no artrópodos. Comares, Granada, p. 401.
- Nacci, DE, Jackim, E. and Walsh, R. 1986. Comparative evaluation of three marine toxicity tests: Sea urchin embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and microtox. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 521-526.
- Nagell, B.; Notini, M. and Grahn, O. 1974. Toxicity of four oil dispersants to some animals from the Baltic Sea. *Mar. Biol.*, 28: 237-243.
- Nipper, M.G., Prósperi, V.A. and Zamboni, A.J. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm Sperm and Embryos. *Environ. Contam. Toxicol.*, 50: 646-652.
- Riedl, R. 1986. Fauna und flora des Mittelmeres. Verlag Paul Parey, Hamburg-Berlin, p. 848.

- Reish, D.J. 1988. The use of toxicity testing in marine environmental research. In: Soule, D.F. and Kleppel, G.S. (eds.), *Marine organisms as indicators*. Springer-Verlag. NY. pp.213-245.
- Ruffo, S. 1982. The amphipoda of the Mediterranean. *Mémoires de l'Institut océanographique*, Monaco. p. 360.
- Swartz, R.C, DeBen, W.A., Sercu, K.A. and Lamberson, J.O. 1982. Sediment toxicity and the distribution of the amphipods in Commencement Bay, Washington, USA. *Mar. Pol. Bul.*, 13: 359-364.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1988. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA-600/4-87/028, Cincinnati, OH.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/-94/025, Narragansett, Rhode Island 02882.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/ 600/ R-95-136. Cincinnati, Ohio.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach. Duluth, MN 55804.
- Zarba, C. 1992. Equilibrium partitioning approach. In: USEPA (eds.), *Sediment classification methods compendium*. 6:6-1-6-10. Washington, D.C.: Environmental Protection Agency.
- Whiteman, F.W., Ankley, G.T., Kahl, M.D., Rau, D.M. and Bacer, M.D. 1996. Evaluation of interstitial water as route of exposure for ammonia in sediment tests with benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 794-801.



**Capítulo 4. Toxicity and larval accumulation  
of metals in sea urchins**

**Capítulo 4. Toxicidad y acumulación larval  
de metales en erizos de mar**

## 1. Resumen

Embriones de los erizos de mar, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*, fueron usados para investigar la acumulación de Zn en tejidos y esqueleto durante desarrollo larval. La sensibilidad de estos organismos marinos fue evaluada a través de tests de toxicidad con sulfato de cinc ( $ZnSO_4$ ) como tóxico de referencia. Después de los tests de toxicidad embriolaval, la concentración de Zn aumentó en tejidos y esqueleto de las larvas. Se determinaron estas concentraciones a través de microanálisis de rayo x bajo un microscopio electrónico de barrido. Los resultados mostraron que el Zn fue acumulado en los tejidos larvales blandos y en el esqueleto calcáreo de *A. lixula*, *P. lividus* and *S. Granularis*. Aunque *A. lixula* bioacumuló Zn en esqueleto y en los tejidos blandos, los niveles eran significativamente más altos en tejidos blandos (ANOVA dos vías,  $p = 0.0001$ ). *P. lividus* acumuló más Zn en tejidos blandos que en el esqueleto pero la concentración de Zn (ANOVA dos vías,  $p= 0.1$ ) y la interacción de concentración de Zn y asignación del tejido no tenía efecto significativo (ANOVA dos vías,  $p= 0.2$ ). En *S. granularis*, el Zn fue mayor en la concentración de 0.16 mg/l, mucho más que en la concentración de 0.01 mg/l. El trabajo presente demuestra que el microanálisis con rayo X en larvas de equinóides tras los tests de toxicidad, puede generar informaciones sobre la biodisponibilidad de los metales pesados responsables para la toxicidad.

## 2. Abstract

Embryos of the sea urchins, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*, were used to investigate the accumulation of Zn in tissues and skeleton during larval development. The sensitivity of these marine organisms was evaluated by exposure tests using zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ) as reference toxicant. After the embryotoxicity tests the Zn accumulated in larval tissues and skeleton was determined by direct xray microanalysis under a scanning electron microscope. The results showed that Zn was accumulated in soft larval tissues and calcareous skeleton of *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis*. Although *A. lixula* bioaccumulated Zn in both skeleton and soft tissues, the levels were significantly higher in soft tissues (two-way ANOVA,  $p=0.0001$ ). *P. lividus* showed more Zn in soft tissues than in skeleton but the Zn concentration (two-way ANOVA,  $p=0.1$ ) and the interaction of Zn concentration and tissue allocation had no significant effect (two-way ANOVA,  $p=0.2$ ). In *S. granularis*, the Zn accumulated in the 0.16 mg/l exposure was several times more than at 0.01 mg/l. The present work demonstrates that x-ray microanalysis of larval echinoids during embryotoxicity tests may substantially increase the sensitivity of sediment or water bioassays because of the better discrimination between the heavy metals responsible for the toxicity.

### 3. Introduction

Studies of heavy metal fluxes through marine organisms are an important tool in ecotoxicology. They allow the assessment of the susceptibility of an organism to be impacted by heavy metals, to accumulate these toxicants, or to constitute a source of contamination for higher trophic levels (Warnau, *et al.*, 1995). Many contaminants are bioaccumulated from water and sediments by marine organisms such as polychaetes, mollusks, amphipods and fishes and by freshwater infaunal organisms including larval insects, oligochaetes and amphipods (Adams, *et al.*, 1987; Oliver, 1987; Connell, *et al.*, 1988; Gobas, *et al.*, 1989; Lake, *et al.*, 1990; Giordano, *et al.*, 1991; Ankley, 1996; USEPA, 2000).

Laboratory and field studies have found that adult sea urchins exposed to heavy metals accumulate Cd, Pb and Zn in both skeleton and gonads (Warnau, *et al.*, 1995; Ablanedo, *et al.*, 1990; Chinchón, *et al.*, 2000). However, the bioaccumulation of toxicants by larval echinoids has received little attention in comparison with adult echinoids and other organisms. All the life stages of sea urchins have been used to assess and monitor pollutants in marine systems (Dinnel, *et al.*, 1988). The use of sea urchin life stages (especially gametes and embryos) in ecotoxicological testing was established by a variety of workers investigating the effects of metal on fertilization and development in the 1920s and 30s (Lillie, 1921; Hoadley, 1923; 1930; Drzewina and Bohn, 1926; 1927).

The sea urchin larvae of *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758), *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) and *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816) were used in this study. Echinoderm embryo-larval development tests have been widely used to characterize a variety of toxicants, including sediment elutriate, solid phase and interstitial water (Bryn, *et al.*, 1998).

For marine pollution studies, sea urchin eggs and embryos have important advantages: simplicity, ease of use, speed, high sensitivity, unambiguous results, uniformity and high accuracy. In general, both eggs and embryos have been accepted internationally as appropriate test material for toxicity tests (Kobayashi, 1971; 1984; EPA Canada, 1992; USEPA, 1995). Embryotoxicity tests with sea urchins generally provide a sensitive assessment of ecological risk (Nacci, *et al.*, 1986; Ringwood, 1992).

The main objective of the present study was to determine the larval accumulation of Zn in soft tissues and skeleton of *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis* to evaluate the applicability of embryotoxicity development tests for the simultaneous determination of larval bioaccumulation. Direct larval x-ray microanalysis is rapid and provides information on the disturbance of the embryo-larval development of echinoids by heavy metal bioaccumulation.

## 4. Material and methods

### 4.1. Sea urchin embryo-larval toxicity test

Adults of the sea urchin species *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis*, were obtained by SCUBA divers in unpolluted areas of the Mediterranean Sea. The sea urchins were transported immediately to the laboratory in constant-temperature containers covered with macroalgae.

In the laboratory, the sea urchins were maintained in glass aquaria with filtered (GFC Whatman®) natural seawater, which was constantly renewed (approximately 50 l/min). They received a daily algal food supply collected at the same sampling sites.

Short-term chronic toxicity tests were performed in accordance with slightly adapted guidelines (EPA Canada, 1992; USEPA, 1995). Adult female and male urchins were stimulated to spawn with a mild electric shock (35 V) and the gametes were collected separately. Eggs were collected in 200 ml beakers containing dilution seawater, while sperm was collected directly from the sea urchin gonopore with a micropipette and held on ice until egg fertilization. The organisms were allowed to spawn for up to a maximum of 10 min, during which time careful observations were made of the amount of released gametes, their color, and the overall behavior of the spawners. Animals providing relatively little or dilute gametes were excluded from testing. Each batch of eggs was observed under a microscope in a Sedgwick-Rafter cell and eggs showing abnormalities were discarded.

The selected egg batches were then filtered through a 100 µm screen to remove pellets and pooled in a beaker containing 400 ml dilution seawater. Eggs were washed three times by decantation, removing the supernatant and adding dilution seawater. Gametes obtained from at least two or three organisms of each sex were combined and their densities determined. A standard sperm solution was prepared by adding 0.5 ml of sperm to 24.5 ml of dilution seawater.

At the beginning of the study, pretrial testing was conducted in order to determine the fecundation ratio and only rates higher than 90% were employed. The volume of solution added to the test tubes for each experiment was calculated according to the desired number of organisms required, approximately 400 fertilized eggs being added to each test chamber. This volume did not exceed 100  $\mu$ l. Test chambers consisted of sterilized 15 ml polystyrene centrifuge tubes. Tests were maintained at  $20 \pm 2$  °C, with a (1000 lux) 16 h light: 8 h dark photoperiod in a culture chamber (ASL - Snijders).

The exposure period varied from 28 h for *P. lividus* to 38 h for *A. lixula* and *S. granularis*. The tests finished when at least 80 % of control embryos reached the normal pluteus larvae stage. Larvae were counted under a microscope in a Sedgewick-Rafter cell, calculating the normal / abnormal ratio for first 100 embryos encountered in each tube. Sea urchins were tested with Zinc sulfate ( $ZnSO_4$ ) in accordance with accepted guidelines (EPA Canada, 1992; USEPA, 1995). Six concentrations and one seawater control were used for each test.

The control water and dilution water used in the experiments consisted of natural seawater (38 psu) collected in unpolluted areas (where the sea urchins were also collected) and filtered through a GFC Whatman<sup>®</sup> filter. Five replicates were prepared per concentration, using 15 ml polyethylene sterilized centrifuge tubes containing 10 ml solution, to which 400 embryos were added to. All short-term chronic tests were of 28 to 38 h duration according to the species, and the number of normally developed embryos was counted at the end of the test.

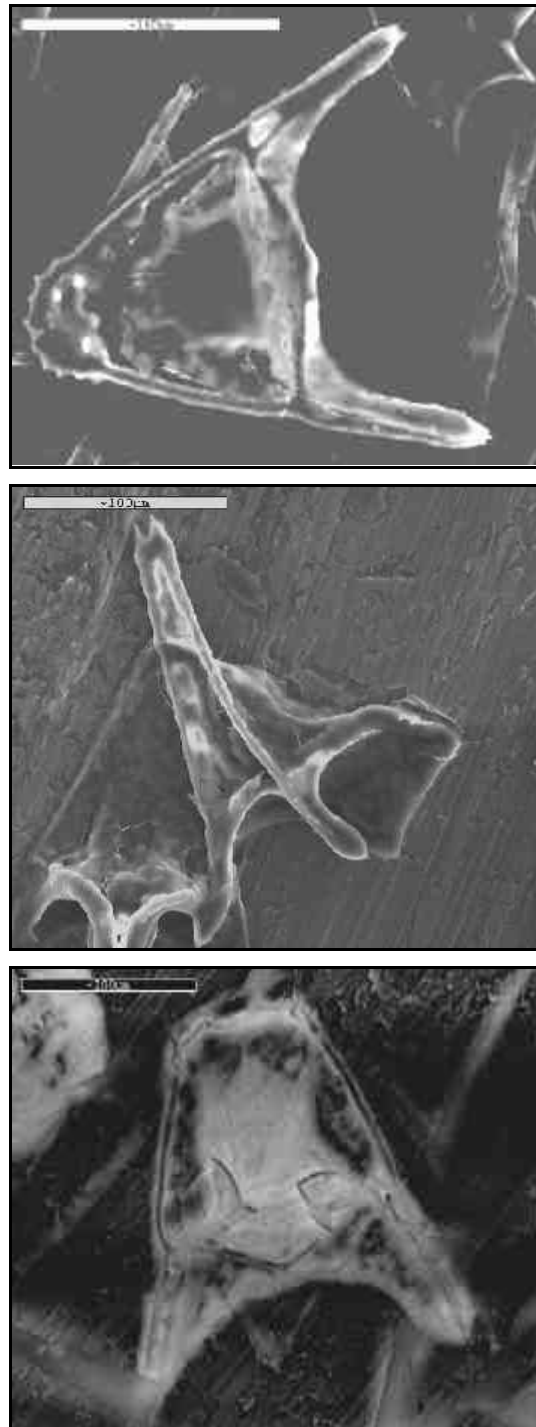
#### **4.2. Scanning electron microscope**

The comparative bioaccumulation of Zn was quantified during the embryo-larval development of the sea urchins *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis*. Sea urchin larvae to be examined by scanning electron microscope were prepared as follows. After the exposure period, the embryos were rinsed in deionized Milli-Q<sup>®</sup> water.

Larvae were centrifuged (3000 rpm) for 10 min and rinsed three times. Microscopical observation of the overlying liquid removed in each centrifugation assured that larvae remained in the bottom of the centrifuge tubes. Clean larvae were taken from the centrifuge tubes and placed on aluminum holders and air-dried. Larval samples were coated with carbon and observed in a Jeol JSM-6100 scanning electron microscope through an EDS ISIS (Oxford x-ray microanalysis system).

The microanalysis were carried out in the central part of the tissues (stomach) and skeleton (post-oral arms) (n=10). Larval composition was calibrated by microanalysis of each holder, only normally developed pluteus larvae being used (Fig.1). In addition, x-ray microanalysis was carried out in isolated skeleton. For this, larval embryos were first cleaned by dissolving the tissue in commercial bleach for 5 minutes on glass slides. After dissolving the tissue, the remaining liquid was directly pipetted under microscopical observation. Echinoid embryos were rinsed three times with deionized Milli-Q<sup>®</sup> water. The glass slides with the cleaned skeleton were air-dried and fixed into holders by carbon cement. All samples were coated by carbon and investigated by x-ray microanalysis.





**Figure 1.** Normal sea urchin larva images through scanning electron microscopy, (a) *A. lixula*, (b) *P. lividus* and (c) *S. granularis*.

### **4.3. Data analysis**

Two-factor analyses of variance were also used to determine differences between skeleton and soft tissues and between the Zn concentrations tested and the control media. Simple-factor of variance was used to compare Zn accumulation data in each sea urchin species. Variance homogeneity was confirmed using Levene's test and Hartley's test before the analyses of variance tests. Differences in Zn accumulation between isolated skeleton and skeleton within the larval tissues were tested by *t*-test.

The IC25 and IC50 of sea urchins were calculated using the Linear Interpolation Method (USEPA, 1993).

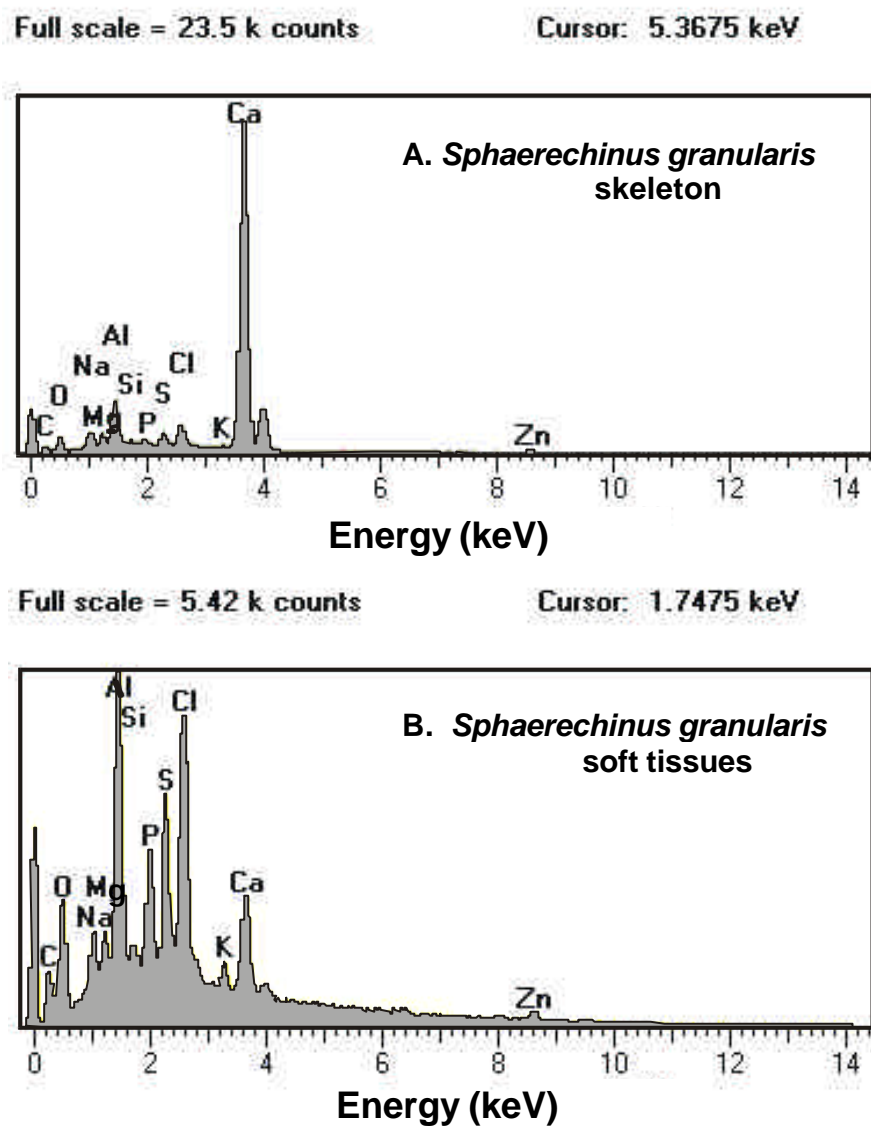
## 5. Results

### 5.1. Sea urchin embryo-larval toxicity test

The sensitivity of the embryo-larval tests evaluated for all three species, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*. The IC50 for the reference toxicant, zinc sulfate, was similar for all three sea urchin species, ranging from 0.045 ( $\pm$  SD 0.015) mg/l for *A. lixula*, 0.051 ( $\pm$ SD 0.003) mg/l for *P. lividus*, and 0.062 ( $\pm$ SD 0.010) mg/l for *S. granularis*. The corresponding values of IC25 were 0.030 (SD 0.010) mg/l for *A. lixula*, 0.032 ( $\pm$ SD 0.004) mg/l for *P. lividus*, and 0.030 ( $\pm$ SD 0.012) mg/l for *S. granularis*. These values agree with the sensitivity range described in the bibliography for other echinoids (EPA Canada, 1992; USEPA, 1995).

### 5.2. Scanning electron microscopy

X-ray microanalysis was carried out on isolated skeleton and directly skeleton located into the whole sea urchin larvae. The percentage of the various components was only calculated for C, O, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca and Zn in skeleton and soft tissues (Fig.2).

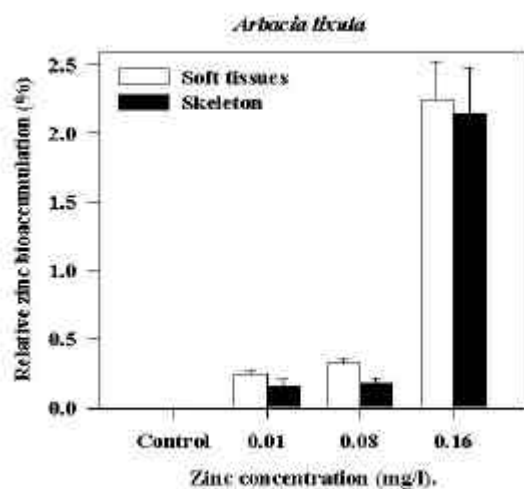


**Figure 2.** X-ray microanalysis graphic showing relative percentage of Zn accumulation in skeleton (a) and soft tissues (b).

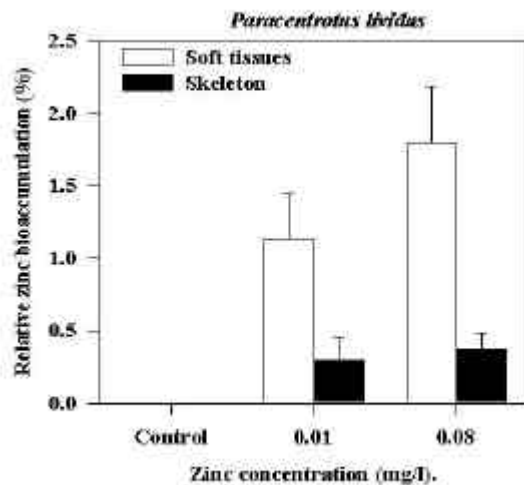
Aluminium was not considered in the analysis because it was the principal element of the scanning electron microscope holders. Isolated skeletons were made up mainly of calcium but also contained Si, P, S, K and Zn.

The x-ray microanalysis of skeleton inside the larval tissues displayed a similar composition but the percentage of carbon and oxygen was higher than in isolated skeleton. All larvae exposed to the Zn concentrations accumulated significantly more Zn in skeleton than the control larvae (one-way ANOVA,  $p < 0.0001$ ). Differences in Zn accumulation between isolated skeleton and skeleton inside the larval tissues were tested by *t*-test. There were no significant differences between the Zn concentration in isolated skeleton and those inside the whole larva (*t*-test;  $p > 0.05$ ). Figures 3, 4, and 5 present the bioaccumulation of Zn in the soft tissues and skeleton of *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis*. Although *A. lixula* bioaccumulated Zn in both skeleton and soft tissues, the levels were significantly higher in soft tissues (two-way ANOVA,  $p = 0.0001$ ).

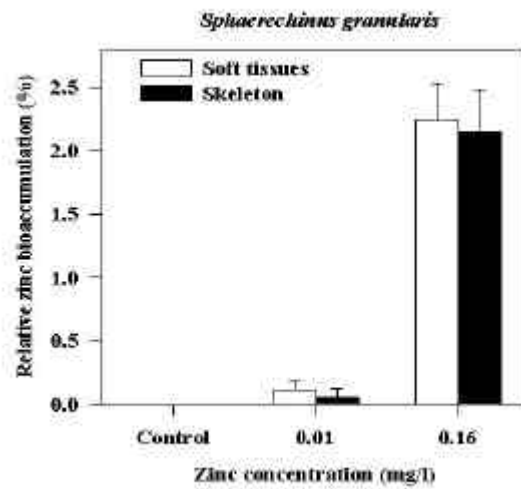
The larvae exposed to the higher concentration of Zn accumulated more heavy metal than those exposed to the lower concentration (two-way ANOVA,  $p = 0.03$ ). There was a nonsignificant interactive effect of tissues part and Zn concentration (two-way ANOVA,  $p = 0.19$ ). Bioaccumulation data are not presented for *A. lixula* at 0.16 mg/l because of the high mortality, which occurred in this treatment (Fig.3). Patterns of Zn accumulation were similar in *A. lixula*, in which the concentration in skeleton and soft tissues did not differ significantly between the two groups exposed to the different concentrations of Zn (0.01 and 0.08 mg/l Zn). *P. lividus* showed more Zn in soft tissues than in skeleton but the Zn concentration (two-way ANOVA,  $p = 0.1$ ) and the interaction of Zn concentration and tissues allocation had no significant effect (two-way ANOVA,  $p = 0.2$ ). In *S. granularis*, the Zn accumulated in the 0.16 mg/l exposure was several times more than at 0.01 mg/l (Fig.2). However, neither tissues allocation (two-way ANOVA,  $p = 0.5$ ) nor the Zn concentration and tissues part interaction was significant (two-way ANOVA,  $p = 0.7$ ).



**Figure 3.** Results of x-ray microanalysis of larvae showing relative percentage of Zn accumulation in skeleton and soft tissues, during exposure period of *A. lixula*. Values are mean  $\pm$  standard deviation (n=10). Zn was not detected in control larvae.



**Figure 4.** Results of x-ray microanalysis of larvae showing relative percentage of Zn accumulation in skeleton and soft tissues, during exposure period of *P. lividus*. Values are mean  $\pm$  standard deviation (n=10). Zn was not detected in control larvae.



**Figure 5.** Results of x-ray microanalysis of larvae showing relative percentage of Zn accumulation in skeleton and soft tissues, during exposure period of *S. granularis*. Values are mean  $\pm$  standard deviation (n=10). Zn was not detected in control larvae.

## 6. Discussion

Heavy metals are an important component in many marine discharges, including sewage, and industrial and mining wastes (Bryan, 1976; Somerfield, *et al.*, 1984). Zinc is used in a variety of industrial processes, and is included in the gray list of metals (Taylor, *et al.*, 1985), it is toxic to animals and aquatic plants (Huebert and Shay, 1992), and has been used as a reference toxicant because it is relatively stable in solution and is a major constituent of municipal sewage effluent (Schafer, 1990).

The mechanism of Zn toxicity to equinoderm embryos was described by Mitsunaga and Yasumasu (1984) and was seen to cause exogastrulation and retarded skeletal rod growth in sand dollar (*Dendraster excentricus*) larvae (Rulon, 1957). It is known to play an important role in cell membrane stability, and increased levels of the metal can compete with calcium accumulation by the mitochondria during anaerobic adenosine triphosphate production (Viarengo, 1985).

Marine organisms can accumulate heavy metals in calcareous skeletons (Campbell and Evans, 1987; Anderlini, 1992; Auernheiner and Chichón, 1997). Metal bioavailability has been assessed directly as the bioaccumulation of metals by the oligochaete and indirectly from the concentrations of dissolved metal present in pore water (Peterson, *et al.*, 1996). Adult sea urchins build their skeletons with calcium carbonate, adopting a crystalline structure such as calcite or aragonite.

Heavy metals displace the calcium of the aragonite or calcite crystalline structures by isomorphic substitution (Chinchón, *et al.*, 2000). The adult echinoids of *P. lividus* and *A. lixula* collected from Portmán, near an abandoned mine in SE-Spain, contained high concentrations of lead and Zn in the plates and spines (Auernheiner and Chichón, 1997).



Adult *P. lividus* and *A. lixula* incorporated lead and Zn into the magnesium calcite crystalline structure through isomorphism (Chinchón, *et al.*, 2000). This is in agreement with Ablanedo *et al.* (1990), who also observed the bioaccumulation of Fe, Zn and Mg in the skeleton of adult echinoid *Echinometra lucunter* in coastal areas impacted by these metals.

They also found a correlation between the Zn contents of gonads and the hard parts of sea urchin *E. lucunter*. Girard *et al.* (2000), noticed that, in sea urchin eggs, the rate of bioaccumulation is lower than that found in other tissues of marine animals.

Our experiment shows in *P. lividus*, *A. lixula* and *S. granularis* that heavy metal begins to be accumulated in the larval tissues and calcareous skeleton during embryonic-larval development.

Bioconcentration is defined as the accumulation of water-borne substances alone. At any time during an exposure, it is the net result between uptake and elimination of the substances. Differences in the Zn accumulation levels in the three sea urchins studied could account for some of the differences in larval species sensitivity. Further research is needed to determine the heavy metal fluxes through this larval echinoid before it can be selected for environmental monitoring and quality assessments.

The present study has shown that xray microanalysis of larval echinoids applied to embryotoxicity tests may substantially increase the sensitivity of sediment or water bioassays because it allows a better discrimination of the heavy metal responsible for the toxicity.

The larvae of sea urchins are available throughout the year, they have a well known chemical analysis exposure history, they are easy to handle, they can be tested with liquid end solid-phase and they are sensitive and tolerant to the physico-chemical characteristics and contaminants associated with sediments.

## 7. References

- Ablanedo, N., González, H., Ramírez, M. And Torres, I. 1990. Evaluación del erizo de mar *Echinometra lucunter* como indicador de contaminación por metales pesados, Cuba. *Aquat. Living. Resour.*, 3:113-120.
- Adams, W.J., Kimerle, R.A. and Mosher, R.G. 1985. An approach for assessing the environmental safety of chemicals sorbed to sediments. In: Cardwell, R.D., Purdy, R. and Banner, R.C. (eds.), *Aquatic toxicology and hazard evaluation: 7th Symposium*, ASTM STP 854, Philadelphia, PA, pp. 429-453.
- Adams, W.J. 1987. Bioavailability of neutral lipophilic organic chemicals contained in sediments. In: Dickson, K.L., Maki, A.W., Brungs, W.A., (eds.), *Fate and effects of sediment-bound chemicals in aquatic systems*. Proceedings of the 6th Pellston workshop, Florissant, CO, August 12-17, 1984, Pergamon Press, New York, pp. 219-244.
- Anderlini, V. 1992. The effect of sewage on trace metal concentrations and scope for growth in *Mytilus edulis aoteanus* and *Perna canaliculus* from Wellington Harbour, New Zealand. *Scien. Tot. Environ.*, 155: 236-288.
- Ankley, G.T. 1996. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:2138-2146.
- Auernheiner, C. and Chichón, S. 1997. Calcareous skeletons of sea urchins as indicator of heavy metals pollution in Portmán Bay, Spain. *Environ. Geol.*, 29: 78-83.
- Bryan, G.W. 1976. Heavy metal contamination in the sea. In: Johnston J, (ed.), *Marine pollution*. Academic Press, London, pp. 185-302.

- Bryn, M.P., Brian, S.A. and Hunt, J.W. 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with Zn. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17:453-459.
- Campbell, J. and Evans, R.D. 1987. Inorganic and organic ligand binding of Pb and Cd and resultant implications for bioavailability and variability. *Scie. Tot. Environ.*, 62: 219-227.
- Chichón, S., Auernheiner, C., Alastuey, A. and Galí, S. 2000. Accumulation of Pb and Zn in sea urchin plates and spines related to their crystalline structure. *Mar. Pollut. Bull.*, 40:647-649.
- Connell, D.W., Bowman, M., Hawker, D.W. 1988. Bioconcentration of chlorinated hydrocarbons from sediment by oligochaetes. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 16:293-302.
- Dinnel, P.A., Pagano, G.G. and Oshida, P.S. 1988. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: Burke, R.D., Mladenov, P.V, Lambert, P. and Parsley, R.L., (eds.), *Echinoderm Biology*. Proceeding of the sixth international echinoderm conference. Victoria, A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, p. 611.
- Drzewina, A. and Bohn, G. 1927. Effets tardifs de l'argent métallique sur les oeufs d'oursins. *C.R. Soc. Biol.*, 97: 1522-11524.
- Drzewina, A. and Bohn, G. 1926. Action de l'argent métallique sur le sperme et les larves d'oursins. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sci.*, 182:1651-1652.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars), amended November 1997. EPS 1/RM/27. North Vancouver, BC.

- Giordano, R., Arata, P., Ciaralli, L., Rinaldi, S., Giani, M., Cicero, A.M. and Constantini, S. 1991. Heavy metals in mussels and fish from Italian coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.*, 22: 10-14.
- Girard, J.P., Szpunar, J., Pedrotti, M.L. and Pesando, D. 2000. Toxicity of tri-n-butyltin to sea urchin eggs and larvae: relation to bioaccumulation at the nanomolar level. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 1272-1277.
- Gobas, P.C., Bedard, D.C., Ciborowski, J.H. and Haffner, G.D. 1989. Bioaccumulation of chlorinated hydrocarbons by the mayfly (*Hexagenia limbata*) in Lake St. Clair. *Jour. Great. Lakes Res.*, 15:581-588.
- Hoadley, L. 1923. Certain effects of the salts of the heavy metals on the fertilization reaction in *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 44:255-280.
- Hoadley, L. 1930. Some effects of HgCl<sub>2</sub> on fertilized and unfertilized eggs of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 58:123-130.
- Huebert, D.B. and Shay, J.M. 1992. Zn toxicity and its interaction with cadmium in the submerged aquatic macrophyte *Lemna trisulca* L. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:715-720.
- Kobayashi, N. 1971. Fertilized sea urchin eggs as an indicatory material for marine pollution bioassay, preliminary experiments. *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 28: 376-406.
- Kobayashi, N. 1984. Marine ecotoxicological testing in echinoderms. In: Persone, G., Jaspers, E. and Claus, C., (eds.), Ecotoxicological testing for the marine environment, Brendene, Belgium, pp. 341-381.

- Lake, J.L., Rubinstein, N.I., Lee, H., Lake, C.A., Heltshe, J. and Pavignano, S. 1990. Equilibrium partitioning and bioaccumulation of sediment-associated contaminants by infaunal organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1095-1106.
- Lillie, F.R. 1921. Studies of fertilization X. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol. Bull.*, 41: 125-143.
- Mitsunaga, K. and Yasumasu, I. 1984. Stage specific effects of  $Zn_2^+$  on sea urchin embryogenesis. *Dev. Grow. Diff.* 26:317-327.
- Nacci, D.E., Jackim, E. and Walsh, R. 1986. Comparative evaluation of three marine toxicity tests: Sea urchin embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and microtox. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5: 521-526.
- Oliver, E.G. 1984. Uptake of chlorinated organics from anthropogenically contaminated sediments by oligochaete worms. *Can. Jour. Fish. Aquat. Sci.* 41:878-883.
- Oliver, E.G. 1987. Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.*, 21:785-790.
- Peterson, S.G., Ankley, G.T., Edward, N.L. 1996. Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 2147-2155.
- Ringwood, A.H. 1992. Comparative sensitivity of gametes and early development stages of sea urchin (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognamom californicum*), during metal exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 288-295.

- Rulon, O. 1957. Developmental modifications in the sand dollar caused by cobaltous chloride in combination with sodium selenite and Zn chloride. *Biol. Bull.* 113:480-487.
- Schafer, H.A. 1990. Characteristics of effluents from large municipal wastewater treatment plants in 1989. In: Cross, J.N. and Wiley, D.M., (eds.), Southern California Coastal Water Research, Project Annual Report, 1989-1990. Southern California Coastal Water Research Project, Long Beach, CA, USA.
- Somerfield, J.M., Gee, J.M. and Warwick, R.M. 1984. Soft sediment meiofaunal community structure in relation to a long-term heavy metal gradient in Fal estuary system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 105: 79-88.
- Taylor, D., Maddock, B.G. and Mance, G. 1985. The acute toxicity of nine "grey list" metals (arsenic, boron, chromium, copper, lead, nickel, tin, vanadium and Zn) to two marine fish species: Dab (*Limanda limanda*) and grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquat. Toxicol.*, 7:135-144.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/ R-99/ 064. Duluth, MN.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach. Duluth, MN, 55804.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/ 600/ R-95-136. Cincinnati, Ohio.
- Viarengo, A. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.*, 16:153-158.

Warnau, M., Teyssié, J.L. and Fowler, S.W. 1995. Effect of feeding on cadmium bioaccumulation in the echinoid *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 126:305-309.

**Capítulo 5. Amphipod and sea urchin tests to assess  
the toxicity of Mediterranean sediments:  
The case of Portmán**

**Capítulo 5. Tests con anfípodos y erizos de mar para  
evaluar la toxicidad de los sedimentos  
mediterráneos: el caso de Portmán**



## 1. Resumen

El sedimento formado por esteriles de la minereria abandonada depositada en la Bahía Portmán, Murcia, SE-España, fue probado para establecer un posible gradiente de contaminación por metales pesados. Los resultados se compararon con límites de tolerancia obtenidos en los puntos de control y de referencia. Se realizaron tests de toxicidad con sedimento empleando dos especies de anfípodos, *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*, también se realizaron tests de toxicidad con la interface sedimento-agua, agua intersticial y elutriado con tres especies de erizos de mar, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*. La sensibilidad de estos organismos marinos fue evaluada a través de tests de exposición con las siguientes sustancias tóxicas de referencia: cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), dodecilo sulfato de sodio ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) y sulfato de cinc ( $\text{ZnSO}_4$ ). La concentración de metales pesados, disminuí a lo largo del gradiente de profundidad. Los tests de toxicidad aguda de 10 días con anfípodos demostraron claramente este gradiente de toxicidad. Los tests con erizos de mar con la interface sedimento-agua también confirman la contaminación a través de este gradiente de profundidad demostrando resultados aún más sensibles que en los tests que involucran anfípodos.

## 2. Abstract

The sediment formed by the tailings of an abandoned mine which discharged into Portmán Bay, Murcia, SE-Spain, was tested to establish a possible gradient of heavy metals. The results were compared with tolerance limits of what calculated from control sites. Whole sediment toxicity tests were performed on two amphipod species, *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa*, while sediment-water interface and porewater toxicity tests were performed on three sea urchins species, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*. The sensitivity of these marine organisms was evaluated by exposure tests using the reference substances: ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ), potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), sodium dodecyl sulphate ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) and zinc sulphate ( $\text{ZnSO}_4$ ). The concentration of heavy metals, decreased along the contamination gradient. Amphipod 10 day acute toxicity tests clearly demonstrated the gradient of toxicity. The sediment-water interface tests conducted with sea urchins also pointed to a contamination gradient and were more sensitive than the tests involving amphipods.

### 3. Introduction

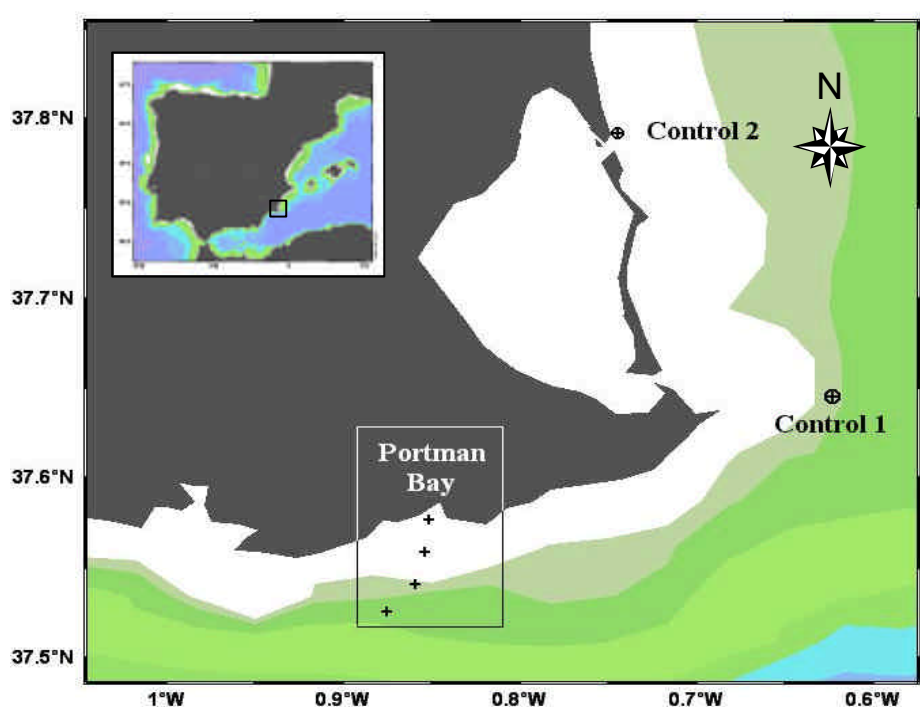
Sediment provides a habitat for many marine organisms and is a major deposit of the more persistent chemicals that are introduced into waters from diverse sources (Ingersoll, 1995). Infaunal amphipods are excellent for short term toxicity tests involving whole sediment and are strongly recommended as appropriate test species for acute toxicity tests in marine and estuarine waters (U.S. EPA, 1994; ASTM, 1997). Echinoderm embryo-larval development tests have been widely used to characterize a variety of toxicants, including sediment elutriate, solid phase and interstitial water (Bryn *et al.*, 1998).

The composition of interstitial water is considered a useful indicator of sediment toxicity, although the exact pathway of contaminant uptake by aquatic organisms is not fully understood (Van Der Berg *et al.*, 1984).

Generally, amphipods and echinoderms constitute an ideal tool for marine ecotoxicological tests (Gannon and Beeton, 1971; Swartz *et al.*, 1982; Nipper *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; DelValls *et al.*, 1998; Cesar *et al.* 2000; Hunt *et al.*, 2001a; b; Fernández and Beiras, 2001; Beiras *et al.*, 2001; Beiras, 2002). For marine pollution studies, experiments involving sea urchin eggs and embryos are straightforward, rapid and extremely sensitive, providing results of great uniformity and accuracy. In general, such experiments have been accepted internationally as appropriate for toxicity tests (U.S. EPA, 1995; Environment Canada, 1997; CETESB, 1999).

We studied the sediments from Portmán Bay (Fig.1), using Mediterranean species of amphipods and sea urchins. Portmán Bay is a natural harbour known in Roman times as "Portus Magnus", where lead was embarked for use throughout the Roman Empire. The surrounding mountains, which are rich in heavy metals, contain numerous old Roman lead workings. Much later, from 1960 to 1991, the Peñarroya mine pumped 6-8 million tons of tailings per day directly into the sea. In total, approximately 11 million m<sup>3</sup> of mine tailing were dumped into Portmán Bay during this period.

The tailings contained calcite, dolomite, pyrite, sulphides of Cd, Cu, Pb and Zn, and some aluminum and silica minerals. The active disposal area extended beyond the continental shelf through a submarine canyon. The mines were abandoned in 1991, leaving about 80 hectares of sediments to fill up the bay, where it is possible to walk over the mine-waste.



**Figure 1.** Geographic location in Iberian Peninsula and position of the sampling points in Portmán Bay and controls.

The objective of our study was to characterize the nature and extent of metal contamination and the toxicity of the sediment deposits. For this, we studied the physical and chemical characteristics of the sediments, and the toxicity of porewater and sediment-water interface on marine invertebrates. The results are discussed in relation to the different test species used.

## **4. Materials and methods**

### **4.1. Sample collection and processing**

Replicate sediment samples were collected from four points along the expected gradient of heavy metal contamination in Portmán Bay. The transect comprised four stations at increasing distances and depths (10, 40, 70 and 80 m depth), from the abandoned mine discharge points into the bay. The two control stations were located off Hormigas Island marine reserve (Control 1) and San Pedro natural reserve (Control 2).

Samples were collected using a Reineck box corer (10x16x35 cm). The top 3-5 cm of superficial sediment was transferred from the grab to air-free containers and held on ice in the dark during transport to the laboratory. Each sediment sample was divided into subsamples to prepare the respective treatments (porewater, elutriate and sediment-water interface). Sediments were stored at 4°C in the dark for no longer than 7 days prior to toxicity testing. Sediment porewater was extracted by centrifugation (2500 G), for 10 min at 4°C. After extraction, porewater samples were kept at 4°C for no longer than 24 h prior to initiating toxicity testing.

The control water and dilution water used in the experiments consisted of natural seawater (38 psu) collected in unpolluted areas (where the sea urchins were also collected) and filtered through a GFC Whatman® filter. Sample containers for sediment chemistry, total organic carbon, and grain size analyses were stored frozen (-20°C).

## 4.2. Toxicity testing

### 4.2.1. Amphipod toxicity tests

The amphipods, *Gammarus aequicauda* (Martinov, 1931) and *Microdeutopus gryllotalpa* (A. Costa, 1853), were collected from saline coastal lakes in Santa Pola and San Pedro Natural reserves, Southeast Spain, using a 0.5 mm sieve and placed in polyethylene buckets containing algal species, water and sediment from the collection site. Large predators were discarded. The amphipods were immediately transported in constant-temperature containers to the laboratory, where they were maintained in glass aquaria with filtered natural seawater (GFC Whatman<sup>®</sup>) under constant aeration. Their food supply consisted of Purina<sup>®</sup> Rabbit Chow and Tetra-Min<sup>®</sup> fish food (mixed 1:1).

Prior to testing (December 1999), the amphipods were gradually acclimated to the test conditions for 72 h and then randomly selected for sediment assays. Ten individuals, 3 to 5 mm in length, were selected for each replicated test chamber. Amphipods were excluded if they were gravid females or in noticeably poor health. Sediments samples were placed in 1 litre polyethylene beakers one day before the amphipods were added, using guidelines described in EPA and ASTM (U.S. EPA, 1994; ASTM, 1997).

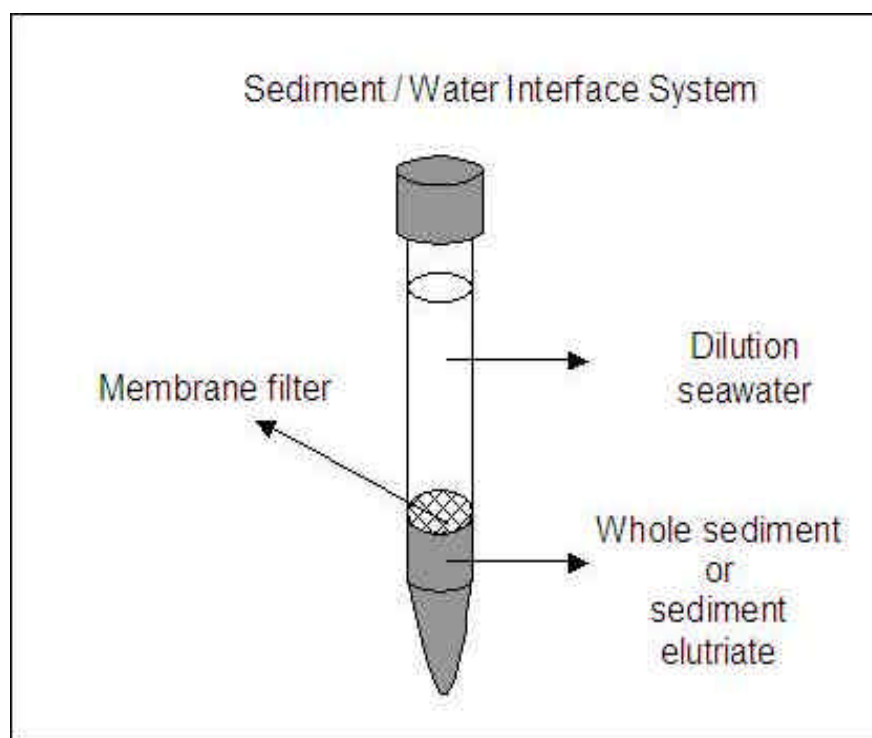
Amphipods were exposed to 150 ml of sediments with 600 ml of filtered seawater. A static acute 10 day toxicity test was conducted with five replicates per treatment. Tests were maintained in constant conditions of 20°C and 1000 lux 16:8 h light: dark photoperiod, in a culture chamber (ASL - Snijders). The amphipods were not fed during the exposure period. A continuous airflow of approximately two bubbles per second was provided by air pumps and capillary tubing. The number of survivors in each chamber was examined at the end of the exposure period.

Concurrent with each toxicity test, every lot of amphipods was evaluated for three reference toxicants: ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) and sodium dodecyl sulphate ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$ ), following ASTM (1997), and U.S. EPA (1994), protocols. Six concentrations and one seawater control were used for each test. The results of a preliminary test were used to set the definitive concentrations of each substance. Four replicates were prepared per concentration using 1 litre polyethylene vessels containing 400 ml solution and ten organisms were added to each replicate. All static acute tests were of 48-h duration with no food added and the number of dead animals was counted at the end of the test.

#### **4.2.2. Sea urchin embryo-larval toxicity test**

Adults of the sea urchin species *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758), *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) and *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816), were obtained by SCUBA divers in Aguilas (Murcia, Spain). The sea urchins were transported to the laboratory immediately in constant-temperature containers covered with macroalgae. In the laboratory, sea urchins were maintained in glass aquaria with filtered (GFC Whatman<sup>®</sup>) natural seawater, which was constantly renewed (approximately 50 l/min). They received a daily algal food supply collected at the same sampling sites. Short-term chronic toxicity tests were performed in October 2000 with the sea urchins in accordance with slightly adapted guidelines (U.S. EPA, 1995; Environment Canada, 1997; CETESB, 1999).

For exposure to the sediment-water interface, 2 ml of whole-sediment sample were introduced into each test tube through a 5 ml syringe (with the tip cut) and 8 ml of dilution seawater were introduced carefully to minimize resuspension. New sterilized syringes were used for each sample and rinsed with dilution seawater. Test tubes were allowed to stabilize for 24 h and then a filter ( $\varnothing$  15 mm - GFC Whatman<sup>®</sup> filter) was placed over the sediment (Fig.2).



**Figure 2.** Whole sediment and elutriate-water interface systems.

The same method was used for elutriate exposures, mixing 2 ml of whole-sediment sample with 8 ml dilution seawater (1 sediment / 4 seawater). After vigorous shaking (approximately 15 min), the tubes were allowed to stabilize for 24 h, after which a permeable membrane was placed on the sediment inside the test tubes with the aid of a clean glass rod.

Adult female and male urchins were stimulated to spawn with a mild electric shock (35 V) and the gametes were collected separately. Eggs were collected in 200 ml beakers containing dilution seawater and sperm was collected directly from the sea urchin gonopore with a micropipette and held on ice until egg fertilization. The organisms were allowed to spawn for up to a maximum of 10 min, during which time careful observations were made of the amount released gametes, their color, and the overall behavior of the spawners.



Animals providing relatively little or dilute gametes were excluded from testing. Each batch of eggs was observed under a microscope in a Sedgwick-Rafter cell and eggs showing abnormalities were discarded. The selected egg batches were then filtered through a 100 µm screen to remove pellets and pooled in a beaker containing 400 ml dilution seawater. Eggs were washed three times by decantation, removing the supernatant and adding dilution seawater. Gametes obtained from at least two or three organisms of each sex were combined and their densities determined. A standard sperm solution was prepared by adding 0.5 ml of sperm to 24.5 ml of dilution seawater. At the beginning of the study, pre-trial testing was conducted in order to determine the fecundation ratio and only rates higher than 90% were employed. The volume of solution added to the test tubes for each experiment was calculated according to the desired number of organisms required, approximately 400 fertilized eggs being added to each test chamber. This volume did not exceed 100 µl. Test chambers consisted of sterilized 15 ml polystyrene centrifuge tubes. Four replicates were used per sediment treatment and three replicates in the reference toxicant tests. Tests were maintained at  $20 \pm 2$  °C, with a (1000 lux) 16 h light: 8 h dark photoperiod in a culture chamber (ASL - Snijders).

The exposure period varied from 28 h for *P. lividus* and to 38 h for *A. lixula* and *S. granularis*. The tests finished when at least 80 % control embryos reached the normal pluteus larvae stage, each test tube being fixed with 10 % buffered formalin to terminate the embryo development process and to preserve the samples. Larvae were counted under a microscope in a Sedgwick-Rafter cell, calculating the normal / abnormal ratio for first 100 embryos encountered in each tube.

Simultaneous with the toxicity test, every lot of sea urchins was tested with four reference toxicants: ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>), sodium dodecyl sulfate (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaSO<sub>4</sub>) and zinc sulfate (ZnSO<sub>4</sub>), in accordance with accepted guidelines (U.S. EPA, 1995; Environment Canada, 1997 and CETESB, 1999). The results of a preliminary test were used to set the definitive concentrations of each substance.

Six concentrations and one seawater control were used for each test. Three replicates were prepared per concentration, using 15 ml polyethylene sterilized centrifuge tubes containing 10 ml solution, to which 400 embryos were added to. All short-term chronic tests were of 28 to 38 h duration according to the species, and the number of normally developed embryos was counted at the end of the test.

### **4.3. Statistical analysis**

Statistical analyses of amphipod and sea urchins in sediment experiments were performed with the *Toxstat*<sup>®</sup> statistical software (Gulley *et al.*, 1991). Significant differences were evaluated with a parametric analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnet's test. Data were checked for normality and homogeneity of variances with Shapiro-Wilk's and Bartlett's test, respectively. Survival and normally developed data were arc sine square root transformed when necessary prior to statistical analyses.

As an estimate of relative lethal toxicity, 48-h EC50 values and their respective 95% confidence limits were calculated for all substances using the Trimmed Spearman-Kärber method with Abbott's correction (Hamilton *et al.*, 1977). The Newman-Keuls test was also applied for comparison of the means of survival obtained in the two surveys.

The IC25 and IC50 of sea urchins were calculated using the Linear Interpolation Method (U.S. EPA, 1993).

### **4.4. Physical and chemical analysis**

The percentage of organic matter in samples was determined by the loss of weight on ignition at 600°C for 8h of a dried sediment from which the carbonates have been previously by acid treatment (Buchanan, 1984).

Grain size distribution was determined by standard mechanical dry sieves shaker techniques to determine particle size in sand, silt and clay fractions (Buchanan, 1984).

At the beginning and the end of every test the overlying water quality parameters including temperature, salinity, dissolved oxygen, pH and total ammonium content were measured to ensure the acceptability of the tests, following standard methods (APHA, 1995; Buchanan, 1984). The concentration of  $\text{NH}_3$  was calculated from the total  $\text{NH}_4$  concentration, pH, temperature and salinity of each sample.

## 5. Results

### 5.1. Toxicity tests

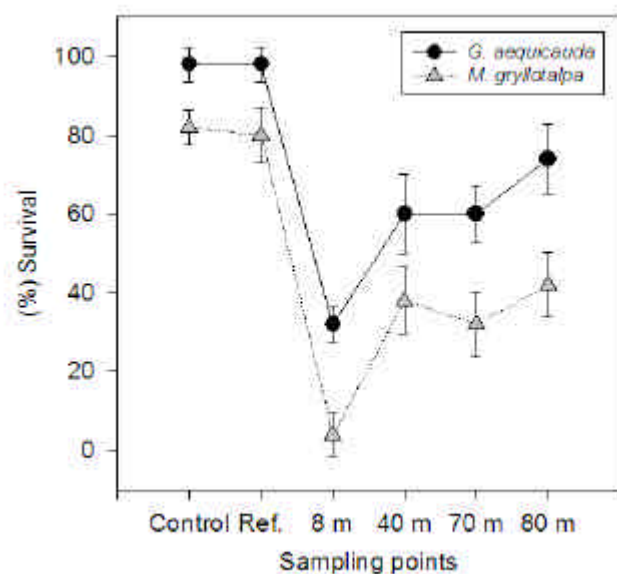
#### 5.1.1. Amphipod toxicity tests

The sediments of Portmán Bay adversely affected both species to a similar extent (Figs. 3 and table 1), with higher survival rates being recorded in deeper sites (40-80 m) than in shallow sites (10m).

Survival in the whole sediment control tests was greater than to 80 %, and no significant differences were found between the control sites. Although *Microdeutopus gryllotalpa* presented higher sensitivity to the individual reference substances, *Gammarus aequicauda* was the most sensitive species to the sediment of the study area.

A comparison of the different sampling points in two surveys for *G. aequicauda* can be seen in table 1, where the survival data are grouped according to significant differences. The results reflect the increase in toxicity the nearer the sampling point is to the outlet. There were significant differences along the pollution gradient (one-way ANOVA;  $p < 0.05$ ).

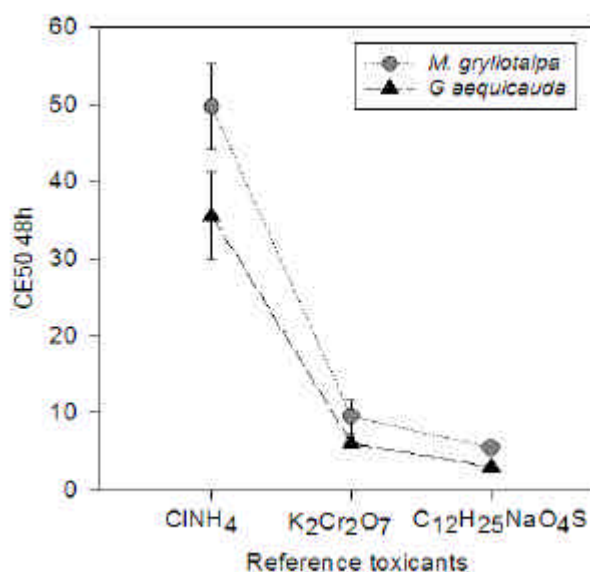
The effective concentrations (EC50, 48h) for *G. aequicauda* were  $49.6 \pm 5.6$  mg/l in the case of ammonium chloride,  $9.5 \pm 2.1$  mg/l for potassium dichromate and  $5.4 \pm 0.3$  mg/l for sodium dodecyl sulphate (Fig. 4). The effective concentrations for *M. gryllotalpa* were lower:  $35.5 \pm 5.6$  mg/l for ammonium chloride,  $6.5 \pm 0.3$  mg/l for potassium dichromate and  $2.9 \pm 0.2$  mg/l for sodium dodecyl sulphate (Fig.4).



**Figure 3.** Survival percentages of *G. aequicauda* and *M. gryllotalpa* in the second survey of the whole sediment toxicity tests along the depth gradient in Portmán Bay (mean values per station with standard error).

**Table 1.** Summary of the toxicity tests for the two surveys. Treatments not underlined by the same line indicate significant difference at  $p < 0.05$  (Newman-Keuls test)

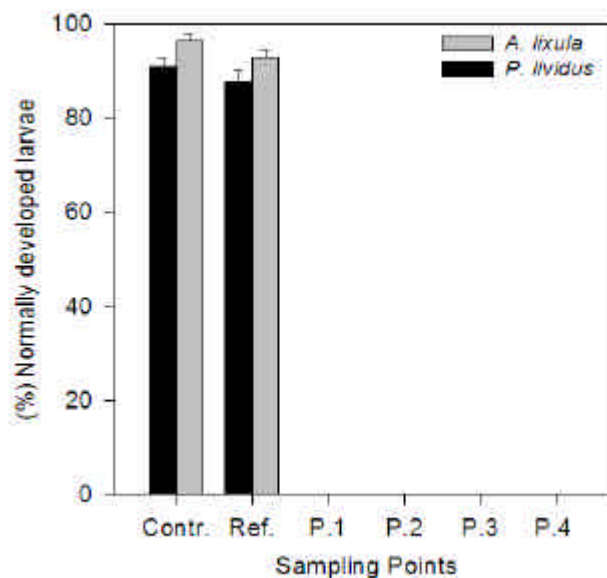
	Contr.	Ref.	Point 4	Point 2	Point 3	Point 1
Survey 1 % survival	95%	91%	52%	42%	42%	15%
Survey 2 % survival	82%	80%	42%	38%	32%	4%



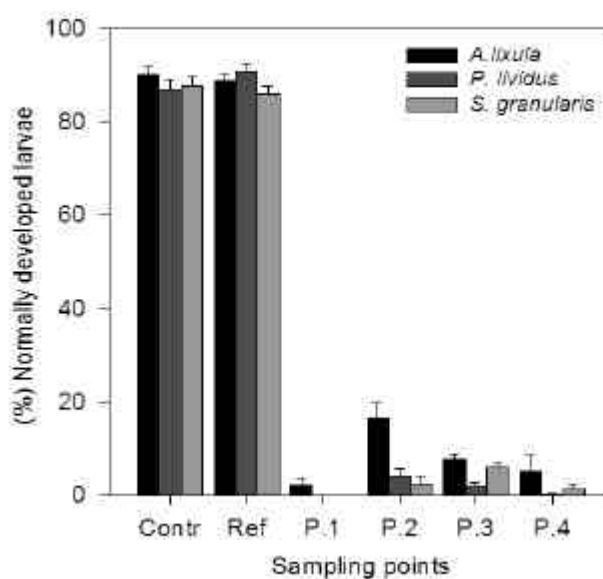
**Figure 4** Amphipods reference toxicants tests (mean values per station with standard error): ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl), sodium dodecyl sulfate (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaSO<sub>4</sub>) and potassium dichromate (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

### 5.1.2. Sea urchin embryo-larval toxicity test

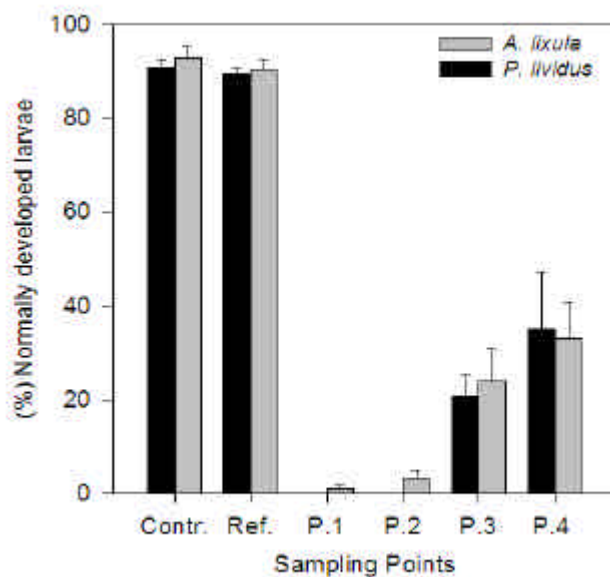
Each sediment treatment (sediment porewater, sediment elutriate and sediment-water interface) had a significantly (ANOVA;  $p < 0.05$ ) adverse effect on all the sea urchin species tested, the porewater showing higher toxicity levels than the elutriate and sediment (Figs. 5, 6 and 7). The sensitivity of embryo-larval sea urchin tests was similar for all three species, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis* (Figs. 5, 6 and 7). The IC<sub>25</sub> and IC<sub>50</sub> for the reference toxicants, ammonium chloride, cadmium chloride, sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate, was similar for all three sea urchin species (Table 2), though zinc sulphate was slightly more toxic than the other four chemicals, the sensitivity of these Mediterranean species being similar to the sensitivity of other species of sea urchins found in the bibliography (ASTM, 97; USEPA, 94; Kobayashi, 84). The larval response to dodecyl sulfate were very uniform in the three sea urchin species, with a low standard error.



**Figure 5.** Porewater tests: comparison of mean percentage of normally developed larvae ( $\pm$  standard error) of *A. lixula* and *P. lividus* at the different sampling points.



**Figure 6.** Elutriate-water interface tests: comparison of mean percentage of normally developed larvae ( $\pm$  standard error) of *A. lixula*, *P. lividus* and *S. granularis* at the different sampling points.



**Fig. 7.** Sediment-water interface tests: comparison of mean percentage of normally developed larvae ( $\pm$  standard error) of *A. lixula* and *P. lividus* at the different sampling points.

**Table 2.** Average ICp50 and ICp25 concentrations (mg/L) and associated standard deviation ( $\pm$ ) of the reference substances for the sea urchins species.

Reference Substances	<i>A. lixula</i>		<i>P. lividus</i>		<i>S. granularis</i>	
	ICp50	ICp25	ICp50	ICp25	ICp50	ICp25
NH <sub>4</sub> Cl	2.56 $\pm$ 0.46	1.70 $\pm$ 0.49	2.72 $\pm$ 0.10	1.80 $\pm$ 0.31	2.30 $\pm$ 0.36	1.71 $\pm$ 0.45
CdCl <sub>2</sub>	2.06 $\pm$ 0.62	1.08 $\pm$ 0.22	2.18 $\pm$ 0.17	1.16 $\pm$ 0.38	2.08 $\pm$ 0.45	1.04 $\pm$ 0.04
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	1.55 $\pm$ 0.17	1.10 $\pm$ 0.18	1.48 $\pm$ 0.34	1.04 $\pm$ 0.14	1.59 $\pm$ 0.22	1.13 $\pm$ 0.14
Zn SO <sub>4</sub>	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01



## 5.2. Physical and chemical analysis

The grain size along the transect of Portmán Bay was affected by the mining activities. While control sediments were muddy sands, the sediments from Portmán Bay were muddy, except in the shallow sampling station (10 m), where coarse sands predominated (Table.3). Almost all the samples had a considerable organic matter content (Table 3). Water quality data of the (T°C, D.O., psu, pH and NH<sub>4</sub>), were constant and within acceptable limits during the experiments, except that ammonium values were high in the porewater and elutriate exposures (Table 3).

Zinc, lead and cadmium were found in high concentrations along the contamination gradient of Portmán Bay and were statistically associated with amphipod and sea urchin larvae toxicity levels.

**Table 3.** Physical and chemical characteristics of Portmán and references sediments (metal levels in sediment by Guerrero and Rodríguez, 1990).

Stations	NH <sub>3</sub> (mg/l)			Organic Matter (%)	Particles <63µm (%)	Contaminants (µg/g dry sed)		
	SWI <sup>a</sup>	PW <sup>b</sup>	Elutriate			Cd	Pb	Zn
Control 1	0.015	0.023	0.020	4.01	8.26	0.01	0.1	0.1
Control 2	0.019	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>	5.00	3.83	0.01	0.1	0.1
Port. 10 m	0.052	1.202	0.066	6.64	8.18	6.25	1182	5.093
Port. 40 m	0.028	3.928	0.036	6.60	51.68	3.32	537	681
Port. 70 m	0.025	1.805	0.061	7.88	41.95	0.39	165	262
Port. 80 m	0.035	6.284	0.093	15.23	54.76	0.25	141	163

SWI<sup>a</sup> = Sediment-water Interface

PW<sup>b</sup> = Porewater

ND<sup>c</sup> = Not determined

## 6. Discussion

Amphipods have been routinely used to evaluate sediment toxicity because of their sensitivity to many sediment-associated contaminants, short generation time, ease of culture in the laboratory, tolerance to a wide range of sediment physicochemical characteristics, and because they live in direct contact with the sediment. Although several standard methods have been developed for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants using amphipod species from the Atlantic and Pacific coasts, no such tests have been reported for use in Europe, more specifically in the Mediterranean. The USA and Canada have recognized toxicity guidelines for sediment quality assessment.

The results of the present study indicate that the tests using *Gammarus aequicauda* and *Microdeutopus gryllotalpa* are suitable for sediment toxicity determinations in the Mediterranean Sea, since such tests clearly identified an environmental gradient of highly degraded communities in Portmán Bay.

The assessment of sediment quality generally involves an evaluation of solid-phase sediments, although porewater is also important, because it represents a major route of exposure to benthic organisms (Whiteman *et al.*, 1996; Carr *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 1985) and substantially influences the bioavailability of contaminants (Carr, Chapman, Plesley *et al.*, 1996, Ankley *et al.*, 1994; Di Toro *et al.*, 1991; Carr *et al.* 2001).

The sediment–water interface tests and reference toxicant tests on sea urchins had a similar effect to the amphipod tests, but the sea urchins showed greater sensitivity in all the experiments and were more effective in other ways too; for example, they gave a response more rapidly and at lower cost. Sea urchins take up less space and may be useful for low to moderate toxicity testing.

The sediments from Portmán Bay, which are strongly contaminated by heavy metals, had a significant ( $p < 0.05$ ) harmful effect on all the species of amphipods and sea urchins studied. Sea urchin larvae showed greater sensitivity than amphipods, although both were more seriously effected in the shallower points studied.

The sensitivity of both amphipod species was similar, pointing to a toxicity gradient from the outlet to deeper sampling points. The effect of reference toxicants on both Mediterranean amphipod species used was similar to that recorded for species found in the bibliography. In all the whole sediment-water interface and reference toxicant tests sea urchins showed greater sensitivity.

The sediment-water interface provided more realistic exposure conditions for epibenthic embryo-larval test organisms and these experiments tended to minimize interferences from porewater constituents, including ammonia and hydrogen sulfide (Hunt *et al.*, 2001a). This methodology has great potential for the evaluation and characterization of marine contamination, supplementing traditional toxicity tests carried out with echinoderms.

Porewater and elutriate tests caused practically 100 % larval mortality in all the contaminated sediments due to the presence of ammonium and heavy metals in concentrations which exceeded larval tolerance. The toxicity of aqueous ammonia solution to many aquatic organisms is primarily attributed to the to the  $\text{NH}_3$  (un-ionized) species, with the ammonium ion (ion-ized) species being relatively less toxic (Armstrong *et al.*, 1978; Thurston and Russo, 1981; Sarda and Burton, 1995). These tests suggest that soft and hard benthic communities from Portmán would be prone to high toxicity during storm events that disturb deep sediments.

The use of water column organisms such as sea urchin larvae for porewater toxicity has been recommended for understanding potential biological impact (Adams *et al.*, 1985), but the method for extracting and diluting the liquid phase can affect the toxicity with sea urchins embryos (Carr, *et al.*, 1996; Beiras, 2001).

A comparison of the sensitivity to chemical substances of marine organisms representative of the water column and benthic species (epibenthonic and burrowing), showed that the sensitivity of planktonic species is similar to that of epibenthic species and higher than that of burrowing species (Zarba, 1992; Nagell *et al.*, 1974).

The tests we describe were carried out ten years after the mine ceased its activity. A recent project for reclaiming Porman Bay has been turned down by the European Commission.

This study has confirmed that the dredging of shallow sediments may produce acute or sub-chronic toxicity to marine invertebrates if they are suspended, the resulting level of toxicity having significant potential for harming local marine ecosystems.

## 7. References

- Adams, W.J., Kimerle, R.A. and Mosher, R.G. 1985. Aquatic safety assessment of chemicals sorbed to sediments. In: Cardwell, R.D., Purdy, R. and Bahner, R.C. (eds.), *Aquatic toxicology and hazard assessment: Seventh symposium*. Philadelphia (PA): ASTM.STP 854, pp. 429-453.
- Adams, W.J., Berry, W.J., Burton, Jr. G.A., Ho, K., MacDonald, D., Scroggins, R. and Winger, P.V. 2001. Summary of a SETAC technical workshop: Porewater toxicity testing: Biological, chemical and ecological considerations with a review of methods and applications, and recommendations for future areas of research. In: Carr, R. S., Nipper, M. (eds.), Pensacola, FL. SETAC Press., p.38.
- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Hester, M.M. and Phillips, B.M. 1996. Assessment of sediment toxicity at the sediment-water interface. In: Ostrader (eds.), *Technics in Aquatic Toxicology*, Lewis, Boca Raton, FL, USA. pp. 609-624.
- Ankley, G.T., Tomas, N.A. and Di Toro, D.M. 1994. Assessing potential bioavailability of metals in sediments: A proposed approach. *Environ Manage*, 18: 331-337.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. 1995. Standard Methods, 18th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- American Society for Testing and Materials. 1997. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. E1367-92. In Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.05. Philadelphia, PA, pp. 731-756.
- Armstrong, D.A., Cippendale, D., Knight, A.W. and Colt, J.L. 1978. Interaction of ionized and un-ionized ammonia on short term survival and growth of spraw larvae, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.*, 154: 15-31.

- Beiras, R., Vázquez, E., Bellas, J., Lorenzo, J.I., Fernández, N., Macho, G., Mariño, J.C. and Casas, L. 2001. Sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal seawater. *Estuar. Coast. Shel. Scien.*, 52: 29-32.
- Beiras, R. 2002. Comparison of methods to obtain a liquid phase in marine sediment toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 23-28.
- Bryn M.P., Brian, S.A. and Hunt, J.W. 1998. Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with Zinc. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 453-459.
- Buchanan, J.B. 1984. Sediment analysis. In: Holme, N. A. and McIntyre, A. D. (eds.); *Methods for the study of marine benthos*, Blackwell Scientific Publications. pp. 41-65.
- Carr, R.S., Willians, J.W. and Fragata, C.T.B. 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment porewater toxicity test with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 533-543.
- Carr R.S., Chapman, D.C., Presley, B.J., Biedenbach, J.M., Robertson, L., Boothe, P., Kilada, R., Wade, T. and Montagna, P. 1996. Sediment porewater toxicity assessment studies in the vicinity of offshore oil and gas production platforms in the Gulf of Mexico. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 53: 2618-2628.
- Carr, R.S., Long, E.R., Windom, H.L., Chapman, D.C., Thursby, G., Sloane, G.M. and Wolf, D.A. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol Chem.*, 15: 1218-1231.
- Cesar, A., Marín, L., Vita, R., Gomez, M., Jimenez, B. and Marín, A. 2000. Test de toxicidad con sedimento marino en la costa Mediterránea empleando anfípodos: *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*. In: Espíndola, G.; Paschoal, R.; Rocha, O., Bohrer, C. and Neto, L. (eds.), *Ecotoxicología: Perspectivas para o século XXI*. São Carlos, RiMa. pp.17-27.

- Chapman, P.M. 1996. Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicology*, 5: 327-339.
- CETESB. 1999. Método de ensaio: Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). L5.250. *Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo*, Brasil., p. 22.
- DelValls, T.A., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. 1998. Integrate assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the gulf of Cádiz, Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 1073-1084.
- Di Toro, D. M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Tomas, N.A. and Paquin, P.R. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1541-1583.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars), amended November 1997. EPS 1/RM/27. North Vancouver, BC., p. 97.
- Fernández, N. and Beiras, R. 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicol.*, 10: 263-271.
- Gannon, J.E. and Beeton, A.M. 1971. Procedures for determining the effects of dredge sediments on biota - benthos viability and sediment selectivity tests. *J. Wat Pollut. Control Fed.*, 43: 392-389.
- Gulley, D., Boelter, A.M. and Bergman, H. L. 1991. TOXSTAT® Computer Program, Version 3.3. University of Wyoming, Laramie, WY.
- Hamilton, M. A., Russo, R.C. and Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicological bioassays. *Envir. Sci. Technol.*, 11: 714-719; correction 12: 417; 1978.

- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Tjeerdema, R.S., Taberski, K.M., Wilson, C.J., Puckett, H.M., Stephenson, M., Fairey, R. and Oakden, J. 2001. A large-scale categorization of sites in San Francisco Bay, USA, based on the sediment quality triad, toxicity identification evaluations, and gradient studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1252-1265.
- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment Tests. In: Gary M.Rand (ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Taylor & Francis, USA. pp. 231-255.
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Newman, J., Tjeerdema, R.S., Fairey, R., Puckett, H.M., Stephenson, M., Smith, R.W., Wilson, C.J. and Taberski, K.M. 2001. Evaluation and use of sediment toxicity reference sites for statistical comparisons in regional assessments. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1266-1275.
- Kobayashi, N. 1984. Marine ecotoxicological testing in echinoderms. In: Persoone, G., Jaspers, E. and Claus, C. (eds.), *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, Bredene, Belgium. pp. 341- 381.
- Nagell, B.; Notini, M. and Grahn, O. 1974. Toxicity of four oil dispersants to some animals from the Baltic Sea. *Marine Biology*, 28: 237-243.
- Nipper, M.G., Prósperi, V.A. and Zamboni, A.J. 1993. Toxicity testing with coastal species of southeastern Brazil. Echinoderm Sperm and Embryos. *Environ. Contamin. Toxicol.*, 50: 646-652.
- Sarda, N. and Burton, Jr. G. A. 1995. Ammonia variation in sediments: spatial, temporal and method-related effects. *Environ. Contamin. Toxicol.*, 14: 1499-1506.
- Swartz, R.C, DeBen, W.A., Sercu, K.A. and Lamberson, J.O. 1982. Sediment toxicity and the distribution of the amphipods in Commencement Bay, Washington, USA. *Mar. Pol. Bul.*, 13: 359-364.
- Thurston, R.V. and Russo, R.C. 1981. Ammonia toxicity to fishes: Effect of pH on the toxicity of the un-ionized ammonia species. *Environ. Sci. Technol.*, 15: 837-840.



- U. S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/-94/025.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/ 600/ R-95-136. Cincinnati, Ohio.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1993. A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach. Duluth, MN 55804.
- Van Den Berg, G.A., Loch, J.P.G., Van Der Heijdt, LM. and Zwolsman, J.J.G. 1998. Vertical distribution of acid-volatile sulfide and simultaneously extracted metals in a recent sedimentation area of the river Muese in the Netherlands. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 758-763.
- Zarba, C. 1992. Equilibrium partitioning approach. In: USEPA (eds.), *Sediment classification methods compendium*. 6:6-1-6-10. Washington, D.C. Environmental Protection Agency.
- Weber, C. I., Horning, W.B., Klemm, D.J., Neiheiselm, T.W., Lewis, P.A., Robinson, E.L., Menkedick, J. and Kessler, F. 1988. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA-600/4-87/028, p. 417.
- Whiteman, F.M., Ankley, G.T., Kahl, M.D., Rau, D.M. and Bacer, M.D. 1996. Evaluation of interstitial water as route of exposure for ammonia in sediment tests with benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 794-801.

**Capítulo 6. Integrative ecotoxicological assessment of the  
marine contamination on the Portmán Bay**

**Capítulo 6. Evaluación ecotoxicológica integrada de la  
contaminación marina de la  
Bahía de Portmán**

## 1. Resumen

La Bahía de Portmán, sudeste España, presenta los sedimentos más seriamente contaminados por metales pesados del Mar Mediterráneo. De 1958 a 1991, aproximadamente 50 millones de toneladas de estériles fueron vertidos en la costa, colmatando prácticamente toda la bahía y una extensa área de la plataforma continental. El objetivo de nuestro estudio fue caracterizar la naturaleza y magnitud de la contaminación por metales, los efectos de las comunidades naturales y la toxicidad de este sedimento depositado después de diez años de la minería haber cesado. Nosotros estudiamos las características físicas y químicas de los sedimentos, la toxicidad del agua intersticial y de la interface sedimento-agua con dos especies de erizo de mar (*Arbacia lixula* y *Paracentrotus lividus*), la biodisponibilidad de los metales, y la estructura de la comunidad de macroinvertebrados a lo largo de un gradiente espacial. Análisis uni y multivariantes indican una fuerte relación entre la toxicidad, concentración de metales en sedimento y la estructura de la comunidad bentónica.

## 2. Abstract

Portmán Bay, southeast Spain, contains the most seriously heavy metal-contaminated sediments of the Mediterranean Sea. From 1958 to 1991, approximately 50 million tons of mine tailings were dumped into the bay, completely filling up the bay and dispersing over an extensive area of the continental platform and continental slope. The objective of our study was to characterize the nature and extent of metal contamination, sediment toxicity and the responses of natural communities to assess the environmental quality of the sediment deposits ten years after mining had ceased. We studied the physical and chemical characteristics of the sediments and the toxicity of the porewater and sediment-water interface using two sea urchin species (*Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*). Metal bioavailability, and patterns of macroinvertebrate community composition along the contamination gradient were also studied. Multivariate analyses indicate a strong relationship between sediment metal concentration, toxicity and benthic community structure.

### 3. Introduction

The mining of metals in the area of Portmán (Murcia, SE/Spain) has a long history. The name Portmán derives from the Latin "Portus Magnus", because it was a natural harbor from which lead was embarked for use throughout the Roman Empire.

The surrounding mountains, which are rich in heavy metals, contain numerous old Roman lead mines. However, the bay itself is a heavily metal-polluted area, where benthic communities have experienced centuries of impairment from the drainage and sedimentation associated with mining activities and their abandonment.

From 1958 to 1991, the Peñarroya mine pumped 3·10,000 tons of tailings per day, first directly into the bay and later, when the bay was filled up, through a two emissary of more than 2 km length. In total, approximately 50 million tons of mine tailing were dumped into Portmán Bay during this period.

In the extraction process 2 m<sup>3</sup> of water were used per ton of mineral a ton of sodium cyanide and some 10 tons of sulfuric acid, as well as, copper sulfate, were used per day. All this material was poured into the sea including the remains of heavy metals known to be toxic and bioaccumulative, such as cadmium, copper, lead and zinc. After filling up the bay, the mining wastes dispersed over an extensive area of the continental platform and the active disposal area extended beyond the continental shelf through a submarine canyon.

A study carried out by the Spanish Institute of Oceanography found that the mineral wastes were distributed along the continental platform and continental slope to a depth of about 150m (Rey and Del Río, 1983). The international press reported on the environmental impact of these mining activities and, due to the social alarm which was expressed on a European scale, Peñarroya mine was forced to close in 1991.

At present, more than 80% of the original surface of Portmán bay (corresponding to approximately 70 hectares) is covered by sediments. Before the mine closed, these wastes represented more than 50% of contribution of metals to the Mediterranean Sea and more than 90% of the pollution caused by solid residues (Gómez and Páez, 1987).

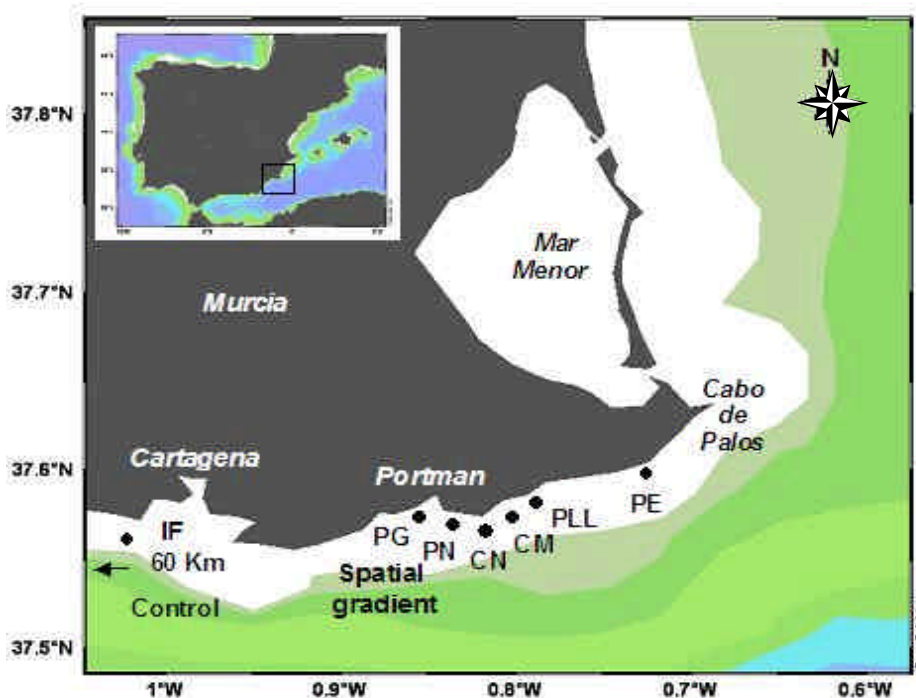
The spatial distribution of metal contamination (Cd, Pb, and Zn) in the water column and sediments was characterized during the 1980's (Rey and Del Río, 1983; De Leona, *et al.*, 1984; Pérez and Puente, 1989). However, the toxicity of these sediments and the interactive effects on benthic communities has not been addressed by previous studies.

The objective of our study was to characterize the nature and extent of metal contamination, sediment toxicity and the responses of natural communities to assess the environmental quality of the sediment deposits ten years after mining had ceased. We studied the physical and chemical characteristics of the sediments, the effect of the porewater and sediment-water interface on marine invertebrates, metal bioavailability, and patterns of macroinvertebrate community composition along the contamination gradient.

## 4. Material and methods

### 4.1. Sample collection and field measurements

Samples were collected synoptically along a spatial gradient at the same depth (10-15 m) in March 2002. The spatial sampling was designed after a previous studies (September and December 1999, October 2000)(Cesar, *et al.*, 2000 and Cesar, *et al.*, in press). Sampling stations were selected at regular distances between the old mine discharge and Cabo de Palos (West-East; Fig.1), while the control station was located on Fraile Island, a natural reserve with marine protected communities, approximately 60 km west of the old emission point. Replicate samples (n=4) were collected from all points (n=7) along the contamination gradient on a spatial scale considered appropriate for examining differences along the gradient.



**Figure 1.** Map of the study area and location of sediment sampling stations: IF - Isla del Fraile; PG - Punta Galera; PN - Punta Negra; CN - Cabo Negrete; CM - Canto de la Manceba; PLL - Punta de la Loma Larga and PE - Punta Espada.

Intact sediment cores were collected by SCUBA divers, capped and sealed carefully underwater and remained in the tubes (10 cm diameter) throughout storage (4°C in the dark). Sediment samples were divided into subsamples for the chemical analyses and toxicity testing to maximize the integrative relationships. Each sediment sample was divided into subsamples to prepare the respective treatments and only the top 3-5 cm of the superficial sediment were used. Sediments were stored at 4°C in the dark for no longer than 7 days prior to toxicity testing. Sediment porewater was extracted by centrifugation (2,500 G) for 10 min at 4°C. The supernatant was decanted and the process was repeated to remove any remaining particles. Porewater extracts were kept at 4°C for no longer than 24h prior to toxicity testing.

The control and dilution water used in the experiments consisted of natural seawater (38 psu) collected in unpolluted areas (where the sea urchins were also collected) and filtered through a GFC Whatman® filter. Laboratory subsampling took place under strictly anaerobic conditions for acid-volatile sulfide and simultaneously extract metals (AVS/SEM), and was stored frozen (-20°C) to prevent sulfide oxidation.

Four replicate samples were collected from each sampling station for benthic analysis using a 0.04 m<sup>2</sup> hand grab by SCUBA divers and sieved through a 500 µm mesh bag. The macroinvertebrates retained on the screen were fixed with 4% buffered formalin, and later washed and transferred to 70% isopropyl alcohol prior to sorting and identifying the macrofauna. Each sieved sample was analyzed individually in the laboratory by stereoscope microscopy to assess species richness and abundance. All the organisms were sorted and identified to the lowest possible taxon level (crustacean, mollusk, echinoderm, sipuncula and lepto-cardia to species level and polychaeta to family level) and their abundance was counted.

Field measurements, station coordinates, depth and sediment-water interface parameters (T°C, psu, OD, OD % sat., pH, Eh,) were made at the time of collection in the all sampling points (Table 1).



**Table 1.** Station location, depth and sediment-water interface field measurements.

Location	Identify	T°C	psu	OD (mg/l)	OD (% Sat.)	pH	Eh (mV)
1. Punta Espada	PE-1	15.3	36.2	2.68	26.2	7.38	-26
37°36'417 N	PE-2	15.1	36.8	2.12	20.5	7.51	-31
0°42'823 W	PE-3	15.3	36.9	2.76	27.4	7.56	-35
-13.8 depth	PE-4	15.3	36.9	2.76	27.4	7.56	-35
2. P. Loma Larga	PLL-1	14.5	38.5	1.17	15.8	7.48	-28
37°35'161 N	PLL-2	14.6	38.7	2.21	21.2	7.61	-33
0°47'165 W	PLL-3	14.5	38.4	2.09	19.0	7.66	-36
-12.8 depth	PLL-4	14.3	38.5	2.20	20.8	7.65	-36
3. C. Manceba	CM-1	14.7	36.9	2.61	29.2	7.51	-34
37°35'052 N	CM-2	14.8	36.7	2.50	27.1	7.54	-34
0°48'376 W	CM-3	14.7	37.0	2.35	26.5	7.55	-36
-15.6 depth	CM-4	14.8	37.4	2.17	21.0	7.54	-34
4. Cabo Negrete	CN-1	14.6	38.5	2.28	20.7	7.97	-59
37°34'327 N	CN-2	14.5	38.5	2.47	22.4	8.00	-55
0°49'326 W	CN-3	14.6	38.0	2.16	22.2	7.85	-47
-12.7 depth	CN-4	14.5	38.6	2.16	22.1	7.93	-51
5. Punta Negra	PN-1	14.7	36.6	2.24	24.1	7.55	-34
37°34'052 N	PN-2	14.6	36.7	1.44	16.1	7.54	-34
0°50'496 W	PN-3	14.5	36.7	1.82	18.1	7.59	-36
-12.8 depth	PN-4	14.6	36.8	1.58	17.6	7.55	-29
6. Punta Galera	PG-1	14.2	36.7	2.65	23.5	7.55	-34
37°34'052 N	PG-2	13.2	37.0	2.14	20.7	7.56	-34
0°51'712 W	PG-3	13.5	37.1	2.18	24.4	7.58	-35
-16.3 depth	PG-4	13.6	37.2	1.84	23.5	7.43	-29
7. Fraile Island	IF-1	14.3	37.9	1.73	20.6	7.71	-46
37°24'655 N	IF-2	14.2	37.4	1.13	20.8	7.95	-51
1°32'861 W	IF-3	14.5	37.2	2.63	32.9	7.83	-45
-15.6 depth	IF-4	14.4	38.3	2.60	29.4	7.82	-44

#### 4.2. Sediment chemical and physical analysis

The sediment water content was measured as a percentage of wet weight lost by drying until constant weight at 60°C for 24h. The dried sediments were finely ground and carefully sieved in a 63 µm stainless steel mesh. The total organic carbon (TOC) content was determined with a Carlo Erba Instruments (EA1108) elemental analyzer following sample preparation with 1 N HCL to decompose the carbonate (Verdardo, *et al.* 1990). The percentage of organic matter in samples was estimated by the loss of weight on ignition (600°C for 8h) of dried sediment from which the carbonates had previously been removed by acid treatment (Buchanan, 1984).

The concentration of ammonia (NH<sub>3</sub>) was determined from the total ammonium (NH<sub>4</sub>) concentration, pH, temperature and salinity of each sample.

Grain size was determined by standard mechanical dry sieve-shaker techniques to determine the sand, silt and clay fractions (Buchanan, 1984).

The moisture content of the sediment subsamples necessary to calculate AVS and SEM concentrations on a dry weight basis was determined by measuring the weight loss after freeze drying. The basic procedures for extracting AVS and selected metals that are solubilized during the acidification step (SEM) have been described by Allen *et al.*, 1993. Five grams of wet sediment was weighed exactly on a 2 cm<sup>2</sup> piece of Parafilm<sup>®</sup> and introduced into the standard taper round-bottom flask with 100 ml deionized water (Milli-Q<sup>®</sup>) and a magnetic stirring bar. The sediment samples were acidified for 30 min by 20 ml of 6 N HCl solution to added the digestion flask to form H<sub>2</sub>S, which was subsequently trapped in a 80 ml sulfide antioxidant buffer (SAOB II) trap solution. The apparatus was deaerated by bubbling nitrogen for 10 min at a flow rate of 100 cm<sup>3</sup>/min, and then the flow was reduced to 40 cm<sup>3</sup>/min during the digestion period. The sulfide ion concentration in the trap solutions was measured with a combined sure-flow silver/sulfide ion selective electrode (ISE-Orion model 9616), which offers the additional benefit of not requiring a separate reference electrode.

Following digestion, the samples were analyzed for aluminium, arsenic, cadmium, copper, iron, mercury, nickel, lead and zinc. These simultaneously extracted metals (SEM) were collected by filtration of the acid-sediment slurry and measured with an optical emission spectrometer (Optima 2000 DV– Perkin Elmer).

### **4.3. Toxicity testing**

The sea urchins used in this study were obtained by SCUBA divers off Fraile Island (IF). The toxicity of the sediment porewater (PW) and sediment-water interface (SWI) was determined using embryo larval development tests with two sea urchin species, *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*, following the procedures described previously (Cesar, *et al.*, in press).

For this, 2 ml of the surface of an intact (unhomogenized) sediment core were introduced carefully into each test tube using a syringe (5 ml) with a cut tip. Eight ml of dilution seawater (1 sediment / 4 water) were introduced carefully to minimize resuspension. New syringes were used for each sample and rinsed with dilution seawater. Test tubes were allowed to stabilize for 24 h and then a circular mesh (45  $\mu\text{m}$ ) with the same diameter as the test tube was placed carefully on the sediment-water interface with the help of a clean glass rod.

Adult female and male sea urchins were stimulated to spawn with a mild electric shock (35 V) and the gametes were collected separately. Simultaneous with the porewater and sediment-water interface toxicity test, each lot of embryos was tested with four reference toxicants: ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ), sodium dodecyl sulfate ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$ ) and zinc sulfate ( $\text{ZnSO}_4$ ), in accordance with accepted guidelines (EPA-Canada, 1992; USEPA, 1995; CETESB, 1999). The results of preliminary tests were used to set the definitive concentrations of each reference toxicant.

Six concentrations and one seawater control were used for each sensitivity test. Three replicates were prepared per concentration, using 15 ml sterilized polyethylene centrifuge tubes containing 10 ml solution, to which 400 embryos were added. The results of these reference toxicants and comparisons between amphipods and sea urchin species were reported in a previous work (Cesar, *et al.*, 2002).

All sub-chronic tests were of 28 to 38h duration depending on the species, and the number of normally developed embryos was counted at the end of the test. After being used in the toxicity tests, the sea urchins were returned to the place of collecting.

Water quality parameters, including temperature, psu, dissolved oxygen, pH and total ammonium concentrations (NH<sub>4</sub>), were measured in the overlying waters from all the replicate test containers at the beginning and at the end of the tests. These measurements were made to determine the concentrations to which toxicity test organisms were exposed and were not designed to estimate field concentrations.

#### **4.4. Larval bioaccumulation tests**

Metal bioaccumulation in sea urchins larvae from sediment-water interface tests was analyzed by x-ray microanalysis. The comparative bioaccumulation was quantified after the embryo-larval development tests of the sea urchins, *A. lixula* and *P. lividus*. Sea urchin larvae were examined by scanning electron microscope and were prepared as follows. After the exposure period, the embryos were rinsed in deionized Milli-Q<sup>®</sup> water, and larvae were centrifuged (2,500 G) for 10 min.

Microscopical observation of the overlying liquid removed in each centrifugation assured that the larvae remained in the bottom of the centrifuge tubes. Clean larvae were taken from the centrifuge tubes and placed on aluminum holders and air-dried. Larval samples were coated with carbon and observed in a Jeol JSM-6100 scanning electron microscope through an EDS ISIS accessory (Oxford X-ray microanalysis system).

The microanalyses were carried out in the central part of the tissues (stomach / n=10). The xray analysis was calibrated by checking the background signals of each aluminum holder.

#### **4.5. Benthic community analysis**

The macroinvertebrate taxonomic data was quantified using the relative benthic index (RBI) adapted to Mediterranean fauna, developed by Anderson *et al.*, (1998; 2001) and the IBI (Integrative Benthic Index), a new index calculated for this study that integrated different ecological community parameters was based on the same methodology.

The original RBI was based on six categories, including total number of species, number of crustacean species, number of mollusk species, number of crustacean individuals, and the presence or absence of positive and negative species.

The IBI was based on ten categories, including the total number of species, the number of crustacean species, number of mollusk species, number of polychaetes families, total number of individuals, and presence or absence of positive and negative species obtained from multidimensional scaling (MDS) analysis and other classical ecological indices (Shannon-Wiener, Pielou and Margalef).

The positive indicator species belonged to the species *Phoxocephalus aquosus*, *Urothoe grimaldii* (Amphipoda) and *Branchiostoma lanceolatum* (Branchiostomida); the negative indicator was *Apseudes latreilli* (Tanaidacea). Positive indicators are not generally found in polluted habitats and are characteristic of regions where anthropogenic and other severe disturbances do not play a major role in structuring communities, while the negative indicators are highly distributed in polluted stations and are not found in unpolluted points (Hunt, *et al.*, 2001).

Each parameter value (one sixth in the RBI and one tenth in the IBI) for each sample was the percentile at which data from that sample fit into the total range for that parameter over all samples. For the two sixths of the RBI and two tenths of the IBI represented by positive and negative indicator species, the parameter was weighted towards the presence and absence of key indicator species, with abundance given additional incremental weight by transforming the abundance of each indicator species to its double square root to compress the range of values. The transformed abundances of the negative indicator species were summed and subtracted from the sum of the transformed abundances of the positive indicator species, and this value was converted to a percentile of the total range for all sites.

The overall RBI for each site was calculated by summing the values for the six parameters and standardizing each sum to the total range of the sums for all stations, resulting in a range of values from 0.00 (most impacted) to 1.00 (least impacted). The threshold value for a degraded benthic community was set at 0.30 since 0.00 to 0.30 was considered indicative of a degraded benthic community, 0.31 to 0.60 was considered transitional, and 0.61 to 1.00 was considered undegraded.

#### **4.6. Statistical analysis**

Toxicity data were checked for normality and homoscedasticity assumptions with Shapiro-Wilk's and Bartlett's test, respectively. Larval development data were arc sine square root transformed prior to statistical analysis.

Significant differences were evaluated with a parametric analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnet's test. These analysis were carried out with the statistical package Toxstat<sup>®</sup> V.3.3 (Gulley, 1991). The Newman-Keuls test was also applied to compare the means of normally developed larvae obtained in the sea urchin toxicity tests.

Univariate measures included the Shannon-Wiener diversity indices calculated using natural logarithms ( $H'$ ), species richness (Margalef's  $d$ ), evenness (Pielou's  $J$ ), total abundance ( $A$ ), and abundance of taxa ( $S$ ). The significance of differences between points was tested using 1-way ANOVA.

#### **4.7. Interrelationships between components**

Multivariate relationships between chemical concentrations and biological effects were evaluated using correlation-based principal components analysis (PCA).

Associations were evaluated among the 6 biological effects and 16 physical-chemical variables. In all cases, only significant negative associations were reported (i.e. increase chemical concentrations associated with decreased biological structure). The analysis was conducted with a correlation matrix and varimax rotation and included any factors that accounted for greater than 10% of the total variance. A component loading cutoff of 0.40 was used in selecting variables for inclusion into factors based on the suggestion by Tabachnick and Fidell (1996) that a cutoff of at least 0.32 be used and that component loading of greater than 0.45 be considered fair or better. Spearman rank correlations were subsequently applied to further evaluate any significant relationships identified by PCA.

The significance of differences between stations was tested by applying the randomization/permutation test ANOSIM (Clark and Ainsworth, 1993) to the Euclidian distance matrix underlying the ordination (Clark and Green, 1988).

To investigate relationships between chemical contamination and biological effects, the Spearman rank correlation coefficients ( $\rho$ ) were calculated. Data for the two sea urchin species and benthic index (RBI and IBI) were combined for all the correlation analyses.

For most of the analyses nonparametric multivariate techniques were used, as described in the PRIMER (Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research, v5) (Clark and Gorley, 2001; Clark and Warwick, 2001) suite of computer programs developed at the Plymouth Marine Laboratory, UK. Ranked lower triangular similarity matrices were constructed using a range of data transformations, the Bray-Curtis similarity measure and group- average sorting. Transformations (fourth root) were used to reduce contributions to similarity by abundant species, and therefore to increase the importance of the less-abundant species in the analysis.

Community structure was examined using multidimensional scaling (MDS) and the significance of differences between stations was assessed using the analysis of similarities (ANOSIM- randomization/permutation test) using the Euclidian distance matrix underlying the ordination (Clark and Ainsworth, 1993; Somerfield, *et al.*, 1994).

The relationships between multivariate community structure and environmental variables were examined using the biological environmental gradients (BIOENV) procedure (Somerfield, *et al.*, 1994), which calculates rank correlations between a similarity matrix derived from various subsets of environmental variables, thereby defining suites of variables which “best explain” the biotic structure. The species contributing to dissimilarities between stations were investigated using the similarities percentages procedure (SIMPER) (Clark and Ainsworth, 1993).



## 5. RESULTS

### 5.1. *Sediment chemical and physical analysis*

Concentrations of un-ionized ammonia ( $\text{NH}_3$ ), total organic carbon, organic matter, acid volatile sulfides (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM), AVS/SEM ratio and grain size, are to be found in table 2. The metal concentrations in sediments showed a strong gradient despite the cessation of mining activity in Portmán Bay twelve years ago. Sediment concentrations of heavy metals, including Zn, Al, Pb and Fe, were low in the control station (IF) and progressively increased towards the emission point (PG), where the highest levels were recorded. Zn, Al, Pb and Fe were found in high concentrations near the emission point and were statistically associated with the toxicity of sea urchin larvae and benthic community structures.

### 5.2. *Toxicity testing*

The percentage of normally developed larvae in PW and the SWI tests are summarized in figures 2 and 3, respectively. The results indicated adverse effects in SWI and PW tests in stations PG, PN, CN, CM and PLL, which showed statistical differences from the control station, IF. However, station PE was not significantly different from the control IF and can also be considered as a reference station. Toxicity tests with PW and SWI presented a similar pattern of response although the normally developed larvae was lower in the former (figs. 2 and 3). Results of the analysis of variance and post hoc tests pointed to significant differences in normally developed larvae between the PW and SWI tests (Table 4).

**Table 2.** Physico-chemical measurements of grain size, un-ionized ammonia, total organic carbon (TOC), organic matter, simultaneously extracted metals (SEM), concentration of acid-volatile sulfides (AVS), total SEM (Cd/Cu/Ni/Pb/Zn) and AVS molar ratio (AVS/SEM) in sediments of all samples.

Sampling points	Ammonium NH <sub>3</sub> (mg/l)		Particle size (%)	TOC (%)	Organic matter (%)	Metals (µmol/g dry sed)								SEM (µmol/g dry sed)	AVS (µmol/g drysed)	SEM/AVS (µmol/g dry sed)	
	PW <sup>a</sup>	SWI <sup>b</sup>	Fines														
				Al	As	Cd	Cu	Fe	Hg	Ni	Pb	Zn					
PE-1	0.004	0.002	0.55	0.1249	0.64	0.57	0.07	0	0	7.58	0	0	0.04	0.08	0.12	0.01	20.81
PE-2	0.004	0.002	0.28	0.1131	0.74	0.55	0.06	0	0	8.07	0	0	0.04	0.08	0.11	0.02	6.28
PE-3	0.004	0.003	0.43	0.1206	0.82	0.65	0.07	0	0	8.47	0	0	0.04	0.08	0.12	0.01	20.10
PE-4	0.005	0.003	0.39	0.1195	0.73	0.50	0.06	0	0	7.47	0	0	0.04	0.08	0.12	0.01	19.92
PLL-1	0.006	0.002	0.62	0.2928	0.68	1.41	0.23	0	0	12.66	0	0	0.09	0.21	0.29	0.26	1.13
PLL-2	0.006	0.003	0.75	0.2882	0.83	1.50	0.24	0	0	13.95	0	0	0.08	0.21	0.29	0.37	0.77
PLL-3	0.006	0.003	0.77	0.2798	0.66	1.40	0.22	0	0	13.37	0	0	0.07	0.21	0.28	0.21	1.31
PLL-4	0.006	0.004	0.76	0.2977	0.78	1.57	0.22	0	0	15.18	0	0	0.08	0.22	0.30	0.32	0.92
CM-1	0.005	0.003	4.33	1.4944	2.35	4.04	0.29	0	0	46.04	0	0.03	0.29	1.18	1.49	0.33	4.53
CM-2	0.005	0.004	1.96	1.2270	2.32	3.02	0.26	0	0	41.24	0	0.05	0.27	0.91	1.23	0.36	3.39
CM-3	0.005	0.004	3.30	1.6680	2.13	4.21	0.29	0	0	58.34	0	0	0.32	1.35	1.67	0.30	5.56
CM-4	0.006	0.004	2.36	1.5702	2.34	4.26	0.29	0	0	54.09	0	0.01	0.32	1.25	1.57	0.23	6.82
CN-1	0.007	0.005	0.15	0.5667	1.62	1.44	0.18	0	0	15.40	0.01	0.02	0.20	0.35	0.57	0.21	2.71
CN-2	0.007	0.004	0.12	0.6066	1.33	1.38	0.19	0	0	18.73	0	0.06	0.21	0.34	0.61	0.23	2.65
CN-3	0.007	0.004	0.49	0.6066	1.29	1.16	0.20	0	0	16.30	0	0.06	0.20	0.35	0.61	0.31	1.96
CN-4	0.006	0.004	0.16	0.5561	1.29	1.41	0.19	0	0	14.38	0	0.05	0.20	0.31	0.56	0.24	2.33
PN-1	0.006	0.004	0.60	17.2637	6.30	13.06	0.57	0	0	186.37	0	0.03	3.30	13.94	17.26	0.22	83.80
PN-2	0.006	0.004	7.19	16.5350	4.57	14.42	0.51	0	0	202.92	0	0.09	2.90	13.55	16.53	0.38	43.29
PN-3	0.006	0.004	4.48	16.0006	4.56	13.90	0.55	0	0.01	198.01	0	0.09	3.05	12.86	16.00	0.18	87.92
PN-4	0.006	0.003	5.00	16.8947	5.20	13.12	0.54	0	0	203.22	0	0.03	3.33	13.54	16.89	0.34	49.26
PG-1	0.004	0.002	4.27	21.3638	6.91	13.17	0.37	0	0	135.74	0.01	0	3.02	18.35	21.36	0.69	30.83
PG-2	0.003	0.002	4.11	21.0078	5.84	14.91	0.38	0	0.02	206.99	0.01	0	3.40	17.59	21.01	0.47	44.60
PG-3	0.003	0.002	4.07	15.8623	5.85	9.75	0.17	0	0	200.81	0.01	0	2.74	13.12	15.86	0.06	247.85
PG-4	0.004	0.002	4.31	15.0451	6.30	9.64	0.18	0	0.01	120.27	0.01	0	2.75	12.29	15.05	0.05	334.33
IF-1	0.005	0.001	1.19	0.1371	2.30	2.56	0.24	0	0	16.97	0	0	0.03	0.11	0.14	0.29	0.48
IF-2	0.006	0.002	1.15	0.1341	1.98	2.47	0.25	0	0	16.37	0	0	0.03	0.10	0.13	0.35	0.38
IF-3	0.004	0.003	0.99	0.1184	1.64	3.78	0.24	0	0	20.35	0	0	0.03	0.09	0.12	0.31	0.39
IF-4	0.004	0.003	1.36	0.1192	1.75	3.92	0.24	0	0	18.84	0	0	0.03	0.09	0.12	0.32	0.38

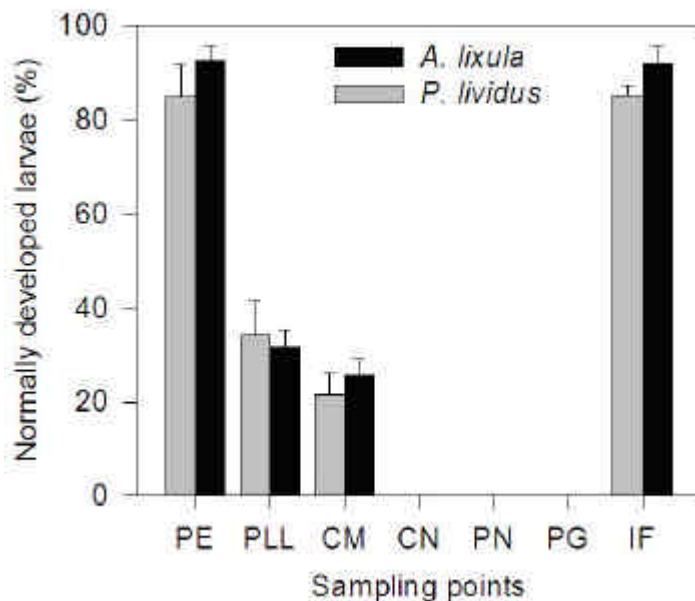
<sup>a</sup> PW- Porewater; <sup>b</sup> SWI- Sediment-water interface

**Table 3.** Individual and species abundances of infaunal benthic macroinvertebrates and values of the relative benthic indices (RBI<sub>1</sub> and IBI<sub>2</sub>)<sup>a</sup>.

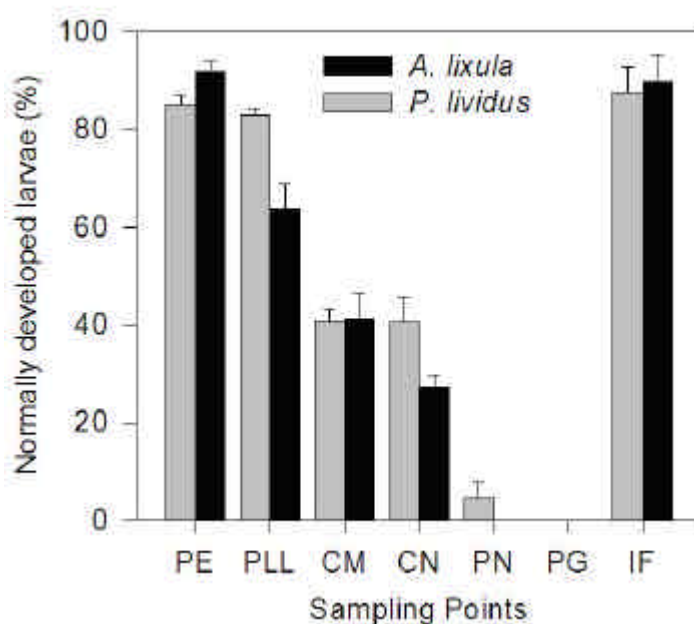
Sample Ident	Amphipods		All crustaceans		Mollusks		Polychaetes		Total		Shannon-Wiener	Margalef's	Pielou's	RIB <sup>1</sup>	IBI <sup>2</sup>
	Indivs	Sps	Indivs	Sps	Indivs	Sps	Indivs	Sps	Indivs	Sps	H'(loge)	d	(J')		
PE-1	34	10	37	12	1	1	39	11	73	24	2.893	5.705	0.888	0.579	0.724
PE-2	32	9	37	12	3	3	43	9	92	26	2.931	5.516	0.900	0.761	0.826
PE-3	32	14	42	18	2	2	24	7	68	29	3.113	6.591	0.924	0.636	0.744
PE-4	51	13	58	17	0	0	23	9	77	24	2.767	5.689	0.849	0.610	0.705
PLL-1	8	4	14	7	1	1	71	8	85	15	2.180	3.367	0.786	0.415	0.554
PLL-2	13	6	22	11	0	0	44	9	65	19	2.573	4.757	0.845	0.374	0.562
PLL-3	53	9	63	11	4	3	81	11	147	25	2.679	5.196	0.813	0.646	0.760
PLL-4	13	6	14	7	0	0	43	8	58	16	2.289	3.694	0.826	0.420	0.556
CM-1	8	6	15	12	0	0	183	8	201	21	2.102	3.956	0.680	0.360	0.572
CM-2	8	6	10	8	3	3	59	8	70	17	2.437	4.209	0.828	0.545	0.653
CM-3	5	4	8	6	1	1	111	10	118	16	1.894	3.342	0.668	0.373	0.544
CM-4	10	6	14	10	1	1	109	9	123	19	2.068	3.943	0.690	0.419	0.578
CN-1	2	2	11	4	2	1	11	6	24	11	2.121	3.417	0.853	0.332	0.465
CN-2	1	1	3	3	0	0	6	3	10	6	1.768	2.502	0.908	0.230	0.359
CN-3	5	3	7	5	0	0	6	3	17	9	2.018	2.824	0.918	0.221	0.368
CN-4	1	1	3	3	0	0	14	4	18	8	1.882	2.717	0.857	0.241	0.379
PN-1	3	2	12	3	0	0	75	11	85	13	2.053	2.911	0.778	0.294	0.436
PN-2	10	5	39	7	0	0	26	7	64	13	1.915	3.114	0.726	0.236	0.391
PN-3	7	4	25	8	5	2	76	12	102	19	2.408	4.718	0.768	0.390	0.598
PN-4	10	3	66	6	3	1	59	10	128	17	1.780	3.298	0.628	0.317	0.465
PG-1	1	1	139	3	1	1	17	2	157	6	0.480	0.989	0.268	0.282	0.223
PG-2	3	3	68	5	1	1	15	2	83	7	0.868	1.580	0.417	0.280	0.256
PG-3	0	0	78	2	5	3	21	1	103	6	0.859	1.292	0.441	0.334	0.298
PG-4	1	1	81	3	3	3	44	3	128	9	0.981	1.649	0.446	0.361	0.252
IF-1	17	9	41	14	3	1	26	12	83	28	3.071	6.510	0.903	0.684	0.817
IF-2	57	9	73	14	3	2	68	12	167	31	2.915	6.050	0.841	0.770	0.869
IF-3	6	3	14	9	5	2	31	9	47	18	2.782	5.315	0.900	0.456	0.629
IF-4	22	8	32	12	7	2	47	12	96	28	3.045	6.121	0.904	0.652	0.804

<sup>a</sup> Relative benthic index by Hunt, *et al* 2001, six parameters (RBI<sub>1</sub>) and integrated benthic index, ten parameters (IBI<sub>2</sub>).

<sup>b</sup> The RBI and IBI threshold value was at 0.30 since 0.00 to 0.30 was considered indicative of a degraded benthic community, 0.31 to 0.60 was considered transitional, and 0.61 to 1.00 was considered undegraded.



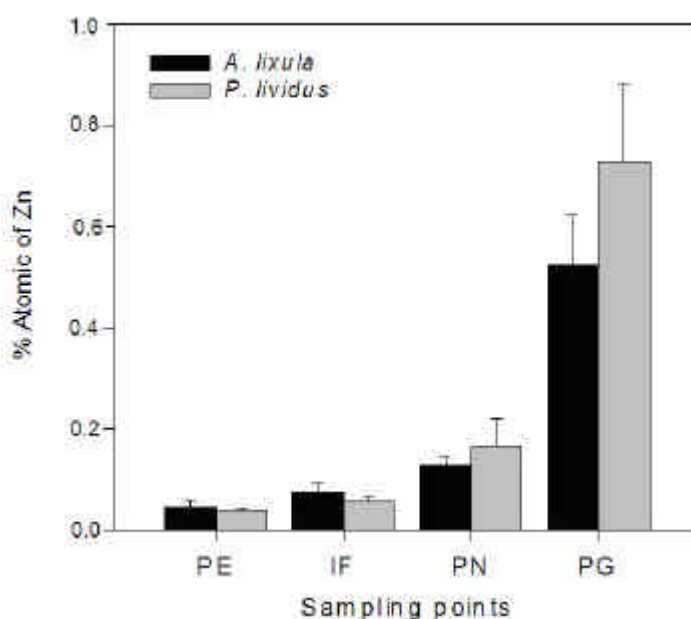
**Figure 2.** Porewater tests: comparison of mean percentage of normally developed larvae ( $\pm$  standard error) of *A. lixula* and *P. lividus* at the different sampling points.



**Figure 3.** Sediment-water interface tests: comparison of mean percentage of normally developed larvae ( $\pm$  standard error) of *A. lixula* and *P. lividus* at the different sampling points.

### 5.3. Larval-bioaccumulation tests

The results for *A. lixula* and *P. lividus* indicated that zinc concentrations were high in larvae exposed to sediments contaminated by mining waste (fig. 4). The larvae of the two sea urchins species displayed a similar percentage of zinc in the different sampling sites. The concentration of zinc in larval tissues was significantly higher in stations PG and PN with their severely contaminated sediments than in the metal free stations, IF and PE ( $p < 0.0001$ , one-way ANOVA). The highest concentration was found close to old an emissary of Peñarroya mine (PG), while the percentage of metal retained was lower in PN and PE following the pollution gradient. There were no significant differences between larvae exposed to PE and the control samples ( $p < 0.05$ , post hoc Tukey HSD test).



**Figure 4.** Comparison of mean percentage of larval bioaccumulation tests in normally developed larvae ( $\pm$  standard error) of *A. lixula* and *P. lividus* at the different sampling points.

**Table 4.** Analyses of variances and post hoc test for toxicity tests and relative benthic index.

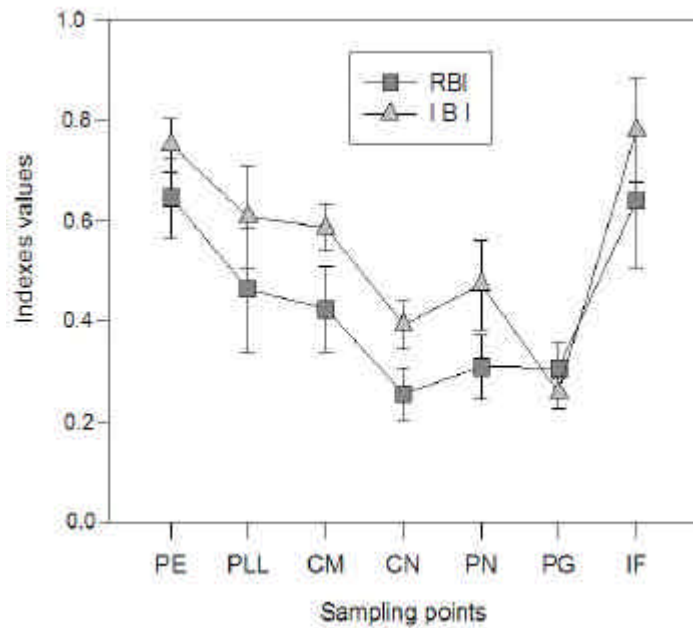
	Univariate measures	F	<i>p</i> -level	Post hoc test Tukey HSD
Benthic	RBI	12.5583	***	<u>IF PE PLL</u> <u>CM CN PN PG</u>
Index	IBI	23.5174	***	<u>IF PE PLL</u> <u>CM CN PN PG</u>
	<i>A. lixula</i> (PW)	676.451	***	<u>IF PE PLL</u> <u>CM CN PN PG</u>
Toxicity	<i>A. lixula</i> (SWI)	410.292	***	<u>IF PE PLL</u> <u>CM CN PN PG</u>
Tests	<i>P. lividus</i> (PW)	325.814	***	<u>IF PE PLL</u> <u>CM CN PN PG</u>
	<i>P. lividus</i> (SWI)	320.624	***	<u>IF PE PLL</u> <u>CM CN PN PG</u>

\*\*\*  $p < 0.001$ .

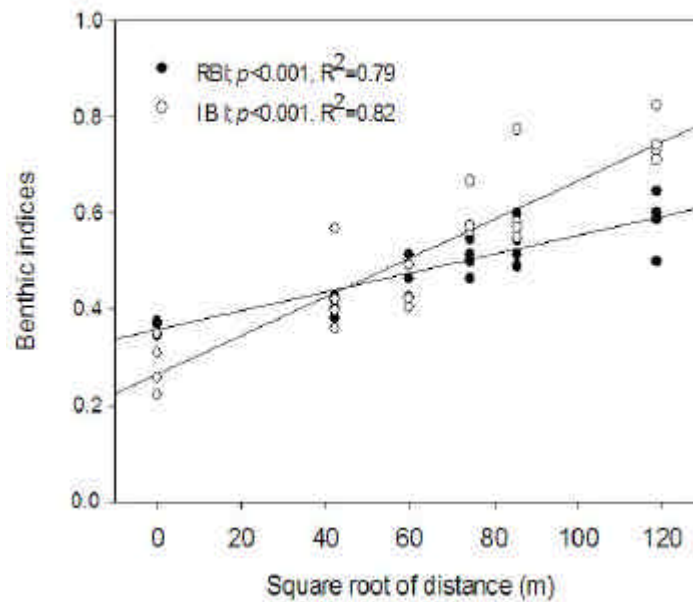
#### 5.4. Benthic community analysis

Univariate measurements of the community structure for all the sampling stations are shown in table 3, where they point to a significant variation along the metal contamination gradient. Stations PG, PN and CN (with a degraded benthos) had fewer species, lower abundance, lower diversity, and lower benthic index scores than stations with a healthy benthos (PE, IF). A similar pattern of disturbance was indicated by the RBI and IBI values. In both indices, all the samples from PG, PN and CN showed signs of disturbed assemblages and the lowest values. However, a more detailed assessment of the gradual changes in the benthic community structure along the Portmán gradient was obtained with the IBI values than with the original RBI (Table 3 and Fig. 5).

Results of the analysis of variance and post hoc tests pointed to significant differences in normally developed larvae between the IBI and RBI tests (Table 4). There was a linear dependence between IBI and RBI and the square root of distance; the slopes of the regression lines for the two indices were significantly different (Fig. 6).



**Figure 5.** Relative benthic index (RBI) and integrated benthic index (IBI) values (mean and standard deviation).



**Figure 6.** Relationship between RIB and IBI indices and square root of distance.

**Table 5.** Spearman rank correlation coefficients for selected chemicals significantly correlated with sea urchin (*Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*) abnormal development (PW n=28 / SWI n=28)<sup>b</sup>, RBI (n=28), and IBI (n=28). Chemicals identified by principal components analysis (PCA) as covarying with inhibited sea urchin development or degraded benthos are denoted by “S” (= significant-component loading = 0.40)<sup>a</sup>

Chemical	<i>Arbacia lixula</i>				<i>Paracentrotus lividus</i>				Relative benthic index (RBI)		Integrative benthic index (IBI)	
	PW		SWI		PW		SWI		Spear. rho	PCA	Spear. rho	PCA
	Spear. rho	PCA	Spear. rho	PCA	Spear. rho	PCA	Spear. rho	PCA				
Al	0.478**	S	0.686***	S	0.552**	S	0.670***	S	-0.688***	S	-0.576**	S
Ar	0.322		0.451*	S	0.389*	S	0.398*	S	-0.420*	S	-0.306	
Cu	0.327		0.411*	S	0.330		0.436*	S	-0.436*	S	-0.342	
Fe	0.774***	S	0.812***	S	0.781***	S	0.752***	S	-0.720***	S	-0.753***	S
Pb	0.782***	S	0.905***	S	0.844***	S	0.911***	S	-0.793***	S	-0.832***	S
Hg	0.324		0.416*	S	0.327		0.508**	S	-0.494**	S	-0.493**	S
Ni	0.561**	S	0.510**	S	0.587***	S	0.387*	S	-0.277		-0.346	
Zn	0.817***	S	0.920***	S	0.880***	S	0.910***	S	-0.795***	S	-0.848***	S
NH <sub>3</sub>	0.318		0.208		0.307		0.176		-0.180		-0.118	
Fines	0.287		0.444*	S	0.276		0.480**	S	-0.550**	S	-0.303	
OM	0.458*	S	0.725***	S	0.587***	S	0.751***	S	-0.706***	S	-0.620***	S
TOC	0.254		0.287		0.272		0.320		-0.159		-0.248	
AVS	0.114		0.175		0.082		0.200		-0.237		-0.151	
SEM <sup>c</sup>	0.797***	S	0.904***	S	0.854***	S	0.910***	S	-0.758***	S	-0.773***	S
SEM/AVS	0.650***	S	0.700***	S	0.718***	S	0.689***	S	-0.591***	S	-0.688***	S

<sup>a</sup> Indicates significance at  $p = 0.05^*$ ; indicates significance at  $p = 0.01^{**}$ ; indicates significance at  $p = 0.001^{***}$ .

<sup>b</sup> PW= Pore water ; SWI= Sediment-water interface.

<sup>c</sup> SEM (Cd/Cu/Ni/Pb/Zn).



### 5.5. Interrelationships between components

Metal concentrations in sediments were associated by PCA with indicators of biological effects: toxicity to sea urchin larvae in PW and SWI, RBI and IBI, although there were some limitations to the analysis (Fig.7). The chemical or biological variables which had mutual correlations averaging more than 0.95 were reduced to a single representative.

The variables, Zn, Al, Pb, and Fe, were reduced to Zn because of their high degree of correlation. *A. lixula* SWI was retained and the other three variables were excluded (*A. lixula* and *P. lividus* PW and *P. lividus* SWI), leaving 12 abiotic variables and 3 biotic variables in the PCA search. PCA ordination of the stations (Fig.7) based on these 15 new variables showed an environmental gradient of biological and chemical variables.

The application of factor analysis to the 15 variables (chemical concentration in sediments and biological effects) identified three new variables or principal factors. These new factors explained 72.8% of the variance in the original data set. The analysis also indicated that Zn, Al, Pb, Fe and organic matter were associated with biological effects along the contamination gradients (Table 5).

The first principal factor, PC1, was predominant and accounted for 42.6% of the variance. This factor combines the chemical concentrations of Zn, Pb, Al, Fe and organic matter and the biological variables (larval toxicity tests, RBI and IBI). The second factor, PC2, accounts for 17.4% of the variance and combines  $\text{NH}_3$  and Ni. This may be taken to represent the toxicity of ammonia in porewater. The third factor accounts for 12.8% of the variance and is a combination of AVS and AVS/SEM. and represents the heavy metals that are associated with the structure of the community.

Factors PC4 and PC5, with the lowest eigenvalues, accounted for the lowest variances (8.2 and 5.6%). The two-dimensional PCA plot are represented in figure 7, with the stations ordered along the first axis according to biological effects and heavy metal concentrations. All samples from PG and PN had PC1 scores greater than 2, suggesting that they are severely polluted. However, samples from the control and reference stations (IF and PE) or and these taken from the points furthest from Portmán Bay (PLL, CM and CN) had PC1 scores of between  $-3$  and  $0$  pointing to undisturbed or moderate levels of disturbance (according to this methodology).

Spearman rank correlations between SWI and PW toxicity tests and bulk chemical concentrations were examined in the two sea urchin species. In the PW toxicity tests with *A. lixula* and *P. lividus*, the analysis showed highly significant positive correlations between abnormally developed larvae and zinc, lead, iron and SEM/AVS concentrations (Table 5). There was a linear dependence between both tests and the square root transformation of the distance between stations. The slopes of the regression lines for the two indices were significantly different (Figs. 8 and 9).

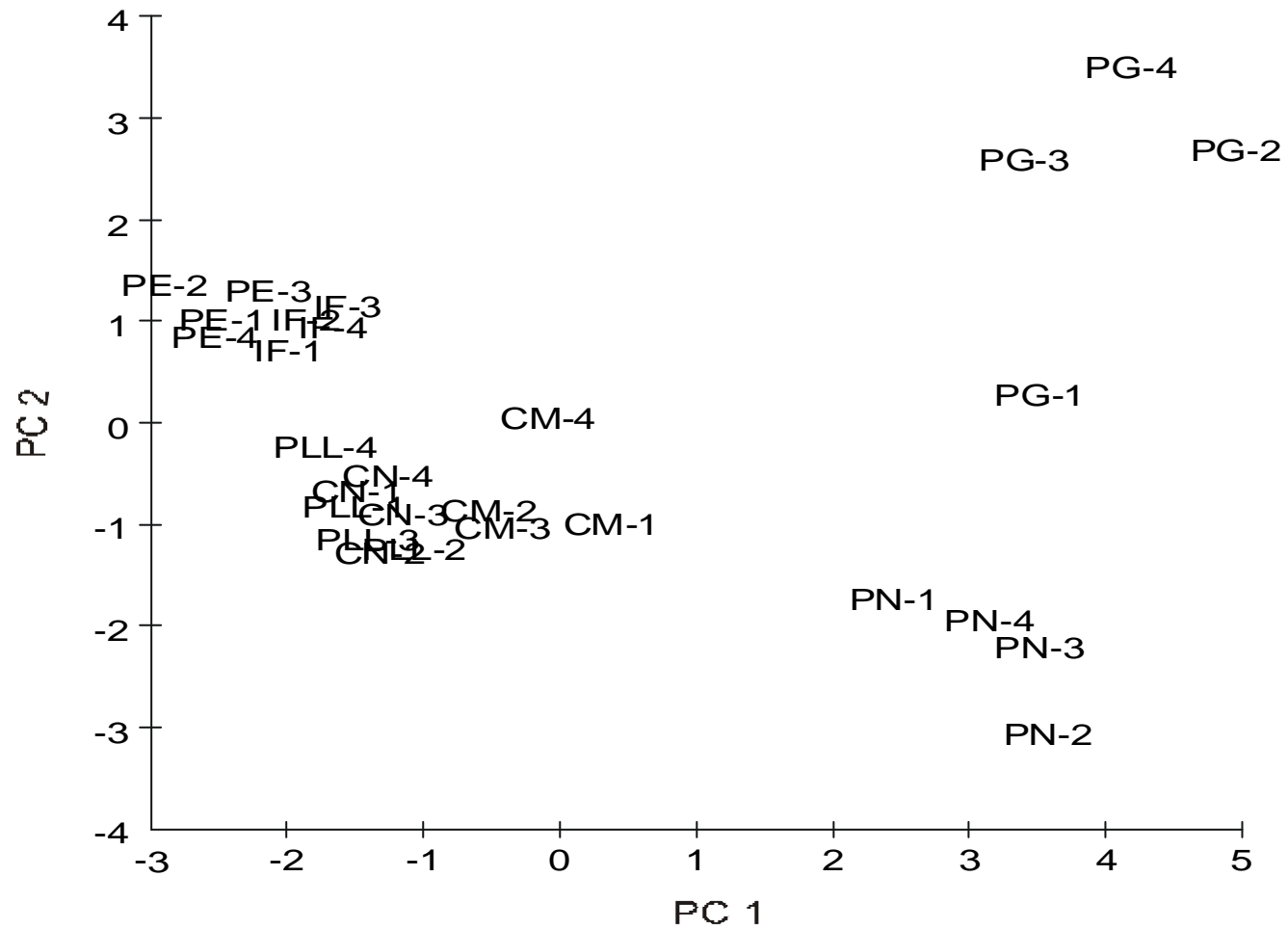
Spearman rank correlations indicated significant negative correlations between the benthic community structure, (as represented by the RBI and IBI indices) and several metals (Zn, Al, Pb, Hg, Cu, Fe). In addition, there were significant negative correlations between RBI and IBI values, and organic matter and AVS/SEM (Table 5).

MDS ordinations (Fig.10) at species level showed a gradation in the benthic community structure. PE and IF stations (at the top of the plot), were clearly separated from impacted stations PG, PN and CN (at the bottom of the plot), and the transitional station PLL end CM (near the top of the plot). The stations closest to the disposal points PG, PN and CN were located in the lowest edge, suggesting greater disturbance, especially at station PG close to the old effluent discharge.

The same chemical variables from the PCA analysis were used in the BIOENV analysis. Although metal concentration (Zn, Pb, Al and Fe) was an important factor influencing benthic community structure, the BIOENV indicated that particle size and NH<sub>3</sub> are also significant. MDS analyses also suggest that threshold levels in benthic responses to heavy metal pollution are located between PLL a PE stations.

SIMPER analyses were made of fourth root transformation of the species which contribute to the dissimilarity between sampling stations. The benthic community of Portmán Bay (PG and PN) was separated from the other stations by the general reduction in invertebrate species and the presence of relatively high numbers of a few species including the crustacean *Apseudes latreillii*, polychaetes belonging to the family Sabellidae and the bivalves *Chamelea gallina* and *Macoma cumana*. CM and PLL stations were separated from the metal-contaminated stations by the presence of relatively high abundance of a polychaetes (Cirratullidae, Sabellidae, Spionidae, Syllidae, Orbinidae and Capitellidae). Dissimilarities between PE and IF resulted from changes in the relative abundance of crustaceans such as *Bathyporeia guilliamsoniana*, *Corophium acutum*, *Phascolion strombus*, *Phoxocephalus aquosus* and *Anapagurus leavis*.

Figure 7. PCA ordination of environmental gradient of biological and chemical variables from sampling stations.



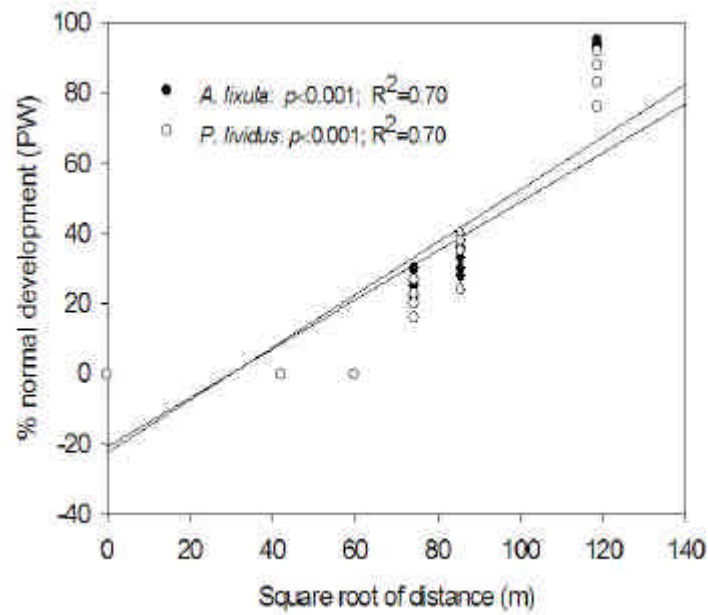


Figure 8. Relationship between sea urchin PW tests and square root of distance.

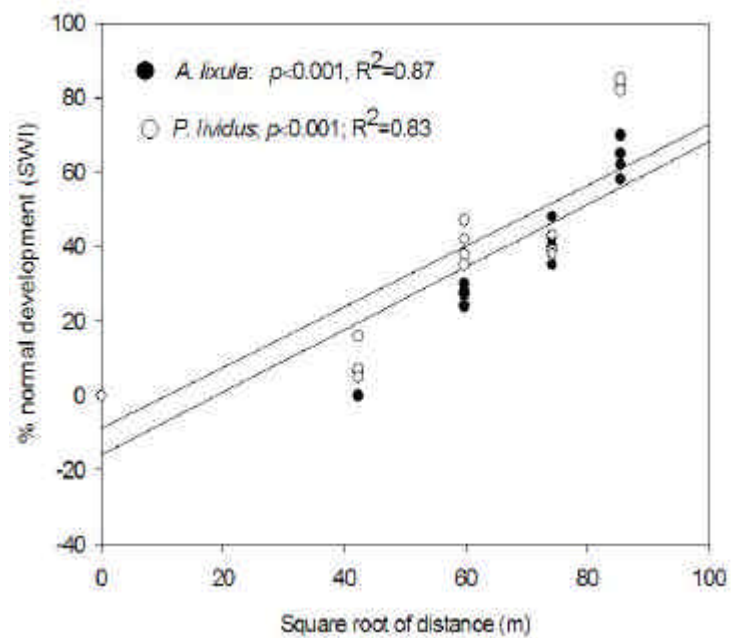
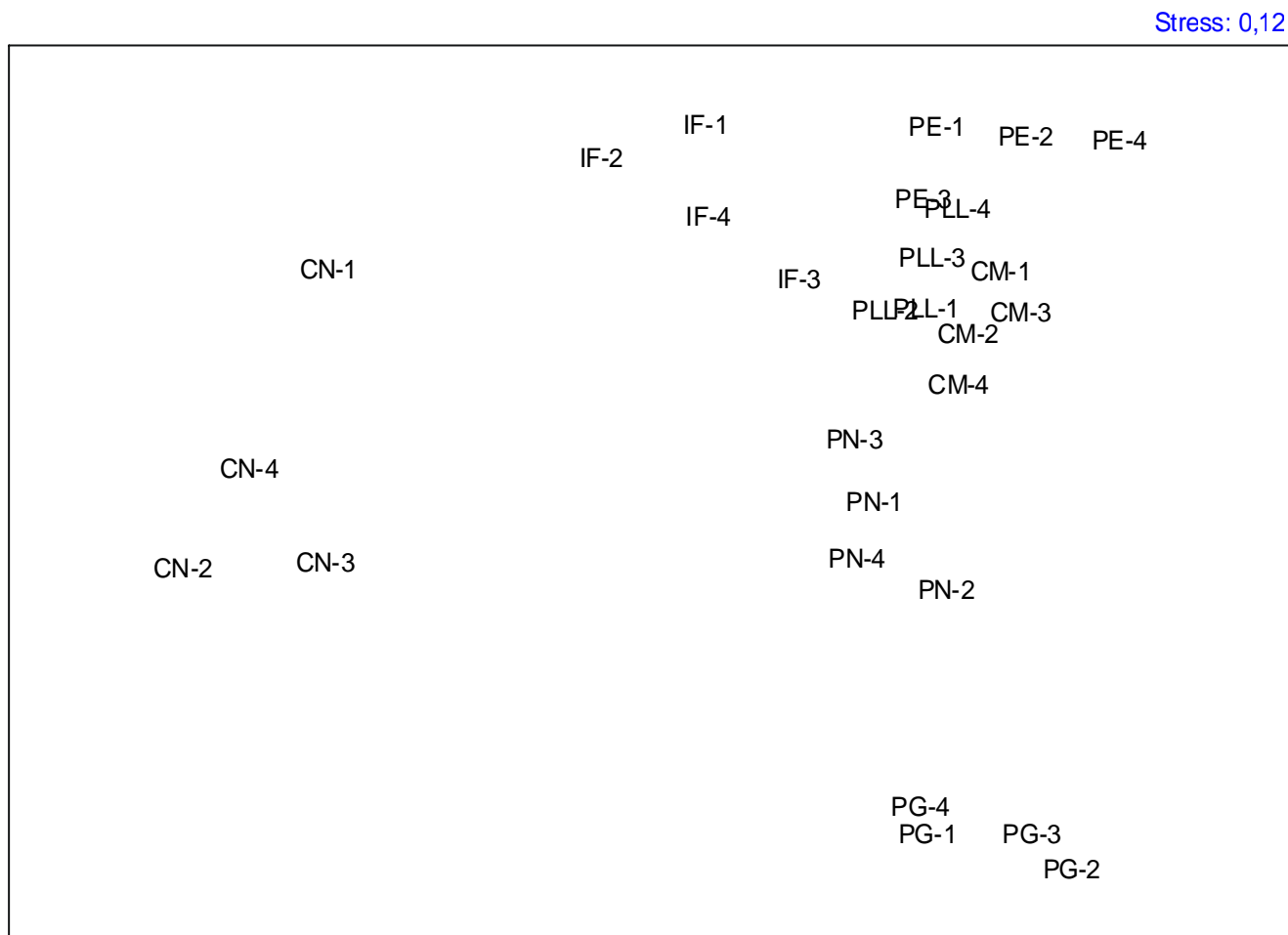


Figure 9. Relationship between sea urchin SWI tests and square root of distance.

**Figure 10.** Multidimensional scaling ordinations for fourth root transformed total fauna abundance (stress = 0.12) in sampling stations.



## 6. DISCUSION

Most investigations of mining-related sediment toxicity have concentrated on Cu, Zn, Pb and Cd (Schmidt, 2002) and the redistribution processes of these metals among the different sediment phases that effect their bioavailability and, therefore, the environmental quality of the system (Chapman, 1992). This is of special importance for littoral ecosystems because of their fragile nature and the high amounts of metals they generally receive.

In own study uni- and multivariate analyses indicated a strong relationship between toxicity, community structure and sediment metal concentrations because there were no other confounding factors such as organic matter, depth and freshwater runoff. Multivariate analyses suggest that the threshold levels for the benthic community were those prevailing between CM and PLL stations, where the sediment metal concentration ranged from 0.21-1.35  $\mu\text{mol/g}$  dry weight for Zn and 0.07-0.32  $\mu\text{mol/g}$  dry weight for Pb.

Sediment quality values need to be a developed to help protect public health and the environment (DeValls and Chapman, 1998). A multivariate statistical analysis, based on PCA as the extraction method during the evaluation of data using factor analysis, has been proposed to establish the concentration ranges of the chemicals associated with adverse effects (DeValls and Chapman, 1998).

Sediment toxicity tests are technically well developed (ASTM, 1996; USEPA, 1994) and are widely accepted as useful tools for a wide variety of research and regulatory purposes (Swarts, 1989; Burton, 1991; Luoma, 1993). For example, they are used to determine the sediment toxicity of single chemicals and mixtures, chemical bioavailability, the potential adverse effects of dredged material on benthic marine organisms, and the magnitude and spatial and temporal distribution of pollution impacts in the field (Ferraro and Cole, 2002).

Ecotoxicological monitoring requires simple, rapid and sensitive methods that can be used to measure the potential risk of sediment metal concentrations and their toxicity and bioaccumulation in marine invertebrates. There are several standard bioassays today for assessing marine sediment toxicity using sea urchin gametes, embryos and larvae. However, there is no parallel bioassay to test the bioaccumulation of metal in sea urchins during these growth stages.

The present study contributes toward the standardization of biological assessments of sediments using embryolarval sediment-water interface tests in combination with a larval accumulation test through x-ray microanalysis. These bioassays were conducted with the Mediterranean Sea urchin species *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*, which showed similar degrees of sensitivity to sediment metal concentrations. The test methodology is relatively simple and can be conducted using a minimum of space and time. However, it must be born in mind that metal accumulation in sea urchin larvae is a semi-quantitative value.

To determine the extent and the environmental significance of sediment contamination in Portmán bay, sediment toxicity, benthic community structure and sediment chemistry need to be assessed in an integrated, weight-of-evidence approach. For this reason we analyzed the interactions of sediment toxicity, sediment chemical concentration and infaunal community structure.

The mine tailings dumped in Portmán Bay contained calcite, dolomite, pyrite, sulfides of Cu, Pb, and Zn, and some aluminum and silica minerals. The acidic wastes are evolved from reduced sulfur materials (e.g., pyrite or FeS<sub>2</sub> in eastern Spain) that have been oxidized on exposure to water and oxygen, a process often brought about by mining activities. Pyrite oxidation reactions produce sulfuric acid and ferric hydroxides and mobilize other trace metals, depending on the surrounding mineralogy. These toxic acids and metals flow in surface waters, where the acid is eventually neutralized, causing the precipitation of metals and metal oxides on coastal streambeds, impairing habitats and adversely effecting water quality.



Heavy metals are important components of many marine discharges, including sewage, industrial wastes and mining wastes (Bryan, 1976). There is considerable uncertainty with regard to the concentration of heavy metals that may pose significant ecological risks because metal bioavailability is determined by the concentration of acid-volatile substances formed in anoxic conditions (Ankley, *et al.*, 1996). In marine sediments, sulfides are responsible for metal concentrations in pore and overlying water (USEPA, 1995) and affect the distribution of benthic invertebrates. Thompson, *et al.* 1991, found that when the sea urchin *Lytechinus pictus* was exposed to marine sediments dosed with varying concentrations of sodium sulfide, toxic effects occurred at levels below 1 mg/l.

Predicting the bioavailability and toxicity of metals in aquatic sediments is a critical component in the development of sediment quality criteria. The use of total sediment metal concentration ( $\mu\text{mol/g}$  dry weight) as a measure of bioavailability concentrations is not supported by available data (Di Toro, 1992). These differences have been reconciled by relating organism response to the chemical concentration of porewater (Swarts, *et al.*, 1985; Di Toro, 1992). In this study, toxicity of the sediment porewater (PW) and sediment-water interface (SWI) was determined using the embryo larval development tests with two sea urchin species *Arbacia lixula* and *Paracentrotus lividus*. The porewater tests were more sensitive to metal contamination than the toxicity of sediment-water interface tests, probably due to the presence of higher levels of ammonia, organic matter and AVS. Beiras (2002), suggest that prior to porewater testing is necessary the aeration of water in order to avoid the toxicity caused by these natural conditions characteristic of highly reduced sediments. However, SWI results had a better concordance with the macroinvertebrate community changes observed along the contamination gradient.

The determination of acid-volatile sulfides (AVS) is widely used as a measure of reduced sulfur species in sediments. Di Toro *et al.* (1990) proposed that if the simultaneously extracted metals SEM/AVS ratio is less than 1, there will be no toxic effect from Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, or Zn.

Short-term sediment bioassays showed that the molar ratio of AVS/SEM provided a first-order control on activities of at least some metals in porewater (Di Toro, *et al.*, 1990; Ankley, *et al.*, 1991). Activities were reduced to very low levels at ratios  $<1$ , because of the high stability of the metal sulfide. Toxicity and bioaccumulation were correlated with porewater metal activities in the toxicity tests (Luoma and Fisher, 1997).

Different dredging projects have been proposed to restore the Portmán Bay, but since no project has contemplated the potential adverse effects on organisms, the debate over the convenience of dredging the Bay continues. In the present study we demonstrate that mine wastes are spread at least 7300 m along the Mediterranean coast of Murcia, Spain.

The PCA analysis indicates that the Zn, Al, Pb and Fe, and the organic matter are associated with biological effects along the contamination gradient. Spearman rank correlations indicate significant negative correlations between benthic community structure and the metals, Zn, Al, Pb, Fe, Hg and Cu. The effects of metal sediment contamination on the benthic community structure are visible in the sampling stations (PG, PN and CN).

The marine sediments of Portmán Bay continue to show high toxicity due to the high heavy metal concentrations they contain and any sediment resuspension in this toxic hot spot of the Mediterranean Sea must be treated with caution.

The sediment quality triad (SQT) tools were used in this study, and the combination of analytical chemistry, toxicity tests and benthic community structure, proved useful in providing a full picture of the extent of heavy metal contamination along the coast of Murcia.

## 7. REFERENCES

- Allen, H.E., Gongmin, F. and Deng, B. 1993. Analysis of acid-volatile-sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1441-1453.
- American Society for Testing and Materials. 1997. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. E1367-92. In Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05. Philadelphia, PA, pp. 731-756.
- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Fairey, R., Roberts, C.A., Oakden, J.M., Puckett, H.M., Stephenson, M., Tjeerdema, R.S., Long, E.R., Wilson, C.J. and Lyons, J.M. 1998. Chemistry, toxicity and benthic community conditions in selected sediments of the Los Angeles Region. Final Report. State Water Resources Control Board, Sacramento, CA, USA.
- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Fairey, R., Roberts, C.A., Oakden, J.M., Puckett, H.M., Stephenson, M., Tjeerdema, R.S., Long, E.R., Wilson, C.J. and Lyons, J.M. 2001. Sediment quality in Los Angeles Harbor, USA: A Triad assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 359-370.
- Ankley, G.T. 1996. Evaluation of metal/acid-volatile sulfide relationships in the prediction of metal bioaccumulation by benthic macroinvertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 2138-2146.
- Ankley, G.T., Phipps, G.L., Leonard, E.N., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Kosian, P.A., Cotter, A.M., Dierkes, J.R., Hansen, D.J. and Mahoney, J.D. 1991. Acid-volatile sulfide as a factor mediating cadmium and nickel bioavailability in contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1299-1307.

- Beiras, R. 2002. Comparison of methods to obtain a liquid phase in marine sediment toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 23-28.
- Bryan, G.M. 1976. Heavy metal contamination in the sea. In: Jonston, J. (ed.), Marine pollution. Academic Press, London, p.185-302.
- Buchanan, J.B. 1984. Sediment analysis. In: Holme, N. A. and McIntyre, A. D. (eds.), Methods for the study of marine benthos, Blackwell Scientific Publications. pp. 41-65.
- Burton Jr., G.A. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1585-1627.
- Cesar, A., L. Marín, R. Vita, M. Gomez, B. Jimenez and A. Marín. 2000. Test de toxicidad con sedimento marino en la costa Mediterránea empleando anfípodos: *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*. In: Espíndola, G., Paschoal, R., Rocha, O., Bohrer, C. and Neto, L. (eds.), Ecotoxicología: Perspectivas para o século XXI, São Carlos, RiMa. pp.17-27.
- Cesar, A., Marín, A., Marín-Guirao, L. and Vita, R. 2003. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: the case of Portmán bay, *Scien. Mar.* in press.
- Cesar, A., Marín-Guirao, L., Marín, A., and Vita, R. 2002. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. *Cien. Mar.* 12: 1444-1444. 28: 407-417.
- CETESB. 1999. Método de ensaio: Água do mar - Teste de toxicidade crônica de curta duração com *Lytechinus variegatus*, Lamark, 1816 (Echinodermata: Echinoidea). L5.250. Cia. de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil., 22 p.
- Clark, K.R. and Gorley, R.N. 2001. PRIMER v5: User Manual/Tutorial. Plymouth, United Kingdom.

- Clark, K.R. and Green, R.H. 1988. Statistical design and analysis for a biological effects study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46:213-226.
- Clark, K.R. and Warwick, R.M. 2001. Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition. Plymouth Marine Laboratory, UK.
- Clark, K.R. and Ainsworth, M. 1993. A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 92:205-219.
- Chapman, P.M. 1992. Pollution status of North Sea sediments: An integrative study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91:13-32.
- De Leon, A.R., Más, J., Guerrero, J. and Jornet, A. 1984. Monitoring of heavy metals in superficial sediment and some marine organisms from the western Mediterranean coast. Viles Journées Étud. Pollutions, Lucerne, C.I.E.S.M. pp. 321-326.
- DelValls, T.A. and Chapman, P.M. 1998. The use of multivariate analysis to link the sediment quality triad components to site-specific sediment quality values in the Gulf of Cádiz (Spain) and in San Francisco Bay (USA). *Cien. Mar.*, 24: 313-336.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Carlson, A.R. and Ankley, G.T. 1992. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 96-101.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Hicks, M.B., Mayr, S.M. and Redmond, M.S. 1990. Toxicity of cadmium in sediments: the role of acid volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1487-1502.
- Environment Canada. - 1992. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars), amended November 1997. EPS 1/RM/27. North Vancouver, BC., 97 p.

- Ferraro, S.P. and Cole, F. A. 2002. A field validation of two sediment-amphipod toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 1423-1437.
- Gomez, I.G. & Paez, P.B. 1987. Problemática de Portmán., Asociación Naturalista del Sureste. ANSE. p. 81.
- Gulley, D.D.; Boelter, A.M.; Harold, L.B. 1991. TOXSTAT® Computer program, version 3.3. University of Wyoming, Laramie, WY.
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Tjeerdema, R.S., Taberski, K.M., Wilson, C.J., Puckett, H.M., Stephenson, M., Fairey, R. and Oakden, J. 2001. A large-scale categorization of sites in San Francisco Bay, USA, based on the sediment quality triad, toxicity identification evaluations, and gradient studies. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1252-1265.
- Luoma, S.N. and Fisher, N. 1997. Uncertainties in assessing contaminant exposure from sediments. In: Ingersoll C.G., Dillon, T. and Biddinger, G.R., (eds.), *Ecological risk assessment of contaminated sediments*, 1st ed, SETAC Press, Pensacola, Florida, USA, pp. 211-237.
- Luoma, S.N., Ho, K.T. 1993. Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In: Calow, P. (ed.), *Handbook of Ecotoxicology*. Blackweel Scientific, Oxford, Uk. pp. 193-226.
- Pérez, J.G. & Puente, C.R. – 1989. Estudio de la contaminación marina entre Cabo de Palos y Cabo Tiñoso (SE-España). Concentraciones de cadmio, plomo y cinc en sedimentos superficiales. Informes Técnicos Instituto Español de Oceanografía. MAPA. 13 p.
- Rey, J. and Del Rio, V.D. 1983. La plataforma continental Mediterránea, entre cabo de Palos y cabo Tiñoso: morfología y estudios sísmicos de la cobertura sedimentaria, Instituto Español de Oceanografía. p. 21.
- Schmidt, T.S., Soucek, D.J. and Cherry, D.S. 2002. Integrative assessment of benthic macroinvertebrate community impairment from metal-contaminated waters in

- tributaries of the upper Powell River, Virginia, USA. *Envir. Toxicol. Chem.*, 21(10): 2233-2241.
- Somerfield, P.J., Gee, J.M. and Warwicck, R.M. 1994. Soft sediment meiofaunal community structure in relation to a long-term heavy metal gradient in the fall estuary system. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 105: 79-88.
- Swartz, R. C. 1989. Marine sediment toxicity tests. In: Contaminated Marine Sediments - Assessment and Remediation. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 115-129.
- Swartz, R.C., DeBen, W.A., Jones, J.K.P., Lamberson, J.O. and Cole, F.A. 1985. Phoxocephalid amphipod bioassay for marine sediment toxicity. In: Cardwell, D., Purdy, R. and Bahner, R.C. (eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium, ASTM-STP 854. Philadelphia.
- Tabachnic, B.G., and Fidell, L.S. 1996. Using Multivariate Statistics. Harper Collins, College Publishers, New York, NY, USA.
- Thompson, B.S., Greenstein, D. and Laughlin, J. 1991. Sublethal effects of hydrogen sulfide in sediments on the urchin *Lytechinus pictus*. *Mar. Environ. Resear.*, 31: 309-321.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/-94/025, Narragansett, Rhode Island 02882.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/ 600/ R-95-136. Cincinnati, Ohio.
- Verdardo, D.J., Forelich, P.N. and Mc Intyre, A. 1990. Determination of organic carbon and nitrogen in marine sediments using the Carlo Erba NA-1500 analyzer. *Deep. Sea. Res.*, 37:157-165.

## **Capítulo 7. Conclusiones**



## Capítulo 2. Test de toxicidad con sedimento en la costa mediterránea empleando anfípodos: *Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*.

Los anfípodos *Microdeutopus gryllotalpa* y *Gammarus aequicauda* cumplen las exigencias científicas y técnicas necesarias para ser utilizados en la evaluación de la contaminación de los sedimentos marinos, ya que demostraron una buena sensibilidad a las sustancias tóxicas de referencia y a los sedimentos analizados.

La sensibilidad de estos organismos a las sustancias de referencia fue semejante a la de otras especies encontradas en la bibliografía, siendo incluso más sensibles que otros anfípodos. Ambas especies de anfípodos respondieron a la contaminación por metales pesados de los sedimentos de la Bahía de Portmán.

*Microdeutopus gryllotalpa*, ya empleado previamente en Cádiz, confirmó su gran potencial como especie-test. El anfípodo *Gammarus aequicauda*, utilizado por primera vez, también demostró una buena sensibilidad a los sedimentos y a las sustancias tóxicas de referencia utilizadas.

El anfípodo epibentónico *G. aequicauda* se encontró disponible en abundancia durante todo el año en las salinas de Santa Pola, siempre asociado a algas *Chaetomorpha linum* y *Ruppia cirrhosa*, mientras que el anfípodo excavador *M. gryllotalpa* se localizó en las Encañizadas de San Pedro de Pinatar asociado al sedimento y a los macrófitos (*Ruppia cirrhosa* y *Caulerpa prolifera*), encontrándose disponible a lo largo del año, excepto en los meses de verano, aunque su localización y captura presentaron mayores dificultades.

Aunque *M. gryllotalpa* (excavador) tenía mayor sensibilidad a las sustancias de referencia, *G. aequicauda* (epibentónico) fue la especie más sensible a los sedimentos contaminados de Portmán.

Ambas especies se mostraron tolerantes al estrés inherente a las actividades de captura, transporte, aclimatación y adaptación a las condiciones de laboratorio, superando todos estos factores abióticos satisfactoriamente.

Las dos especies de anfípodos presentaron altas tasas de supervivencia y reproducción durante el período de mantenimiento y cultivo en laboratorio bajo condiciones controladas de aireación, alimentación y temperatura.

*G. aequicauda* presentó resultados semejantes en las dos campañas, identificando una variabilidad biológica pequeña entre los dos períodos del año en los cuales fueron empleados (otoño e invierno), por lo que su utilización en los tests de toxicidad es apropiada.

Ambas especies de anfípodos mostraron tolerancia a los cambios de salinidad y temperatura, por lo tanto pueden considerarse como eurihalinas y euritermas, siendo apropiadas para su utilización en ambientes costeros del mar Mediterráneo, incluyendo estuarios y lagunas costeras.

*G. aequicauda* presentó una mayor tolerancia al cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  –  $49,68 \pm 11,24$  mg/l), sin embargo, esta característica puede ser favorable cuando la toxicidad del amonio pueda interferir enmascarando los resultados en el caso de sedimentos con alto contenido en materia orgánica.

**Capítulo 3. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins for reference toxicants.****Capítulo 3. Sensibilidad de anfípodos y erizos de mar Mediterráneos a sustancias tóxicas de referencia.**

Los dos grupos de invertebrados marinos empleados (erizos y anfípodos), mostraron una sensibilidad similar a las sustancias tóxicas de referencia, comparándose con otras especies encontradas en la bibliografía.

Las tres especies de erizos (*Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*) son tolerantes al estrés inherente provocado por las actividades de captura, transporte, aclimatación y adaptación a las condiciones de laboratorio, superando todas estas fases satisfactoriamente.

Los erizos de mar presentaron mayor sensibilidad que los anfípodos a todas las sustancias tóxicas de referencia testadas.

**Capítulo 4. Toxicity and larval accumulation of metals in sea urchins.****Capítulo 4. Toxicidad y acumulación larval de metales en erizos de mar.**

La técnica de microanálisis a través de microscopía electrónica de barrido demostró ser una importante herramienta en la evaluación de la bioacumulación de metales pesados en los tejidos de larvas de erizos tras la exposición de las mismas en tests de toxicidad convencionales.

Los análisis de bioacumulación realizados con las tres especies de erizos de mar empleadas en este estudio, *Arbacia lixula*, *Paracentrotus lividus* y *Sphaerechinus granularis*, exhibieron un incremento significativo de zinc en los tejidos blandos y calcáreos tras la exposición embrio-larval a distintas concentraciones de  $ZnSO_4$ .

Esta metodología demostró ser útil en la evaluación de la toxicidad, biodisponibilidad y bioacumulación de sustancias tóxicas metálicas (Zn) de una forma rápida, efectiva y sinóptica.

## **Capítulo 5. Amphipod and sea urchin tests to assess the toxicity of Mediterranean sediments: The case of Portmán Bay.**

### **Capítulo 5. Tests con anfípodos y erizos de mar para evaluar la toxicidad de los sedimentos mediterráneos: el caso de Portmán.**

Los tests de toxicidad realizados con larvas de erizos (*Arbacia lixula* y *Paracentrotus lividus*) y con anfípodos (*Gammarus aequicauda* y *Microdeutopus gryllotalpa*) en la bahía de Portmán, identificaron claramente un gradiente de toxicidad con la profundidad. La toxicidad más elevada se encontró en los sedimentos más próximos al antiguo emisario de Peñarroya. Los erizos fueron más sensibles que los anfípodos a la toxicidad de los sedimentos en las estaciones analizadas.

En todas las estaciones de Portmán, los tests de toxicidad realizados con agua intersticial y elutriados presentaron un mayor efecto tóxico que los presentados en las pruebas con la interfase sedimento-agua. Estos mayores efectos tóxicos son debidos a las altas concentraciones de amonio y metales pesados presentes en la fracción líquida del sedimento y que interfieren sinérgicamente en la inhibición del desarrollo de las larvas, principalmente en los puntos más profundos.

Se ha desarrollado una nueva metodología, más práctica y sencilla que permite la realización de tests de toxicidad embrio-larvales subcrónicos con erizos, empleando la interfase sedimento-agua. Las principales ventajas de esta metodología son la reducción de la manipulación de la muestra, la posibilidad de recuperación de las larvas de la superficie del sedimento al final del experimento y la reducción de espacio y volumen de muestra necesario, posibilitando la preparación y análisis de un mayor número de muestras o réplicas.

Además, las pruebas de toxicidad con erizos de mar utilizando la interfase sedimento-agua demostraron ser más efectivas en otros aspectos importantes como por ejemplo, en la precisión de los resultados, la rapidez y una menor relación coste-beneficio. Así como, en la reducción de los efectos causados por los interferentes que, generalmente están incorporados en los ensayos con agua intersticial y elutriados.

Esta técnica aporta una nueva posibilidad de aplicación de los tests de toxicidad con erizos, utilizando fases sólidas, lo que no era posible a través de los métodos estandarizados convencionales, que sólo contemplaban la posibilidad de utilización de fases líquidas.

**Capítulo 6. Integrative ecotoxicological assessment of the marine contamination on Portmán Bay.****Capítulo 6. Evaluación ecotoxicológica integrada de la contaminación marina de la Bahía de Portmán.**

Los análisis químicos, toxicológicos, de bioacumulación y de la estructura de la comunidad bentónica mostraron un evidente gradiente de contaminación por metales pesados (Fe, As, Zn, Al, Pb) en los sedimentos. Dicho gradiente de contaminación se extiende desde el antiguo punto de emisión en la Bahía de Portmán donde se vertían los residuos mineros hacia la actual Reserva Marina de Cabo de Palos–Islas Hormigas.

Los resultados de los tests de toxicidad con erizos, tanto con agua intersticial, como para la interface sedimento-agua presentaron efectos adversos significativos con relación al control hasta una distancia aproximada de 8 Km desde el foco emisor.

Las larvas de erizos expuestas en los tests de toxicidad, acumularon mayor cantidad de cinc en las estaciones próximas al antiguo emisario en la bahía de Portmán (PG y PN) en comparación con las estaciones más alejadas (PE y IF). Los microanálisis de las larvas demostraron que los metales pesados del sedimento se encuentran biodisponibles y pueden ser acumulados durante el período de desarrollo larvario.

Los análisis univariantes indican una clara alteración en la estructura de las comunidades bentónicas entre las estaciones, principalmente en las estaciones cercanas al punto de emisión (PG, PN y CN) que se muestran altamente degradadas.

Aunque la aplicación del índice RBI utilizado en el Pacífico caracterizó el gradiente estudiado, la utilización de nuevo índice (IBI) resultó ser más útil para caracterizar la estructura de las comunidades bentónicas.

La aplicación del PCA a las 15 variables seleccionadas (concentración química en sedimentos y efectos biológicos) se resumieron en tres nuevas variables o factores principales. Estos nuevos factores explicaban el 72,8% de la varianza de los datos originales. El análisis también indicaba que el Zn, Al, Pb, Fe y materia orgánica estaban asociados con los efectos biológicos a lo largo del gradiente de contaminación.

Las matrices de correlación de Spearman exhibieron una correlación positiva entre el desarrollo anormal de larvas y la concentración de zinc, plomo, hierro y SEM. Por otro lado, existía una correlación negativa entre la estructura de la comunidad (RBHBI) y varios metales (Zn, Al, Pb, Hg, Cu, Fe).

La ordenación de las muestras biológicas con técnicas MDS demostraron que existe un cambio gradual de las comunidades bentónicas desde el antiguo punto de emisión en Portmán y Cabo de Palos. La aplicación del BIOENV confirmó la importancia de la concentración de los mismos metales (Zn, Al, Pb, Hg, Cu, Fe). El análisis SIMPER indicó que la ordenación de las muestras próximas a Portmán se debía a la presencia de unas pocas especies con un alto número de individuos, especialmente el crustáceo *Apseudes latreillii*, los poliquetos pertenecientes a la familia Sabellidae y los bivalvos *Chamelea gallina* y *Macoma cumana*. Las estaciones Canto de la Manceba (CM) y Punta Loma Larga (PLL) estaban separadas de las estaciones más contaminadas por la presencia de un número de poliquetos relativamente alto (Cirratullidae, Sabellidae, Spionidae, Syllidae, Orbinidae y Capitellidae).

La aplicación del método integrado de calidad de sedimento (*Sediment Quality Triad*), confirmó su efectivo poder interpretativo en el análisis de las condiciones medioambientales de las estaciones estudiadas, a través de la utilización de técnicas estadísticas uni- y multivariantes.



## **Anexo I. Ficha de campo**

**Ficha de campo.** Ejemplo de ficha utilizada para registrar la localización y datos físicos-químicos en campo.

<b>FICHA DE CAMPO</b>										
HOJA Nº.: 01										
FECHA	LOCALIZACIÓN				PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS *					
	PUNTOS DE MOSTREO	LONGITUD	LATITUD	PROF. (M)	T°C	psu	OD (mg/l)	OD (% Sat.)	pH	Eh (mV)
11/03/2002	PUNTA NEGRA R-1	0°50'496	37°34'651	-16,3	14,7	36,6	2,24	24,1	7,55	-34
	PUNTA NEGRA R-2				14,6	36,7	1,44	16,1	7,54	-34
	PUNTA NEGRA R-3				14,5	36,7	1,82	18,1	7,59	-36
	PUNTA NEGRA R-4				14,6	36,8	1,58	17,6	7,55	-34
11/03/2002	PUNTA GALERA R-1	0°51'712	37°34'052	-12,8	14,2	36,7	2,65	23,5	7,55	-34
	PUNTA GALERA R-2				13,2	37	2,14	20,7	7,56	-34
	PUNTA GALERA R-3				13,5	37,1	2,18	24,4	7,58	-35
	PUNTA GALERA R-4				13,6	37,2	1,84	23,5	7,43	-29

OBS.: Las réplicas fueron tomadas en un radio de 50m a partir de la localización geográfica indicada en cada punto de muestreo.

\* Los análisis físico-químicos fueron realizados en la interfase agua-sedimento tras su recolección en la embarcación con la utilización del equipo portátil Multiline (mod. P4 WTW®)

## **Anexos II. Fichas de control**

## Modelos fichas de control

Ejemplos de fichas de control utilizadas en los tests de toxicidad, tanto para los experimentos de sensibilidad con las sustancias tóxicas de referencia, como para las muestras ambientales. Estos modelos de fichas fueron elaborados para facilitar y garantizar el adecuado registro de los datos. Para cada tipo de test realizado en este estudio (sensibilidad, agua intersticial y sedimento-agua interface), se aplicó un tipo de ficha control apropiada. A continuación se anexa un ejemplo de ficha de control correspondiente a cada tipo de experimento. Todas las fichas de control fueron elaboradas en formato Excel, lo que facilitó la realización de los cálculos automáticamente. Al final de cada test también se anexó el resultado estadístico correspondiente, de acuerdo con la metodología empleada, incluyendo las referencias. Como ejemplo fue seleccionado un test de sensibilidad y otro de sedimento-agua interface para ambos grupos de organismos empleados en este estudio (anfípodos y erizos).



**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control - Preparación de Concentraciones**  
**Sensibilidad - Anfípodos**

<b>Organismo test:</b> <i>Gammarus aequicauda</i>	<b>Test nº.:</b> 03
<b>Sustancia de referencia:</b> DSS	
<b>Fecha de inicio:</b> 06/10/99	<b>Hora:</b> 17:10
<b>Fecha de término:</b> 08/10/99	<b>Hora:</b> 17:10
<b>Periodo de exposición:</b> 48h	<b>Responsable:</b> Augusto

**Factor de dilución =** 1,3  
**Nº de Réplicas =** 3  
**Nº de orgs/réplica =** 10

**Concentraciones test**

Concentraciones	Nº Orgs./Répl.	Vol. Agua dilución (mg/l)
2,3 mg/l	10	200
3,0 mg/l	10	200
3,9 mg/l	10	200
5,1 mg/l	10	200
6,6 mg/l	10	200
8,5 mg/l	10	200

**Preparación de soluciones stock**

**Concentración stock <sup>a</sup> (mg/l) =** 10

**Concentración stock <sup>b</sup> (mg/l) =** 100

**Preparación de soluciones test**

**Volume test (mg/l) =** 200 mg/l

Concentraciones	Vol. Stock (ml)	Vol. Agua dilución (ml)
2,3 mg/l	4,6 <sup>a</sup>	195,4
3,0mg/l	6,0 <sup>a</sup>	194,0
3,9 mg/l	7,8 <sup>a</sup>	192,2
5,1 mg/l	10,2 <sup>a</sup>	189,8
6,6 mg/l	13,2 <sup>a</sup>	186,8
8,5 mg/l	17,0 <sup>a</sup>	183,0
11,1 mg/l	11,1 <sup>b</sup>	188,9



**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control - Datos Físico-Químicos**  
**Sensibilidad - Anfípodos**

**Organismo test:** *Gammarus aequicauda*

**Test nº:** 03

**Sustancia de referencia:** DSS

**Fecha de inicio:** 06/10/99

**Hora:** 17:10

**Fecha de término:** 08/10/99

**Hora:** 17:10

**Numero de organismos por réplica:** 10

**Responsable:** Augusto

**Datos Iniciales**

	Control	2,3 mg/l	3,0 mg/l	3,9 mg/l	5,1 mg/l	6,6 mg/l	8,5 mg/l	11,1 mg/l
<b>OD (mg/l)</b>	7,92	7,6	7,85	7,75	7,8	7,75	7,84	7,78
<b>pH</b>	7,86	7,9	7,94	7,94	7,95	7,94	7,95	7,96
<b>psu</b>	38	39	39	39	39	39	39	39
<b>T°C</b>	23	22,5	23	23,1	23,2	23,3	23,3	23,6
<b>NH<sub>3</sub> (mg/l)</b>	0,014	0,015	0,015	0,018	0,014	0,017	0,014	0,014

**Datos Finales**

	Control	2,3 mg/l	3,0 mg/l	3,9 mg/l	5,1 mg/l	6,6 mg/l	8,5 mg/l	11,1 mg/l
<b>OD (mg/l)</b>	5,99	5,54	5,95	5,69	5,65	5,47	5,53	5,26
<b>pH</b>	7,93	7,86	7,89	7,91	7,89	7,8	7,83	7,89
<b>psu</b>	40	40	40	40	40	40	40	40
<b>T°C</b>	20,1	20,2	20,4	20,4	20,4	20,4	20,4	20,4
<b>NH<sub>3</sub> (mg/l)</b>	0,016	0,026	0,018	0,021	0,024	0,042	0,043	0,040

Obs.



## Departamento de Ecología e Hidrología

## Ficha de Control - Test de Sensibilidad

## Sensibilidad Anfípodos

Organismo test: *Gammarus aequicauda*

Test nº.: 03

Sustancia de referencia: DSS

Fecha de inicio: 06/10/99

Hora: 17:10

Fecha de término: 08/10/99

Hora: 17:10

Nº de orgs por réplica: 10

Resp.: Augusto

Concentraciones	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Total de orgs. muertos	
	Lectura		Lectura		Lectura		Lectura		Sumatoria	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
control	0	0	0	0	1	2			1	2
2,3 mg/l	0	0	0	2	0	2			0	4
3,0 mg/l	0	2	0	2	2	2			2	6
3,9 mg/l	0	2	0	2	0	4			0	8
5,1 mg/l	2	4	2	6	0	6			4	16
6,6 mg/l	6	8	6	8	4	6			16	22
8,5 mg/l	8	10	8	10	10	10			26	30
11,1mg/l	10	10	10	10	10	10			30	30
									0	0
									0	0

**Observaciones:** Canibalismo sobre los muertos.

Escretan antes de morir.

## Análisis estadístico

Resultado análisis estadístico, método paramétrico de Trimmed Spearman-Kärber con la corrección de Abbott), descrito por Hamilton, *et al.* 1997, o lo cual se estima la CE50 y sus respectivos intervalos de confianza según metodología propuesta en USEPA, 1994.

Date: 06/10/99                      Test Type: Sensibilidad  
 Duration: 48 H  
 Chemical: Sodium Dodecyl Sulfate  
 Species: Gammarus aequicauda  
 Concentration Unit: mg/l.

Data Set is adjusted for control mortality using Abbott's correction.

### Raw Data:

Concentration:	2.30	3.00	3.90	5.10	6.60	8.50	11.10
Number Exposed:	30	30	30	30	30	30	30
Mortalities:	4	6	8	16	22	30	30
Abbott's Corr. Morts.:	4	6	8	16	22	30	30
Control Group Number: 1							
Number Exposed-Control:		30					
Number Mortalities-Control:		0					
Control Group Number: 2							
Number Exposed-Control:		30					
Number Mortalities-Control:		0					
Control Group Number: 3							
Number Exposed-Control:		30					
Number Mortalities-Control:		1					
SPEARMAN-KARBER TRIM:				13.33%			

<b>SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:</b>	<b>EC50:</b>	<b>4.84</b>
95% Lower Confidence:	4.11	
95% Upper Confidence:	5.70	





**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control - Anfípodos**  
**Test de Toxicidad Aguda con Sedimento Total**

<b>Sedimento Test:</b> Portmán Punto 1 <b>Localización:</b> 37°34'052 N 0°51'495 W <b>Fecha de recolección:</b> 25/03/00 <b>Tiempo de conservación:</b> 3 días <b>Características:</b> Arena - fango	<b>Test nº.:</b> 04 <b>Profundidad:</b> - 15,6 <b>Hora:</b> 11:30 <b>Refrigeración:</b> 4°C <b>Responsable:</b> Augusto
<b>Sedimento Test:</b> Portmán Punto 2 <b>Localización:</b> 37°33'878 N 0°51'495 W <b>Fecha de recolección:</b> 25/03/00 <b>Tiempo de conservación:</b> 3 días <b>Características:</b> Fango	<b>Test nº.:</b> 02 <b>Profundidad:</b> - 41,6 <b>Hora:</b> 12:20 <b>Refrigeración:</b> 4°C <b>Responsable:</b> Augusto
<b>Sedimento Test:</b> Portmán Punto 3 <b>Localización:</b> 37°32'511 N 0°51'526 W <b>Fecha de recolección:</b> 25/03/00 <b>Tiempo de conservación:</b> 3 días <b>Características:</b> Fango	<b>Test nº.:</b> 05 <b>Profundidad:</b> - 71,6 <b>Hora:</b> 12:50 <b>Refrigeración:</b> 4°C <b>Responsable:</b> Augusto
<b>Sedimento Test:</b> Portmán Punto 4 <b>Localización:</b> 37°31'660 N 0°52'831 W <b>Fecha de recolección:</b> 25/03/00 <b>Tiempo de conservación:</b> 3 días <b>Características:</b> Fango	<b>Test nº.:</b> 03 <b>Profundidad:</b> - 83,3 <b>Hora:</b> 13:30 <b>Refrigeración:</b> 4°C <b>Responsable:</b> Augusto
<b>Sedimento control:</b> San Pedro <b>Localización:</b> 37°47'000 N 0°45'000 W <b>Fecha de recolección:</b> 24/03/00 <b>Tiempo de conservación:</b> 4 días <b>Características:</b> Arena - fango	<b>Test nº.:</b> 06 <b>Profundidad:</b> - 0,8 <b>Hora:</b> 12:00 <b>Refrigeración:</b> 4°C <b>Responsable:</b> Augusto
<b>Sedimento referencia:</b> Islas Hormigas <b>Localización:</b> 37°37'293 N 0°40'016 W <b>Fecha de recolección:</b> 25/03/00 <b>Tiempo de conservación:</b> 3 días <b>Características:</b> Fango	<b>Test nº.:</b> 01 <b>Profundidad:</b> - 83,3 <b>Hora:</b> 14:10 <b>Refrigeración:</b> 4°C <b>Responsable:</b> Augusto

**Observaciones:**



**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control – Físico-químico - Anfípodos**

**Datos Iniciales**

Ident	T°C	psu	OD	pH	NH <sub>4</sub>
1.1	20,1	38,3	7,1	8,21	0,03
1.2	20,1	38,4	7,1	8,16	0,03
1.3	20,2	38,4	6,9	8,15	0,04
1.4	20,2	38,4	7,1	8,14	0,03
1.5	20,2	38,3	7,1	8,13	0,02
2.1	20,8	38,2	6,28	8,07	0,07
2.2	20,8	38,3	6,23	8,06	0,03
2.3	20,6	38,3	6,38	8,07	0,03
2.4	20,8	38,2	6,39	8,06	0,03
2.5	20,6	38,3	6,40	8,06	0,04
3.1	20,8	38,3	6,42	8,07	0,06
3.2	20,9	38,3	6,41	8,07	0,03
3.3	21,0	38,3	6,41	8,06	0,03
3.4	21,3	38,3	6,42	8,07	0,03
3.5	20,9	38,3	6,42	8,05	0,03
4.1	20,1	38,1	7,21	8,20	0,02
4.2	20,2	38,2	6,98	8,19	0,03
4.3	20,2	38,1	7,12	8,19	0,03
4.4	20,2	38,2	7,13	8,19	0,03
4.5	20,1	38,2	7,21	8,22	0,03
5.1	20,8	38,2	6,28	8,07	0,07
5.2	20,9	38,3	6,23	8,06	0,03
5.3	20,6	38,3	6,38	8,07	0,03
5.4	20,8	38,3	6,39	8,06	0,03
5.5	20,6	38,2	6,40	8,06	0,04
6.1	20,6	38,2	6,72	8,20	0,03
6.2	20,6	38,2	6,73	8,19	0,03
6.3	20,5	38,1	6,73	8,19	0,04
6.4	20,5	38,2	6,74	8,19	0,05
6.5	20,5	38,2	6,89	8,19	0,06



**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control – Físico-químico - Anfípodo**

**Datos Finales**

Ident	T°C	psu	OD	pH	NH <sub>4</sub>
1.1	20,6	39,6	7,12	8,35	0,54
1.2	20,5	39,6	7,14	8,35	0,60
1.3	20,6	39,4	6,98	8,35	0,60
1.4	20,6	39,4	7,13	8,39	0,62
1.5	20,6	39,4	7,12	8,21	0,66
2.1	20,5	39,2	6,11	8,07	0,27
2.2	20,5	39,2	6,13	8,06	0,30
2.3	20,5	39,3	6,13	8,07	0,27
2.4	20,6	39,2	6,18	8,06	0,28
2.5	20,6	39,3	6,16	8,06	0,29
3.1	20,5	39,2	6,11	8,07	0,24
3.2	20,5	39,2	6,13	8,07	0,25
3.3	20,5	39,3	6,13	8,06	0,22
3.4	20,3	39,2	6,18	8,07	0,21
3.5	20,5	39,3	6,16	8,07	0,22
4.1	20,6	38,8	5,6	8,12	0,63
4.2	20,6	39,6	5,7	8,11	0,71
4.3	20,7	39,6	5,6	8,13	0,60
4.4	20,8	39,3	5,7	8,11	0,81
4.5	20,8	39,3	5,7	8,13	0,62
5.1	20,5	39,2	6,08	8,23	0,16
5.2	20,6	39,3	5,93	8,20	0,15
5.3	20,6	39,4	5,88	8,23	0,12
5.4	20,6	39,4	5,92	8,09	0,14
5.5	20,5	39,4	5,96	8,11	0,16
6.1	20,6	39,6	5,83	8,19	0,06
6.2	20,5	39,6	5,83	8,21	0,05
6.3	20,6	39,4	5,84	8,22	0,05
6.4	20,6	39,4	5,86	8,22	0,06
6.5	20,6	39,4	5,85	8,23	0,06



## Departamento de Ecología e Hidrología

## Ficha de Control - Datos de Mortalidad - Anfípodos

<b>Organismo test:</b> <i>Microdeutopus gryllotalpa</i>						<b>Tests:</b> 01 - 06				
<b>Número de organismos por réplica:</b> 20						<b>Fecha de inicio:</b> 28/03/00 - 15 horas				
<b>Número de réplicas:</b> 5						<b>Fecha de termino:</b> 07/04/00 - 15 horas				
<b>Número de tratamientos:</b> 6						<b>Responsable:</b> Augusto				
Ident	2ºd	3ºd	4ºd	5ºd	6ºd	7ºd	8ºd	9ºd	Final	Suma
1.1		0				0			0	0
1.2		0				0			0	0
1.3		0				0			0	0
1.4		0				0			0	0
1.5		0				0			0	0
2.1		0				2			8	10
2.2		0				0			6	6
2.3		0				0			10	10
2.4		0				2			6	8
2.5		0				0			6	6
3.1		0				1			3	4
3.2		0				2			2	4
3.3		0				1			3	4
3.4		0				2			6	8
3.5		0				1			5	6
4.1		2				6			10	18
4.2		1				5			8	14
4.3		2				4			8	14
4.4		2				4			6	12
4.5		3				6			9	16
5.1		1				1			6	8
5.2		0				2			6	8
5.3		0				2			4	6
5.4		0				0			6	6
5.5		0				4			6	10
6.1		0				0			0	0
6.2		0				0			0	0
6.3		0				1			0	1
6.4		0				0			0	0
6.5		1				0			0	1

**Observaciones:** Organismos débiles se encuentran en la superficie.

## Análisis estadístico

Resultado análisis estadístico: Los datos de supervivencia fueron previamente analizados según la normalidad a través del test de Shapiro-Wilk, posteriormente se verificó la homogeneidad y varianza a través del test de Bartlett y finalmente se analizó las diferencias entre puntos a través del test de Dunnet de acuerdo con el procedimiento propuesto por USEPA (1994). Estos análisis fueron realizados con el auxilio del paquete estadístico TOXSTAT® V.3.3 (Gulley, *et al.*, 1991).

Microd-2ª Campaña.

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

Shapiro Wilks test for normality

-----  
D = 1160.000

W = 0.940

Critical W (P = 0.05) (n = 30) = 0.927

Critical W (P = 0.01) (n = 30) = 0.900  
-----

Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley test for homogeneity of variance

-----  
Calculated H statistic (max Var/min Var) = 5.00

Closest, conservative, Table H statistic = 69.0 (alpha = 0.01)

Used for Table H ==> R (# groups) = 6, df (# reps-1) = 4

Actual values ==> R (# groups) = 6, df (# avg reps-1) = 4.00  
-----

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.

NOTE: This test requires equal replicate sizes. If they are unequal but do not differ greatly, the Hartley test may still be used as an approximate test (average df are used).

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance

-----  
 Calculated B statistic = 5.04  
 Table Chi-square value = 15.09 (alpha = 0.01)  
 Table Chi-square value = 11.07 (alpha = 0.05)

Average df used in calculation ==> df (avg n - 1) = 4.00  
 Used for Chi-square table value ==> df (#groups-1) = 5  
 -----

Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.

NOTE: If groups have unequal replicate sizes the average replicate size is used to calculate the B statistic (see above).

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

-----  

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	IH	5	90.000	100.000	98.000
2	SP	5	90.000	100.000	98.000
3	PI	5	30.000	40.000	32.000
4	PII	5	50.000	70.000	60.000
5	PIII	5	50.000	70.000	60.000
6	PIV	5	60.000	80.000	74.000

 -----

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

-----  

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM
1	IH	20.000	4.472	2.000
2	SP	20.000	4.472	2.000
3	PI	20.000	4.472	2.000
4	PII	100.000	10.000	4.472
5	PIII	50.000	7.071	3.162
6	PIV	80.000	8.944	4.000

 -----

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

## ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	5	16136.667	3227.333	66.772
Within (Error)	24	1160.000	48.333	
Total	29	17296.667		

Critical F value = 2.62 (0.05,5,24)  
 Since  $F > \text{Critical } F$  REJECT  $H_0$ :All groups equal

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

## DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control&lt;Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	IH	98.000	98.000		
2	SP	98.000	98.000	0.000	
3	PI	32.000	32.000	15.010	*
4	PII	60.000	60.000	8.642	*
5	PIII	60.000	60.000	8.642	*
6	PIV	74.000	74.000	5.458	*

Dunnett table value = 2.36 (1 Tailed Value, P=0.05, df=24,5)

File: M2C Transform: NO TRANSFORMATION

## DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2 Ho:Control&lt;Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	IH	5			
2	SP	5	10.377	10.6	0.000
3	PI	5	10.377	10.6	66.000
4	PII	5	10.377	10.6	38.000
5	PIII	5	10.377	10.6	38.000
6	PIV	5	10.377	10.6	24.000



**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control - Preparación de Concentraciones**  
**Sensibilidad – Erizos - Embriolarval**

<b>Organismo test:</b> <i>Arbacia lixula</i>	<b>Test nº.:</b> 04
<b>Sustancia de referencia:</b> Cloruro de cadmio	
<b>Fecha de inicio:</b> 28/06/02	<b>Hora:</b> 18:00
<b>Fecha de término:</b> 30/06/02	<b>Hora:</b> 8:00
<b>Periodo de exposición:</b> 38h	<b>Responsable:</b> Augusto

**Factor de dilución =** 1,5  
**Nº de Réplicas =** 3  
**Nº de orgs/réplica =** 300

**Concentraciones test**

Concentraciones	Nº Orgs./Répl.	Vol. Agua dilución (mg/l)
0,5 mg/l	400	10
0,8 mg/l	400	10
1,2 mg/l	400	10
1,8 mg/l	400	10
2,7 mg/l	400	10
4,1 mg/l	400	10

**Preparación de soluciones stock**

**Concentración stock 1 (mg/l) = 10**

**Preparación de soluciones test**

**Volume test (mg/l) = 100 mg/l**

Concentraciones	Vol. Stock (ml)	Vol. Agua dilución (ml)
0,5 mg/l	5,0	95,0
0,8mg/l	8,0	92,0
1,2 mg/l	12,0	88,0
1,8 mg/l	18,0	82,0
2,7 mg/l	27,0	73,0
4,1 mg/l	41,0	59,0

**Observaciones:**





**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control - Datos Físico-Químicos**  
**Sensibilidad - Erizos - Embriolarval**

**Organismo test:** *Arbacia lixula*

**Test nº.:** 04

**Sustancia de referencia:** Cloruro de cadmio

**Fecha de inicio:** 28/06/02

**Hora:** 18:00

**Fecha de término:** 30/06/02

**Hora:** 8:00

**Periodo de exposición:** 38 h

**Responsable:** Augusto

**Datos Iniciales**

	Control	0,5	0,8	1,2	1,8	2,7	4,1	mg/l
<b>OD</b>	5,38	5,43	5,41	5,31	5,33	5,36	5,33	
<b>pH</b>	7,89	7,18	7,13	7,1	7,12	7,1	7,12	
<b>psu</b>	37,8	37,4	37,5	37,6	37,8	37,7	37,6	
<b>T°C</b>	20,7	20,4	20,5	20,6	20,5	20,7	20,7	

**Datos Finales**

	Control	0,5	0,8	1,2	1,8	2,7	4,1	mg/l
<b>OD</b>	5,38	5,43	5,41	5,31	5,33	5,36	5,36	
<b>pH</b>	7,89	7,18	7,13	7,1	7,12	7,1	7,1	
<b>psu</b>	37,8	37,4	37,5	37,6	37,8	37,7	37,7	
<b>T°C</b>	20,7	20,4	20,5	20,6	20,5	20,7	20,6	

**Observaciones:**



**Departamento de Ecología e Hidrología**  
**Ficha de Control - Test de Sensibilidad**  
**Sensibilidad - Erizos - Embriolarval**

**Organismo test:** *Arbacia lixula*

**Test nº.:** 04

**Sustancia de referencia:** Cloruro de cadmio

**Fecha de inicio:** 28/06/02

**Hora:** 18:00

**Fecha de término:** 30/06/02

**Hora:** 8:00

**Nº de Embriones por Réplica:** 400

**Nº de [ C ]:** 7

**Volumen Adicionado:** 0,025ml

**Media:** 421

**Periodo de exposición:** 38 h

**Resp.:** Augusto

	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Nº de Embriones	
	Lectura		Lectura		Lectura		Sumatoria	
Concs. (mg/l)	Norm.	Anor.	Norm.	Anor.	Norm.	Anor.	Norm.	Anor.
control	84	16	92	8	97	3	273	27
0,5	82	18	78	22	75	25	235	65
0,8	76	24	68	32	76	24	220	80
1,2	66	44	66	34	68	32	200	110
1,8	36	64	32	68	38	62	106	194
2,7	20	80	23	77	19	71	62	228
4,1	0	100	0	100	0	100	0	300
							0	0

**Observaciones:**

### Análisis estadístico

Resultado análisis estadístico: Método de Interpolación Linear - ICP, fue usado para estimar la concentración que causa un porcentaje de inhibición (Ej. 25%, 50%) en el desarrollo normal de los organismos test (Concentración de Inhibición - IC). Este procedimiento fue diseñado para uso general en el análisis de tests de toxicidad crónicos de corta duración, generando un punto estimado (*endpoint*) para un modelo continuo, eso permite una valoración cuantitativa tradicional de la precisión del *endpoint*, como límites de confianza para el *endpoint* de una sola prueba (USEPA, 1988).

\*\*\* Inhibition Concentration Percentage Estimate \*\*\*

Toxicant/Effluent: Cloruro de Cadmio  
 Test Start Date: 28/06/02 Test Ending Date: 30/06/02  
 Test Species: *Arbacia lixula*  
 Test Duration: 38h  
 DATA FILE: CdA4.icp  
 OUTPUT FILE: CdA4.i25

Conc. ID	--	1	2	3	4	5	6	7
Conc. Tested	0.0	0.5	0.8	1.2	1.8	2.7	4.1	
Response 1	84	82	76	66	36	20	0	
Response 2	92	78	68	66	32	23	0	
Response 3	97	75	76	68	38	19	0	

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg/l	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	3	0.000	91.000	6.557	91.000
2	3	0.500	78.333	3.512	78.333
3	3	0.800	73.333	4.619	73.333
4	3	1.200	66.667	1.155	66.667
5	3	1.800	35.333	3.055	35.333
6	3	2.700	20.667	2.082	20.667
7	3	4.100	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 1.1050 Entered P Value: 25

Number of Resamplings: 250  
 The Bootstrap Estimates Mean: 1.0710 Standard Deviation: 0.1371  
 No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.  
 Resampling time in Seconds: 0.05 Random\_Seed: -1049386664

OUTPUT FILE: CdA4.i50

Conc. ID	Number Replicates	Concentration mg/l	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	3	0.000	91.000	6.557	91.000
2	3	0.500	78.333	3.512	78.333
3	3	0.800	73.333	4.619	73.333
4	3	1.200	66.667	1.155	66.667
5	3	1.800	35.333	3.055	35.333
6	3	2.700	20.667	2.082	20.667
7	3	4.100	0.000	0.000	0.000

The Linear Interpolation Estimate: 1.6053 Entered P Value: 50

Number of Resamplings: 250  
 The Bootstrap Estimates Mean: 1.6047 Standard Deviation: 0.0347  
 No Confidence Limits can be produced since the number of resamples generated is not a multiple of 40.  
 Resampling time in Seconds: 0.05 Random\_Seed: 1886823710



## Departamento de Ecología e Hidrología

## Ficha de Control – Sedimento / Agua Interface - Erizo

## Test de Toxicidad Crónica de Corta Duración

Organismo test: *Arbacia lixula*

Fecha de inicio: 21/03/02

Hora: 19:00

Fecha de término: 23/03/02

Hora: 9:00

Numero de tratamientos: 7

Numero de replicas: 4

LOCALIZACIÓN			
PUNTOS DE MUESTREO	LONGITUD	LATITUD	PROF (m)
ISLA DEL FRAILE - IF	37°24'655 W	1°32'861 N	-15,6
PUNTA LOMA LARGA - PLL	37°35'161 W	0°47'165 N	-12,8
CABO NEGRETE - CN	37°34'327 W	0°49'326 N	-12,7
CANTO DE LA MANCEBA - CM	37°35'052 W	0°48'376 N	-15,6
PUNTA NEGRA - PN	37°34'052 W	0°50'496 N	-16,3
PUNTA GALERA - PG	37°34'052 W	0°51'712 N	-12,8
PUNTA ESPADA - PE	37°36'417 W	0°42'823 N	-13,8

IDENT.	FÍSICO-QUÍMICOS – SAI* - INICIAL							FÍSICO-QUÍMICOS – SAI* - FINAL						
	T°C	psu	OD mg/l	OD %sat	pH	Eh mV	NH <sub>3</sub> mg/l	T°C	psu	OD mg/l	OD % sat	pH	Eh mV	NH <sub>3</sub> mg/l
IF	19,4	38,6	6,07	64,8	8	-50	0,002	20	37,8	4,85	54,8	7,66	-32	0,004
PLL	19,5	38,5	6,01	64,3	8	-50	0,003	20,2	37,8	4,74	52	7,7	-35	0,005
CN	19,5	38,4	5,91	63,1	8	-50	0,004	20,3	37,7	4,83	53,8	7,67	-31	0,005
CM	19,5	38,4	5,91	63,4	7,98	-49	0,004	20,3	37,8	4,83	53,8	7,71	-37	0,005
PN	19,8	38,2	5,83	62,8	7,96	-48	0,004	20,4	37,8	4,65	52,1	7,77	-36	0,005
PG	19,9	38,1	6,02	64,7	7,96	-47	0,002	20,4	37,7	4,6	51,7	7,58	-31	0,002
PE	20,2	38,1	5,91	63,8	7,92	-47	0,002	20,5	37,6	4,72	54,2	7,74	-36	0,003

\* SAI : Sedimento – agua interfase



## Departamento de Ecología e Hidrología

## Ficha de Control – Sedimento / Agua interface - Erizo

## Test de Toxicidad Crónica de Corta Duración

**Organismo test:** *Arbacia lixula***Fecha de inicio:** 21/03/02**Fecha de término:** 23/03/02**Numero de embriones por réplica:** 400**Recuento de huevos:** 1º.: 415 - 2º.: 421 - 3º.: 432**Volumen Adicionado:** 0,04ml.**Hora:** 19:00**Hora:** 9:00**Numero de replicas:** 4**Media:** 422 huevos por tubo**Responsable:** Augusto

MUESTRAS	TUBO Nº.	LECTURA		MEDIA SUPERV.	MEDIA MORTAL.
		NORMAL	ANORMAL		
Isla del Fraile R-1	10	95	5	91,25	8,75
Isla del Fraile R-2	9	90	10		
Isla del Fraile R-3	8	92	8		
Isla del Fraile R-4	7	88	12		
Punta Loma Larga R-1	6	62	38	63,75	36,3
Punta Loma Larga R-2	5	58	42		
Punta Loma Larga R-3	4	65	35		
Punta Loma Larga R-4	3	70	30		
Cabo Negrete R-1	2	27	73	27,25	72,8
Cabo Negrete R-2	1	28	72		
Cabo Negrete R-3	28	30	70		
Cabo Negrete R-4	27	24	76		
Canto de la Manceba R-1	26	40	60	41,25	62,8
Canto de la Manceba R-2	25	48	68		
Canto de la Manceba R-3	24	35	65		
Canto de la Manceba R-4	23	42	58		
Punta Negra R-1	22	0	100	0	100
Punta Negra R-2	21	0	100		
Punta Negra R-3	20	0	100		
Punta Negra R-4	11	0	100		
Punta Galera R-1	12	0	100	0	100
Punta Galera R-2	13	0	100		
Punta Galera R-3	14	0	100		
Punta Galera R-4	15	0	100		
Punta Espada R-1	16	94	6	91,75	8,25
Punta Espada R-2	17	91	9		
Punta Espada R-3	18	89	11		
Punta Espada R-4	19	93	7		

Observaciones.: PN y PG – Máximo desarrollo en Blástula.

## Análisis estadístico

Resultado análisis estadístico: Los datos de normal desarrollo embriolarval fueron previamente transformados en la raíz cuadrada del arco seno para pasar en el test de normalidad de Shapiro-Wilk, posteriormente se verificó la homogeneidad y varianza a través del test de Bartlett y finalmente se utilizó el test de Dunnet para analizar las diferencias entre puntos. Estos análisis fueron realizados con el auxilio del paquete estadístico TOXSTAT® V.3.3 (Gulley, *et al.*, 1991), de acuerdo con el procedimiento propuesto por USEPA (1995).

```
File: 4ASWI          Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))
```

```
Shapiro Wilks test for normality
```

```
-----  
D =      0.037
```

```
W =      0.951
```

```
Critical W (P = 0.05) (n = 28) = 0.924
```

```
Critical W (P = 0.01) (n = 28) = 0.896  
-----
```

```
Data PASS normality test at P=0.01 level. Continue analysis.
```

```
File: 4ASWI          Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))
```

```
Bartlett's test for homogeneity of variance
```

```
-----  
Calculated B statistic =      3.97
```

```
Table Chi-square value =  16.81 (alpha = 0.01)
```

```
Table Chi-square value =  12.59 (alpha = 0.05)
```

```
Average df used in calculation ==>  df (avg n - 1) =    3.00
```

```
Used for Chi-square table value ==>  df (#groups-1) =    6  
-----
```

```
Data PASS homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
```

NOTE: If groups have unequal replicate sizes the average replicate size is used to calculate the B statistic (see above).

File: 4ASWI Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 1 of 2

GRP	IDENTIFICATION	N	MIN	MAX	MEAN
1	IF	4	1.217	1.345	1.274
2	PE	4	1.233	1.323	1.281
3	PLL	4	0.866	0.991	0.925
4	CM	4	0.633	0.765	0.697
5	CN	4	0.512	0.580	0.549
6	PN	4	0.050	0.100	0.063
7	PG	4	0.050	0.100	0.063

File: 4ASWI Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

SUMMARY STATISTICS ON TRANSFORMED DATA TABLE 2 of 2

GRP	IDENTIFICATION	VARIANCE	SD	SEM
1	IF	0.003	0.055	0.027
2	PE	0.002	0.040	0.020
3	PLL	0.003	0.053	0.026
4	CM	0.003	0.055	0.027
5	CN	0.001	0.028	0.014
6	PN	0.001	0.025	0.013
7	PG	0.001	0.025	0.013

File: 4ASWI Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	6.213	1.035	581.230
Within (Error)	21	0.037	0.002	
Total	27	6.250		

Critical F value = 2.57 (0.05,6,21)

Since  $F > \text{Critical } F$  REJECT  $H_0$ : All groups equal



File: 4ASWI Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

DUNNETTS TEST - TABLE 1 OF 2 Ho: Control<Treatment

---

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	IF	1.274	0.913		
2	PE	1.281	0.918	-0.249	
3	PLL	0.925	0.637	11.679	*
4	CM	0.697	0.412	19.327	**
5	CN	0.549	0.273	24.291	**
6	PN	0.063	0.003	40.586	**
7	PG	0.063	0.003	40.586	**

---

Dunnett table value = 2.46 (1 Tailed Value, \*P=0.05, \*\* P=0.01 df=20,6)

File: 4ASWI Transform: ARC SINE(SQUARE ROOT(Y))

DUNNETTS TEST - TABLE 2 OF 2 Ho: Control<Treatment

---

GROUP	IDENTIFICATION	NUM OF REPS	Minimum Sig Diff (IN ORIG. UNITS)	% of CONTROL	DIFFERENCE FROM CONTROL
1	IF	4			
2	PE	4	0.045	5.0	-0.005
3	PLL	4	0.045	5.0	0.275
4	CM	4	0.045	5.0	0.500
5	CN	4	0.045	5.0	0.640
6	PN	4	0.045	5.0	0.910
7	PG	4	0.045	5.0	0.910

---

## Referencias

- Gulley, D.D., Boelter, A.M. and Harold, L.B. 1991. TOXSTAT® Computer program, version 3.3. University of Wyoming, Laramie, WY.
- Hamilton, M. A., R.C. Russo and R.V. Thurston. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicological bioassays. *Envir. Sci. Technol.*, 11: 714-719; correction 12: 417; 1978.
- U. S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/-94/025, 1-158.
- U.S. Environmental Protection Agency. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to west coast marine and estuarine organisms. EPA/ 600/ R-95-136. Cincinnati, Ohio.

**Anexo III. Sumario y criterios de aceptabilidad  
de los tests de toxicidad**

<p align="center"><b>SUMARIO Y CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD</b>  <b>TESTS DE TOXICIDAD AGUDA CON EL AFÍPODO</b>  <i>Microdeutopus grillotalpa</i> (A. Costa, 1853)</p>	
01. Tipo de test:	Agudo sin renovación
02. Periodo de exposición:	10 días
03. Temperatura:	20° C
04. Salinidad:	35 a 40 psu
05. Intensidad luminosa:	600 a 1000 lux
06. Foto período:	16 h de luz / 8 h de oscuridad
07. Tamaño del recipiente test:	1 litro
08. Volumen de solución test:	700 ml.
09. Espesor del sedimento:	2 cm mínimo
10. Tamaño - organismos test:	2-4 mm ambos sexos, excepto hembras ovigeras
11. Nº de orgs. por réplica:	20 organismos
12. Nº de répls. p/ tratamiento:	3-5 réplicas
13. Nº de orgs. por tratamiento:	60 - 100 organismos
14. Alimentación:	No
15. Aireación:	Flujo continuo y suave (< 100 burbujas / min.)
16. Agua de dilución:	Agua de mar natural filtrada (0,45 µm)
17. Concentraciones test:	Controles, tóxicos de ref. y sedimentos ambientales
18. Series de dilución:	Sustancias de ref., agua intersticial y elutriados
19. Respuesta:	Supervivencia
20. Tolerancia al lón amonio:	35.54±8.00 mg/l (CE50 - CINH <sub>4</sub> )
21. Tipo de sedimento:	Fino
22. Conservación de la muestra:	< 2 semanas
23. Volumen de muestra :	2 litros
24. Criterio de aceptabilidad:	Supervivencia mayor que 80% en los controles

<p style="text-align: center;"><b>SUMARIO Y CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD</b>  <b>TESTS DE TOXICIDAD AGUDA CON EL AFÍPODO</b>  <i>Gammarus aequicauda</i> (Martinov, 1931)</p>	
01. Tipo de test:	Agudo sin renovación
02. Periodo de exposición:	10 días
03. Temperatura:	20° C
04. Salinidad:	35 a 40 psu
05. Intensidad luminosa:	600 a 1000 lux
06. Foto período:	16 h de luz – 8 h de oscuridad
07. Tamaño del recipiente test:	1 litro
08. Volumen de solución test:	700 ml.
09. Espesor del sedimento:	2 cm mínimo
10. Tamaño - organismos test:	3-5 mm ambos sexos, excepto hembras ovigeras
11. Nº de orgs. por réplica:	20 organismos
12. Nº de répls. p/ tratamiento:	3-5 réplicas
13. Nº de orgs. p/ tratamiento:	60-100 organismos
14. Alimentación:	Sí
15. Aireación:	Flujo continuo y suave (< 100 burbujas / min.)
16. Agua de dilución:	Agua de mar natural filtrada (0,45 µm)
17. Concentraciones test:	Controles, tóxicos de ref. y sedimentos ambientales
18. Series de dilución:	Sustancias de ref., agua intersticial y elutriados
19. Respuesta:	Supervivencia
20. Tolerancia al lón amonio:	49.68±11.24 mg/l (CE50 - CINH <sub>4</sub> )
21. Tipo de sedimento:	Indiferente con alimentación (canibalismo)
22. Conservación de la muestra:	< 2 semanas
23. Volumen de muestra :	2 litros
24. Criterio de aceptabilidad:	Supervivencia mayor que 80% en los controles

<b>SUMARIO Y CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD</b> <b>TESTS DE TOXICIDAD SUBCRÓNICOS CON EL ERIZO DEL MAR</b> <b><i>Arbacia lixula</i> (Linné, 1758)</b>	
01. Tipo de test:	Embriolarval
02. Periodo de exposición:	38 horas
03. Temperatura:	20° C
04. Salinidad:	37 a 39 psu
05. Intensidad luminosa:	600 a 1000 lux
06. Foto período:	16 horas de luz / 8 horas de oscuridad
07. Tamaño del recipiente test:	15 ml
08. Volumen de solución test:	10 ml
09. Espesor del sedimento:	2 cm mínimo
10. Renovación:	Estático sin renovación
11. Nº de orgs. por réplica:	400 organismos
12. Nº de répls. p/ tratamiento:	3-5 réplicas
13. Nº de orgs. p/ tratamiento:	1200 a 2000 organismos
14. Alimentación:	No
15. Aireación:	No
16. Agua de dilución:	Agua de mar natural filtrada (0,45 µm)
17. Concentraciones test:	Controles, tóxicos de ref. y sedimentos ambientales
18. Series de dilución:	Tóxicos de ref., agua intersticial y elutriados
19. Respuesta:	Normal desarrollo larval
20. Tolerancia al lón amonio:	2.48 ± 0.04 mg/l (IC50-CINH <sub>4</sub> )
21. Tipo de sedimento:	Indiferente
20. Conservación de la muestra:	< 2 semanas
21. Volumen de muestra :	1 litro
22. Criterio de aceptabilidad:	> 80% de desarrollo larval en los controles

<p align="center"><b>SUMARIO Y CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD</b>  <b>TESTS DE TOXICIDAD SUBCRÓNICOS CON EL ERIZO DEL MAR</b>  <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamarck, 1816)</p>	
01. Tipo de test:	Embriolarval
02. Periodo de exposición:	28 horas
03. Temperatura:	20° C
04. Salinidad:	37 a 39 psu
05. Intensidad luminosa:	600 a 1000 lux
06. Fotoperíodo:	16 horas de luz / 8 horas de oscuridad
07. Tamaño del recipiente test:	15 ml
08. Volumen de solución test:	10 ml
09. Espesor del sedimento:	2 cm mínimo
10. Renovación:	Estático sin renovación
11. Nº de orgs. por réplica:	400 organismos
12. Nº de répls. p/ tratamiento:	3-5 réplicas
13. Nº de orgs. p/ tratamiento:	1200 a 2000 organismos
14. Alimentación:	No
15. Aireación:	No
16. Agua de dilución:	Agua de mar natural filtrada (0,45 µm)
17. Concentraciones test:	Controles, tóxicos de ref. y sedimentos ambientales
18. Series de dilución:	Tóxicos de ref., agua intersticial y elutriados
19. Respuesta:	Normal desarrollo larval
20. Tolerancia al Ión amonio:	2.71 ± 0.19 mg/l (IC50 – CINH <sub>4</sub> )
21. Tipo de sedimento:	Indiferente
22. Conservación de la muestra:	< 2 semanas
23. Volumen de muestra :	1 litro
24. Criterio de aceptabilidad:	> 80% normal desarrollo larval en los controles

<b>SUMARIO Y CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD</b> <b>TESTS DE TOXICIDAD SUBCRÓNICOS CON EL ERIZO DEL MAR</b> <b><i>Sphaerechinus granularis</i> (Lamarck, 1816)</b>	
01. Tipo de test:	Embriolarval
02. Periodo de exposición:	38 horas
03. Temperatura:	20° C
04. Salinidad:	37 a 39 psu
05. Intensidad luminosa:	600 a 1000 lux
06. Foto período:	16 horas de luz / 8 horas de oscuridad
07. Tamaño del recipiente test:	15 ml
08. Volumen de solución test:	10 ml
09. Espesor del sedimento:	2 cm mínimo
10. Renovación:	Estático sin renovación
11. Nº de orgs. por réplica:	400 organismos
12. Nº de répls. p/ tratamiento:	3-5 réplicas
13. Nº de orgs. p/ tratamiento:	1200 a 2000 organismos
14. Alimentación:	No
15. Aireación:	No
16. Agua de dilución:	Agua de mar natural filtrada (0,45 µm)
17. Concentraciones test:	Controles, tóxicos de ref. y sedimentos ambientales
18. Series de dilución:	Tóxicos de ref., agua intersticial y elutriados
19. Respuesta:	Normal desarrollo larval
20. Tolerancia al lón amonio:	2.24 ± 0.04 mg/l (IC50 – CINH <sub>4</sub> )
21. Tipo de sedimento:	Indiferente
22. Conservación de la muestra:	< 2 semanas
23. Volumen de muestra :	1 litro
24. Criterio de aceptabilidad:	> 80% normal desarrollo larval en los controles



## **Anexo IV. Listado de especies**

## Listado de especies

A continuación se encuentran clasificadas las familias de poliquetos, y las especies de crustáceos, moluscos y equinodermos, entre otros organismos que han sido identificadas en las muestras biológicas de este estudio, referentes a los dos gradientes realizados a partir de la Bahía de Portman y otros puntos de referencia localizadas en el litoral murciano. En este listado se incluyen las especies utilizadas en los tests de toxicidad. Este listado fue elaborado según la jerarquía taxonómica empleada en lo registro europeo de especies marinas (European Register of Marine Species, <http://erms.biol.soton.ac.uk>), con fecha de actualización de 4 de julio de 2000. En la tabla 1 se encuentran la sumatoria de todos los grupos identificados y empleados en este estudio con excepción de especies de poliquetos que no fueron identificadas.

?? Phylum **SIPUNCULA**

Class **SIPUNCULIDEA**

Order **PHASCOLOSOMATIDE**

Family **Phascolionidae**

*Phascolion strombus* (Montagu, 1804)

?? Phylum **MOLLUSCA**

Class **GASTROPODA**

Order **ARCHAEOGASTROPODA**

Family **Neritidae**

*Smaragdia viridis* (Linné, 1758)

Family **Naticidae**

*Neverita josephinia* (Risso, 1826)

*Payraudeautia intricata* (Donavan, 1804)

Class **BIVALVIA**

Order **NUCULOIDEA**

Family **Nuculanidae**

*Nuculana pella* (Linné, 1758)

Order **VENOROIDA**

Family **Lucinidae**

*Lucinella divaricata* (Linné, 1758)

Family **Cardiidae**

*Acanthocardia echinata* (Linné, 1758)

Family **Mactridae**

*Moctra oralina* (Philippi, 1846)

Family **Tellinidae**

*Macoma cumana* (Costa O.G., 1829)

*Tellina donacina* (Linné, 1758)

Family **Veneridae**

*Chamelea gallina* (Linné, 1758)

*Clausinella fasciata* (da Costa, 1778)

*Dosinia exoleta* (Linné, 1758)

Class **ESCAPHOPORA**Order **DENTALIIDA**Family **Dentaliidae**

*Dentalium vulgare* (da Costa, 1778)

?? Phylum **ANNELIDA**Class **POLYCHAETA**Order **PHYLLODOCIDA**Family **Aphroditidae**Family **Phyllodocidae**Family **Glyceridae**Family **Syllidae**Family **Nereididae**Family **Nephtyidae**Family **Hesionidae**Order **AMPHINOMIDA**Family **Amphinomidae**Order **EUNICIDA**Family **Onuphiidae**Family **Eunicidae**Family **Lumbrinereidae**Family **Dorvilleidae**Order **ORBINIIDA**Family **Orbiniidae**Family **Paraonidae**Order **SPIONIDA**Family **Spionidae**Family **Cirratullidae**

Order **CAPITELLIDA**

Family **Capitellidae**

Family **Maldanidae**

Order **OPHELIIDA**

Family **Scalibregmidae**

Order **OWENIIDA**

Family **Oweniidae**

Order **TEREBELLIDA**

Family **Terebellidae**

Order **SABELLIDA**

Family **Sabellidae**

?? Phylum **ARTHROPODA**Class **CRUSTACEA**Order **MYODOCOPIDA**Family **Cypridinidae**

*Cypridina megalops* (Sars, 1872)

Order **MYSIDACEA**Family **Mysidae**

*Anchialina agilis* (G. O. Sars, 1877)

Order **Cumacea**Family **Bodotridae**

*Iphinoe serrata* (Norman, 1867)

Family **Leuconidae**

*Leucon mediterraneus* (Sars, 1879)

Family **Nannastacidae**

*Campylaspis glabra* (Sars, 1879)

Order **AMPHIPODA**Family **Caprellidae**

*Phsica marina* (Slabber, 1749)

*Pseudolirius kroyerii* (Haller, 1879)

*Pseudoprotella phasma* (Montagu, 1804)

Family **Ampeliscidae**

*Ampelisca typica* (Bate, 1856)

Family **Amphilochidae**

*Gitana sarsi* (Boeck, 1871)

*Peltocoxa marioni* (Catta, 1875)

Family **Aoridae**

*Aora spinocornis* (Afonso, 1976)

*Leptocheirus pectinatus* (Norman, 1869)

*Microdeutopus gryllotalpa* (Costa, 1853)

Family **Corophidae**

*Corophium acutum* (Chevreux, 1908)

Family **Dexaminidae**

*Atylus guttatus* (Costa, 1851)

*Dexamine spiniventris* (Costa, 1853)

Family **Eusiridae**

*Apherusa alacris* (Krapp-Schickel, 1969)

*Apherusa chiereghinii* (Giordani-Soika, 1950)

*Eusirus longipes* (Boeck, 1861)

Family **Gammaridae**

*Gammarus aequicauda* (Martynov, 1931)

Family **Isaeidae**

*Photis longipes* (Della Valle, 1893)



Family **Ischyroceridae**

*Erichthonius punctatus* (Bate, 1857)

Family **Leucothoidae**

*Leucothoe richiardii* (Lesson, 1865)

Family **Lysianassidae**

*Hippomedon ambiguus* (Ruffo, 1946)

*Lysianassa costae* (Milne-Edwards, 1830)

*Lysianassa insperata* (Lincoln, 1979)

*Lysianassa longicornis* (Lucas, 1849)

*Orchomene humilis* (Costa, 1853)

*Tryphosella longidactyla* (Ruffo, 1985)

Family **Oedicerotidae**

*Monoculodes carinatus* (Bate, 1857)

Family **Phoxocephalidae**

*Harpinia crenulata* (Boeck, 1871)

*Phoxocephalus aquosus* (Karaman, 1985)

Family **Pontoporeiidae**

*Bathyporeia guilliamsoniana* (Bate, 1857)

*Bathyporeia megalops* (Chevreux, 1911)

Family **Stenothoidae**

*Stenothoe monoculoides* (Montagu, 1815)

Family **Urothoidae**

*Urothoe grimaldii* (Chevreux, 1895)

---

**Order ISOPODA****Family Anthuridae**

*Anthura gracilis* (Montagu, 1808)

*Cyathura carinata* (Krøyer, 1847)

**Family Cirolanidae**

*Cirolana cranchii* (Leach, 1818)

**Family Sphaeromatidae**

*Cymodoce hauseni* (Dumay, 1972)

*Dynamene edwardsi* (Lucas, 1849)

**Family Arcturidae**

*Astacilla longicornis* (Sowerby, 1806)

**Family Idoteidae**

*Zenobiana prismática* (Risso, 1816)

**Order TANAIDACEA****Family Apseudidae**

*Apseudes latreillii* (Milni-Edwards, 1828)

**Family Leptocheliidae**

*Leptochelia dubia* (Krøyer, 1842)

**Family Anarthruridae**

*Leptognathia breviremis* (Lilljeborg, 1864)

Order **DECAPODA**Family **Hippolytidae**

*Hippolyte holthuisi* (Zariquiey-Alvarez, 1953)

*Thoralus chanchii* (Leach, 1817)

Family **Alpheidae**

*Athanas nitescens* (Leach, 1814)

Family **Paguridae**

*Anapagurus laevis* (Bell, 1845)

Family **Leucosiidae**

*Ebalia edwardsii* (Costa, 1838)

Family **Portunidae**

*Macropipus tuberculatus* (Roux, 1830)

?? Phylum **ECHINODERMATA**Class **OPHIUROIDEA**Order **OPHIURIDA**Family **Amphiuridae**

*Amphiura chiajei* (Forbes, 1843)

Class **ECHINOIDEA**Order **ARBACIOIDA**Family **Arbaciidae**

*Arbacia lixula* (Linné, 1758)

Order **TEMNOPLEUROIDA**Family **Toxopneustidae**

*Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816)

Order **ECHINOIDA**Family **Echinidae = Parechinidae**

*Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Order **CLYPEASTEROIDA**Family **Fibulariidae**

*Echinocyamus pusillus* (O.F. Müller, 1776)

?? Phylum **CHORDATA**

Class **LEPTOCARDIA** (Amphioxo)

Order **BRANCHIOSTOMIDA**

Family **Branchiostomidae**

*Branchiostoma lanceolatum* (Pallas, 1774)

**Tabla 1** . Sumatoria de los grupos identificados y empleados en este estudio.

GRUPOS	PHYLUM	CLASS	ORDER	FAM	SPS <sup>a</sup>
<i>SIPUNCULA</i>	1	1	1	1	1
<i>MOLLUSCA</i>	1	3	4	9	13
<i>POLYCHAETA</i>	1	1	10	22	ND <sup>b</sup>
<i>CRUSTACEA</i>	1	1	6	35	52
<i>ECHINODER</i>	1	2	5	5	5
<i>LEPTOCARD</i>	1	1	1	1	1
<b>TOTAL</b>	6	9	27	73	72 <sup>a</sup>

Total de especies <sup>a</sup> - Excluyendo especies de POLYCHAETA

ND<sup>b</sup> - No determinado