

Nota de Investigación/Research Note

Ejercicio interlaboratorio de bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros. VI. Análisis general de resultados y conclusiones del ejercicio

Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. VI. General analysis of results and conclusions of the exercise

MC Casado-Martínez^{1*}, JL Buceta², JM Forja¹, TA DelValls¹¹ Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España. * E-mail: mcarmen.casado@uca.es² Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX), Ministerio de Fomento, C/ Antonio López 81, 28026, Madrid, España**Resumen**

Para estudiar si los bioensayos de toxicidad cumplen ciertos criterios a nivel nacional se realizó un ejercicio interlaboratorio diseñado principalmente para estudiar el desarrollo, la optimización y la validación de los métodos disponibles para la evaluación de la toxicidad en material de dragado. Se evaluó la eficiencia y la utilidad de este tipo de técnicas y se compararon los resultados de toxicidad obtenidos con la caracterización química tradicional. Este ejercicio incluyó dos fases y mostró resultados satisfactorios especialmente para el ensayo Microtox[®], el ensayo con el desarrollo embrionario del erizo de mar y el ensayo con anfípodos. Estos tres ensayos parecen factibles y ofrecen información útil para la gestión de dragados portuarios. Los resultados del análisis multivariante realizado para unir la toxicidad y la contaminación registrada con los ensayos mostraron que las respuestas tóxicas registradas están correlacionadas en mayor o menor medida con los distintos contaminantes analizados en el sedimento.

Palabras clave: ecotoxicología, toxicidad de sedimento, análisis multivariate, guías de calidad de sedimento, gestión de material de dragado.

Abstract

To ensure that toxicity bioassays comply with national criteria, an interlaboratory study was carried out that focussed mainly on the development, optimization and validation of methods for dredged material toxicity assessment. The performance of these techniques was assessed in a validation study and the results were compared with the traditional chemical characterization. This study included two phases and showed promising results in particular for the Microtox[®] bioassay, the bioassay using crustacean amphipods and the embryo-larval development bioassay using sea urchins. These tests seem feasible and give useful information for dredged material management. Moreover, to evaluate sediment quality, the chemical concentration of the contaminants of concern and toxicity test endpoints were linked using multivariate analysis. The results of this analysis showed that the toxic responses were correlated to different contaminants measured in the sediments.

Key words: ecotoxicology, sediment toxicity, multivariate analysis, sediment quality guidelines, dredged material management.

Introducción

Para evaluar la variabilidad en cuatro bioensayos se llevó a cabo un ejercicio interlaboratorio como parte del proceso de desarrollo y selección de una batería de bioensayos para la caracterización de materiales de dragado en España. Los ensayos seleccionados fueron el Microtox[®], siguiendo el protocolo para la fase sólida (SPT) y el nuevo protocolo básico para muestras sólidas (BSPT); el ensayo de desarrollo larvario a 48 h con embriones de erizo de mar para la evaluación de lixiviados de sedimentos; y el bioensayo con anfípodos y juveniles de bivalvo, ambos desarrollados sobre la fase sólida. Los principales objetivos de estudio de los ensayos fueron: (1) evaluar la precisión de cada bioensayo para caracterizar la toxicidad de

Introduction

An interlaboratory study was carried out to evaluate the variability related to the execution of bioassays by different laboratories as part of the development and selection of a battery of tests suitable for dredged material characterization processes in Spain. The selected bioassays included the Microtox[®], following the solid-phase test (SPT) and the new basic solid-phase test (BSPT) protocols; the 48-h sea urchin embryo-larval development bioassay to test elutriates; and the bioassay using amphipods and the burrowing and survival bioassay using juvenile bivalves, both developed on the whole sediment. The main objectives of the study were: (1) to assess the precision of each of the bioassays to characterize dredged

materiales de dragado cuando son desarrollados por distintos laboratorios; (2) identificar los principales factores de confusión que pueden afectar la interpretación de los resultados; (3) discutir las posibles causas de variabilidad interlaboratorio para mejorar el protocolo estándar y así el uso de los bioensayos como herramienta complementaria para la caracterización y gestión de dragados portuarios; y (4) discutir las guías biológicas previamente propuestas para cada ensayo para considerar las muestras como tóxicas o no tóxicas (Casado-Martínez *et al.* 2006a).

Las condiciones relacionadas con el muestreo y manipulación de los sedimentos han sido previamente discutidas (Casado-Martínez *et al.* 2006a), así como los resultados para cada uno de los bioensayos utilizados (Casado-Martínez *et al.* 2006b–e). El objetivo de este trabajo es analizar globalmente los resultados y conclusiones, y estudiar el uso de los ensayos biológicos en los procesos de caracterización para la gestión de dragados en España conjuntamente con la tradicional caracterización química. Además, las series de datos se estudiaron mediante un análisis estadístico multivariante para evaluar la relación entre los efectos biológicos adversos y la concentración de los compuestos potencialmente tóxicos.

Material y métodos

Con el propósito de encontrar posibles relaciones entre las distintas variables se utilizó un análisis factorial de componentes principales como procedimiento de extracción (DeIvalls y Chapman 1998, Riba *et al.* 2003). Los datos obtenidos se analizaron individualmente para cada fase del ejercicio mediante la técnica de extracción de componentes principales con el programa estadístico Statistica® 5.0. El análisis de los factores se realizó en la matriz de correlación y todos los datos biológicos fueron tratados de forma similar suponiendo igual importancia para cada ensayo. Los datos de toxicidad se transformaron de forma que mostrasen un aumento en el valor al aumentar los efectos biológicos.

Resultados

Fase I

El conjunto de variables originales comprendió 28 series de datos, cada una con 10 variables químicas (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, Σ_7 -PCBs y Σ_{16} -PAHs), 3 parámetros convencionales del sedimento (porcentaje de arenas, porcentaje de finos y contenido en material orgánica) y 15 variables de efecto biológico: los resultados para el ensayo Microtox® SPT expresados como unidades tóxicas (100/EC50), el porcentaje de larvas anormales tras 48 h de exposición a los lixiviados, el porcentaje de mortalidad de anfípodos, así como el porcentaje de mortalidad de bivalvos tras 14 días de exposición (tabla 1). Sólo se incluyeron en el análisis multivariante los resultados de los laboratorios que obtuvieron resultados con todas las muestras y que, además, se consideraron aceptables: cinco laboratorios para el Microtox®, nombrados A1, A2, A3, A4 y

material toxicity when developed by different operators and laboratories, (2) to identify the main interfering factors affecting the test results and their interpretation, (3) to discuss the possible causes of interlaboratory variation in order to improve the standard protocol and the use of bioassays as a complementary tool for dredged material characterization and management, and (4) to support biological guidelines previously derived or proposed for each test to consider whether a sample is toxic or not toxic.

The sediment sampling and handling conditions are described in Casado-Martínez *et al.* (2006a), and the results for each bioassay have been discussed individually (Casado-Martínez *et al.* 2006b–e). The objective of this paper is to give an overview of the interlaboratory variability when using sediment bioassays and to study the performance of such tests for dredged material characterization. Furthermore, the data sets have been used to study the relationship between the adverse biological effects and the concentration of potentially toxic substances present in the environment by means of multivariate statistical techniques.

Material and methods

A principal component extraction followed by multivariate analysis was used to link the chemical quantification and the toxicological responses registered by each laboratory and for each bioassay (DeIvalls and Chapman 1998, Riba *et al.* 2003). The data sets for each phase were analyzed separately using the factor analysis option of the Statistica® 5.0 program, using the principal components technique as the extraction procedure. The factor analysis was performed on the correlation matrix and all biological data were treated similarly assuming that the significance of each test was equal. Moreover, the toxic responses were transformed to show an increase with biological damage.

Results

Phase I

The original data set comprised 28 variables that included 10 chemical variables (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, Σ_7 -PCBs and Σ_{16} -PAHs), 3 conventional parameters of the sediment (percentage of sand, percentage of fine sediments and organic matter content), and 15 biological effect variables: the results of the Microtox® SPT expressed as toxic units (100/EC50), the percentage of abnormal sea urchin larvae after 48 h of exposure to the elutriates, the percentage of amphipod mortality and the percentage of bivalve mortality after 14 days of exposure (table 1). Only those laboratories that reported results for all samples and those considered for each bioassay (as discussed previously) were included for the multivariate exploratory analysis: five laboratories for the Microtox® bioassay, named A1, A2, A3, A4 and A5 (Casado-Martínez *et al.* 2006b); four for the amphipod bioassay, named B1, B3, B4 and B5 (Casado-Martínez *et al.* 2006c); two for the bioassay using

Tabla 1. Valores de las 28 variables de la fase I usadas en el análisis multivariante. Las medidas de toxicidad son A# = 100/EC50, B# = % de mortalidad de anfípodos, C# = % mortalidad de bivalvos, D# = % de larvas anormalmente desarrolladas; # son los códigos asignados previamente a cada laboratorio. **Table 1.** Values of the 28 variables from Phase I used in the multivariate analysis. Toxicity endpoints are A# = 100/EC50, B# = percent amphipod mortality, C# = percent bivalve mortality, and D# = percent of abnormal sea urchin larvae; # indicates the code number assigned to each laboratory.

	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E	Sample F
% sand	99.8	40.4	9.60	20.3	39.9	38.2
% fine sediment	0.04	59.5	90.2	77.3	58.7	57.8
% OM	1.07	13.8	10.6	14.8	17.6	10.6
As	3.42	30.8	531	67.3	29.0	102
Cd	0.92	1.32	2.50	2.00	2.88	98.5
Cr	0.10	14.9	24.1	18.3	93.9	66.6
Cu	6.98	203	1497	103	601	666
Hg	0.05	1.98	1.99	0.74	4.12	136
Ni	0.06	20.1	7.10	26.3	32.3	29.0
Pb	2.28	86.9	384	148	455	1397
Zn	21.3	378	1857	476	1165	8651
Σ_7 -PCBs	0.001	145	0.001	112	273	123
Σ_{16} -PAHs	0.001	0.001	0.001	66.7	1.80	0.91
A1	0.003	0.76	0.13	0.20	0.28	0.30
A2	0.003	0.68	0.21	0.18	0.23	0.25
A3	0.02	0.38	0.11	1.01	0.24	0.54
A4	0.002	0.17	0.16	0.14	0.03	0.14
A5	0.02	0.61	0.67	0.63	0.20	0.25
B1	12.5	75.0	100	67.5	57.5	100
B3	1.60	47.3	90.0	30.0	35	100
B4	3.33	45.0	81.7	43.3	41.67	100
B5	15.0	53.3	61.7	60.0	73.33	80.0
C1	1.25	0.00	57.5	2.50	10	6.25
C2	2.50	1.25	50.0	2.50	12.5	7.75
D2	100	100	85.3	55.0	49.7	56.3
D3	31.5	20.0	82.3	10.5	35.4	100
D4	83.5	94.4	100	8.00	7.00	5.50
D5	65.5	88.0	89.3	13.3	24.0	13.0

A5 (Casado-Martínez *et al.* 2006b); cuatro para el ensayo con anfípodos, identificados como B1, B3, B4 y B5 (Casado-Martínez *et al.* 2006c); dos para el ensayo con bivalvos, C1 y C2 (Casado-Martínez *et al.* 2006d); y cuatro para el ensayo con larvas de erizo de mar, D2, D3, D4 y D5 (Casado-Martínez *et al.* 2006e).

Los resultados del análisis agruparon los datos originales en tres nuevos factores que explicaban 80% de la varianza original. Estos nuevos factores van a ser descritos según las variables dominantes con un peso positivo de 0.25 o superior (tabla 2) aunque los valores negativos en los nuevos factores son de igual importancia. El primer factor, que suma 35% de la varianza total, combina el porcentaje de finos y los compuestos

bivalvos, named C1 and C2 (Casado-Martínez *et al.* 2006d); and four for the bioassay using sea urchin larvae, named D2, D3, D4 and D5 (Casado-Martínez *et al.* 2006e).

Analysis of the original data revealed three new factors that accounted for more than 80% of the total original variance. These new factors will be described according to the dominant variables with a minimum loading of 0.25 (table 2). The first extracted factor, which accounted for more than 35% of the total variance, combined the percentage of fine sediments and the chemical compounds As and Cu, as well as Pb and Zn, and Ni, PCBs and PAHs with negatives loadings. The biological effect variables that reported positive loadings in this factor comprised the results of laboratories 4 and 5 for the Microtox®

As y Cu así como el Pb y Zn, y los compuestos Ni, PCBs y PAHs con pesos negativos. Las variables biológicas con pesos positivos para este factor incluyen los resultados del Microtox® en los laboratorios 4 y 5, los resultados de los ensayos con anfipodos y con almejas y todos los resultados del ensayo con embriones de erizo de mar excepto los correspondientes al laboratorio 2. El segundo factor explica 20% de la varianza total y aparece relacionado con el contenido de ciertos metales (Cd, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn obtienen pesos positivos mayores a 0.6) y el efecto tóxico registrado para el ensayo de anfipodos, los resultados de un laboratorio con el Microtox® y los resultados de otro laboratorio con el ensayo de desarrollo larvario. Por último, el tercer factor extraído, que explica 18% de la varianza, representa el porcentaje de finos en el sedimento y el contenido en materia orgánica. Las variables químicas Ni, PCBs y PAHs y los efectos registrados con el ensayo Microtox® obtuvieron los mayores pesos en cada caso para este factor.

Los resultados de este análisis se presentan gráficamente en la figura 1, que representa la contribución de los factores en cada caso de estudio (muestras). Al parecer, los compuestos químicos agrupados en los factores 1 y 2 son los causantes de los efectos letales registrados, con una importante contribución de este factor en las muestras C, E y F, aunque es difícil identificar los compuestos causantes de esta toxicidad ya que las respuestas tóxicas no se agrupan uniformemente en ninguno de los nuevos factores. Los efectos letales registrados mediante el ensayo con almejas en los dos laboratorios tienen pesos positivos alrededor de 0.9 para el factor 1 y con una importante contribución de la muestra C. Esta medida tóxica parece reproducible entre los laboratorios y los efectos pueden relacionarse principalmente con las concentraciones de As y Cu y en menor medida de Pb y Zn. Para el ensayo con anfipodos los valores más altos se localizan también en el factor 1 aunque con pesos positivos en todos los nuevos factores extraídos: parece que la mortalidad de anfipodos se ve afectada principalmente por las especies metálicas As, Cu, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn pero también por los compuestos orgánicos analizados. En cualquier caso los resultados parecen reproducibles entre laboratorios aunque se encuentran ligeras diferencias para el laboratorio 5, que utilizó la especie *Myrodeutopus gryllotalpa* y obtuvo pesos más elevados para el factor 3, donde se encuentran los mayores pesos para el porcentaje de finos, el contenido en materia orgánica pero también de los compuestos de naturaleza orgánica.

Los resultados del ensayo Microtox® obtuvieron pesos positivos para el factor 3, aunque los laboratorios 4 y 5 tuvieron pesos positivos también para el factor 1. Los resultados del análisis multivariante muestran que los resultados son reproducibles entre los laboratorios ya que en todos los casos se han obtenido pesos positivos elevados en el factor 3 y por lo tanto las respuestas tóxicas estarían relacionadas principalmente a las variables incluidas en este factor (porcentaje de finos y materia orgánica en el sedimento y los compuestos químicos Ni, PCBs y PAHs).

Tabla 2. Peso de los tres factores principales para cada una de las 28 variables. Sólo aquellos pesos superiores a 0.25 están incluidos. Las medidas de toxicidad son A# = 100/EC50, B# = % de mortalidad de anfipodos, C# = % mortalidad de bivalvos, D#=% de larvas anormalmente desarrolladas; # son los códigos asignados previamente a cada laboratorio.

Table 2. Sorted rotated factor loadings of 28 variables in the three principal factors. Only loadings greater than 0.25 are included. Toxicity endpoints are A# = 100/EC50, B# = percent amphipod mortality, C# = percent bivalve mortality, and D# = percent of abnormal sea urchin larvae; # indicates the code number assigned to each laboratory.

	Factor 1 (37.85%)	Factor 2 (25.39%)	Factor 3 (18.08)
% sand	-0.602	-	-0.752
% fine sediment	0.616	-	0.751
OM	-	-	0.904
As	0.948	-	-
Cd	-	0.896	-
Cr	-	0.752	-
Cu	0.908	-	-
Hg	-	0.897	-
Ni	-0.266	0.636	0.700
Pb	0.264	0.953	-
Zn	0.275	0.907	-
Σ ₇ -PCBs	-0.423	0.395	0.568
Σ ₁₆ -PAHs	-0.314	-	0.563
A1	-	-	0.578
A2	-	-	0.580
A3	-0.261	0.263	0.709
A4	0.598	-	0.581
A5	0.573	-0.335	0.704
B1	0.736	0.439	0.483
B3	0.790	0.562	-
B4	0.701	0.649	0.251
B5	0.323	0.695	0.610
C1	0.904	-	-
C2	0.894	-	-
D2	-	-0.721	-0.442
D3	0.680	0.641	-0.351
D4	0.449	-0.744	-0.348
D5	0.490	-0.728	-

bioassay, all the results of the bioassay using amphipods and juvenile clams, and all but the laboratory 2 results for the bioassay using sea urchin larvae. The second factor explained 20% of the total variance and is related to the metal content (Cd, Cr, Hg, Ni, Pb and Zn had positive loadings higher than 0.6) and the toxic effects recorded for the amphipod bioassay, the results reported by one laboratory for the Microtox®

Los resultados del ensayo sobre la fase líquida mostraron en la Fase I una respuesta más variable entre laboratorios: el laboratorio 2 no mostró factores con pesos positivos en ninguno de los nuevos factores y por lo tanto no se podría establecer ningún tipo de relación entre las respuestas tóxicas y las variables fisicoquímicas. Las diferencias en los resultados han sido previamente discutidas (Casado-Martínez *et al.* 2006e) y pudieron estar influenciadas por otros factores relacionados con la preparación de las muestras y no incluidos en el análisis multivariante. En cualquier caso las muestras se distribuyeron desde un mismo laboratorio al mismo tiempo y posibles cambios en las propiedades químicas del sedimento pudieron haberse debido a cambios durante el almacenamiento, extracción o pre-tratamiento de las muestras. Los efectos registrados para los otros tres laboratorios parecen debidos a las variables explicadas por el factor 1 y, por lo tanto, el desarrollo anormal de las larvas aparecería relacionado con las especies químicas As, Cu, Pb y Zn aunque para un laboratorio en particular también se relacionan con las concentraciones de Cd, Cr, Hg, Ni, y PCBs. Los pesos negativos tan elevados en el factor 3 parecen indicar que los posibles efectos no sólo se relacionan con los compuestos metálicos sino que cuestionan los posibles efectos causados por la presencia de compuestos orgánicos en los lixiviados.

Fase II

El conjunto de datos originales comprendía 13 variables relacionadas con las propiedades del sedimento (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, Σ_7 -PCBs y Σ_{16} -PAHs y el porcentaje de arenas, porcentaje de finos y contenido en material orgánica del sedimento) y 14 variables de efectos biológicos (tabla 3):

bioassay and by another for the bioassay using sea urchin larvae. The third factor, which accounted for more than 18% of the total variance, represented the fine particles of the sediment and the organic matter content. The chemical variables Ni, PCBs and PAHs and the effects recorded using the Microtox[®] bioassay obtained their highest loadings for this factor.

Figure 1 shows the factor scores estimated for each of the six cases, which quantify the prevalence of every factor for each sample used in the interlaboratory study. Apparently the chemical compounds grouped in factors 1 and 2 are responsible for the lethal effects registered (samples C, E and F have positive factor scores), but it is difficult to clearly identify the toxicity-causing compounds since the toxic responses are not grouped uniformly in any of the new factors. In the case of the lethal effects registered for the juvenile clams, the two participating laboratories had positive loadings of around 0.9 in factor 1, which are explained by the high positive factor score for sample C. Moreover, it seems highly reproducible between laboratories and the effects are mainly related to the As and Cu concentrations, and to a lesser extent to Pb and Zn. For the bioassay using amphipods, the highest values were found in factor 1, although positive loadings were found in all the new extracted factors: it seems that amphipod mortality is primarily affected by the metallic compounds As, Cu, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb and Zn, as well as by organic compounds. Nevertheless, the results seem reproducible between laboratories and only slight differences were found for laboratory 5, which used a different amphipod species (*Mycrodeutopus gryllotalpa*) and obtained a higher loading for factor 3, related not only to the fine-grain size and organic matter content, but also to organic compounds.

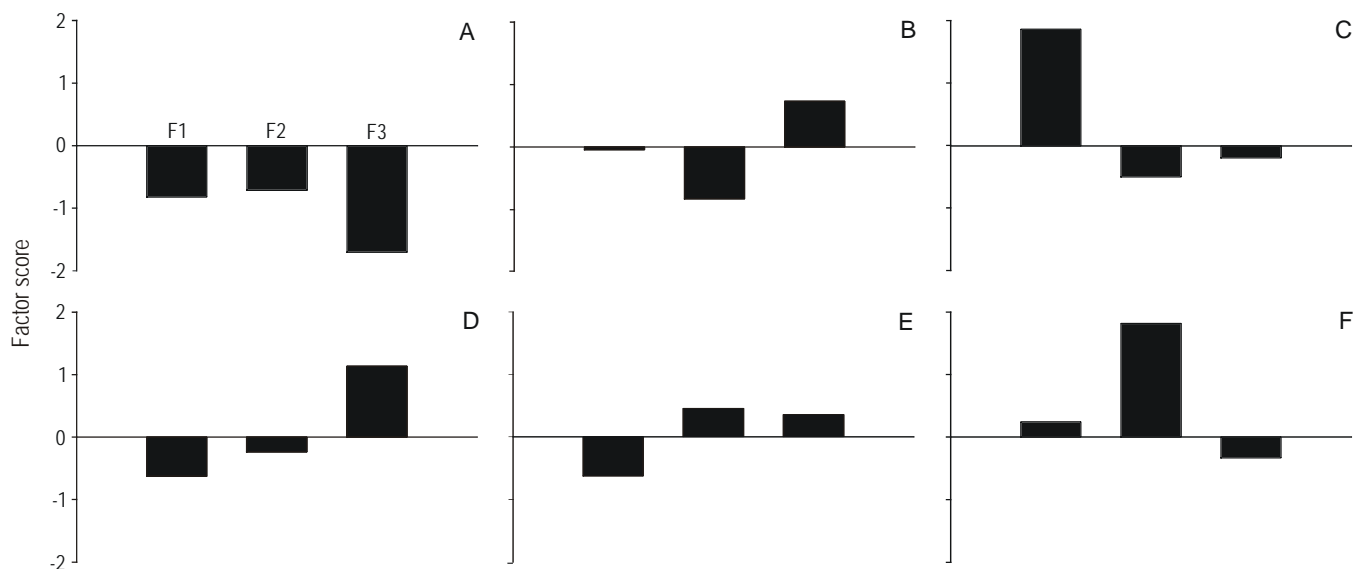


Figura 1. Contribución de los factores estimados para cada uno de los seis casos de la Fase I (A, B, C, D, E y F) al centroide de todos los casos para los datos originales.

Figure 1. Factor scores estimated for each of the six Phase I cases (A, B, C, D, E and F) relative to the centroid of all cases from the original data.

siete laboratorios para el ensayo Microtox® siguiendo el protocolo SPT (A1 a A7), tres siguiendo el protocolo BSPT (B1 a B3) y cuatro para el ensayo de desarrollo larvario con embriones de erizo de mar (C1 a C4). Los resultados clasifican las variables originales en cinco nuevos factores que explican el 100% de la varianza total. La tabla 4 incluye los porcentajes de varianza explicada por cada uno de los nuevos factores y los pesos de cada variable original. En la figura 2 los coeficientes de los nuevos factores para cada uno de los casos (muestras) se representan frente al centroide de todos los casos de los datos originales para estimar la contribución de cada uno de los casos en las nuevas variables o factores. El primer factor, que explica más del 45% de la varianza total, representa las variables contenido en materia orgánica, Cd, Cr y Pb, con los pesos más elevados para las concentraciones de PCBs y PAHs. Este factor también explica la mayor parte de la variabilidad asociada al Microtox® con ambos protocolos (SPT y BSPT), y a los efectos del ensayo con embriones de erizo de mar de dos laboratorios. El factor 2 representa el porcentaje de finos y el contenido en materia orgánica del sedimento, aunque para esta última variable con pesos inferiores a los encontrados para el factor 1 y las especies metálicas As, Cr y Hg. Este factor explica la mayor parte de la variabilidad asociada con el ensayo con embriones de erizo de mar, que también parece influido por el Ni, representado por el factor 5 y con altos pesos positivos. El factor 3, que explica algo más del 15% de la varianza total, explica parte de la varianza asociada al As, Cu, Pb y Zn y a uno de los laboratorios para el Microtox®. Los otros dos factores (4 y 5) explican cada uno algo menos del 10% de la varianza total pero con correlaciones interesantes para algunas de las variables. El factor 4 agrupa el contenido en materia orgánica de los sedimentos con los compuestos Hg y PCBs, así como los efectos tóxicos registrados en la mitad de los laboratorios que realizaron el Microtox®. Por otro lado, el factor 5 agrupa las concentraciones de Ni, los efectos tóxicos registrados con el ensayo con embriones de erizo de mar y, en menor medida, ciertos efectos en la disminución de la luminiscencia.

Aunque los resultados obtenidos en la Fase II son similares a los obtenidos en la Fase I la reproducibilidad de las respuestas tóxicas parece mucho más conservativa, especialmente con relación al nuevo protocolo del Microtox® (BSPT). El análisis multivariante ha identificado una mayor correlación entre Hg, PCBs y el contenido en materia orgánica en el factor 4, que también explica parte de la varianza de los resultados tóxicos con este protocolo. Por otro lado la contribución de ciertos compuestos metálicos en las respuestas tóxicas del ensayo de embriones de erizo de mar, como por ejemplo las de As, Cr, Pb y Zn, aparecen en el análisis de los resultados de ambas fases aunque la Fase II identifica también los compuestos Hg y Ni.

Discusión

Los resultados del ejercicio interlaboratorio con el ensayo Microtox® y el ensayo con anfipodos parecen ofrecer resultados satisfactorios con relación a las condiciones de desarrollo y en especial incluyendo las circunstancias

The toxic responses measured by the Microtox® device had positive loadings in factor 3, although laboratories 4 and 5 reported positive loadings also for factor 1. The results of the multivariate analysis show a reproducible effect between laboratories represented by the high positive loadings of the toxicity variables in factor 3 and thus the toxic response registered by the Microtox® system can be described principally by the contribution of the variables explained by this factor (this factor includes the percentage of fine particles and organic matter content in the sediments, as well as the chemical compounds Ni, PCBs and PAHs).

The results of the only liquid-phase bioassay conducted (the bioassay using sea urchin embryos) showed a more variable response among laboratories in Phase I of the exercise: laboratory 2 did not show positive loadings for any of the extracted factors and no relationship can therefore be elucidated between the measured variables and the toxic effects. The differences in the results have been previously identified (Casado-Martínez *et al.* 2006e) and could be influenced by different interfering factors during sample manipulation. Samples were distributed from the coordinator laboratory and changes in the sediment chemistry could be related to changes during the storage, elutriation and pretreatment of the samples. Factor 1 seems to explain some of the effects registered by three laboratories; thus, the abnormal development of the sea urchin embryos would be related to As, Cu, Pb and Zn although the response for one laboratory is also related to other compounds (Cd, Cr, Hg, Ni, and PCBs). The high negative loadings in factor 3 suggest that the effects on the normal development are not only related to the metallic compounds cited before, but also question the effects caused by the presence of certain organic compounds.

Phase II

The original data set comprised 13 variables related to the sediment properties (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, Σ_7 -PCBs and Σ_{16} -PAHs, and percentage of sand, percentage of fine sediments and organic matter content) and 14 biological effect variables (table 3), including seven laboratories that reported results for the Microtox® SPT protocol (A1 to A7), three sets of results for the BSPT protocol (B1 to B3) and four sets of results for the bioassay using sea urchin embryos (C1 to C4). The results classified the original variables into five new factors that explained 100% of the total variance. Table 4 includes the percentage of explained variance for the new extracted factors and the factor loadings for each original variable. Figure 2 shows the factor scores estimated for each case plotted to the centroid of all cases for the original data to estimate the contribution of each case. Factor 1, which accounted for more than 45% of the total variance, represents the organic matter content and the chemical compounds Cd, Cr, Pb, PCBs and PAHs. This factor also accounted for most of the variability related to the Microtox® bioassay, for both the SPT and BSPT protocols, and for the effects of the bioassay using sea urchin larvae registered

Tabla 3. Valores para cada una de las 27 variables de la segunda fase del estudio usadas para el análisis multivariante. Las medidas de toxicidad son A#=100/EC50 SPT; B#= 100/EC50 BSPT; C#= % de larvas anormalmente desarrolladas. # son los códigos asignados previamente a cada laboratorio. **Table 3.** Values of the 27 variables from Phase II used in the multivariate analysis. Toxicity endpoints are A# = 100/EC50 SPT, B# = 100/EC50 BSPT, and C# = percent of abnormal sea urchin larvae; # indicates the code number assigned to each laboratory.

	Sample A'	Sample B'	Sample C'	Sample D'	Sample E'	Sample F'
% sand	99.0	42.9	56.0	8.36	5.00	14.5
% fine sediment	0.68	57.1	44.0	91.4	94.0	47.4
% OM	1.50	14.0	6.30	9.37	9.00	15.1
As	3.98	33.7	273	336	109	104
Cd	0.87	2.00	1.32	1.03	0.17	2.00
Cr	0.22	16.3	8.13	12.1	38.2	23.1
Cu	8.67	198	772	497	5.01	204
Hg	0.09	1.54	1.20	0.90	1.90	1.43
Ni	0.07	23.9	129	6.18	74.7	32.0
Pb	3.98	97.4	218	211	21.6	286
Zn	24.5	405	1176	974	138	778
Σ_7 -PCBs	n.d.	130	0.00	2.29	109	256
Σ_{16} -PAHs	n.d.	n.d.	0.00	0.00	4.21	13.9
A1	0.0013	0.13	0.22	0.08	0.16	0.63
A2	0.0049	0.24	0.32	0.17	0.35	1.28
A3	0.0014	0.25	0.30	0.09	0.21	0.56
A4	0.0001	0.24	0.15	0.04	0.06	0.12
A5	0.0004	0.13	0.28	0.05	0.11	0.29
A6	0.01	0.35	0.30	0.10	0.38	1.47
A7	0.01	0.48	0.42	0.02	0.58	0.45
B1	0.003	0.29	0.36	0.02	0.37	1.66
B2	0.0001	0.25	0.46	0.16	0.39	1.59
B3	0.01	0.34	0.56	0.39	0.76	2.05
C1	18.00	13.00	64.00	93.00	99.0	40.00
C2	9.00	4.00	21.00	8.00	76.0	22.00
C3	47.00	29.00	88.00	53.00	100.00	91.00
C4	7.00	9.00	20.00	30.00	100.00	81.00

particulares de cada laboratorio. El ensayo con almejas no ofreció los resultados esperados posiblemente debido a los pocos de laboratorios que participaron en el estudio; sin embargo, este ensayo parece factible para la evaluación de la toxicidad de sedimentos. Se requiere un mayor desarrollo de los protocolos para las medidas letal y subletal, para poder ser usadas en la gestión de material de dragado. Del mismo modo la sensibilidad de esta especie parece menor a la de las especies de anfípodos utilizadas, que parecen más recomendables para la caracterización de este tipo de materiales durante su gestión. El ejercicio interlaboratorio se repitió para el ensayo con larvas de erizo y para el ensayo Microtox®, ya que los resultados obtenidos inicialmente no fueron tan contundentes como se

by two of the laboratories. Factor 2 represents the percentage of fine sediments and the organic matter content (although the factor loading is lower than for factor 1), as well as the metallic compounds As, Cr and Hg. This factor also explains most of the variability related to the sea urchin embryo assay, which was also affected by Ni, represented in factor 5 and with high positive loadings. Factor 3, which accounted for more than 15% of the total variance, is related to As, Cu, Pb and Zn, as well as to the toxic response registered by one of the laboratories using the Microtox® device. Factors 4 and 5 each accounted for less than 10% of the total variance, but interesting correlations were found. Factor 4 groups the organic matter content of the sediments and the Hg and PCB concentrations

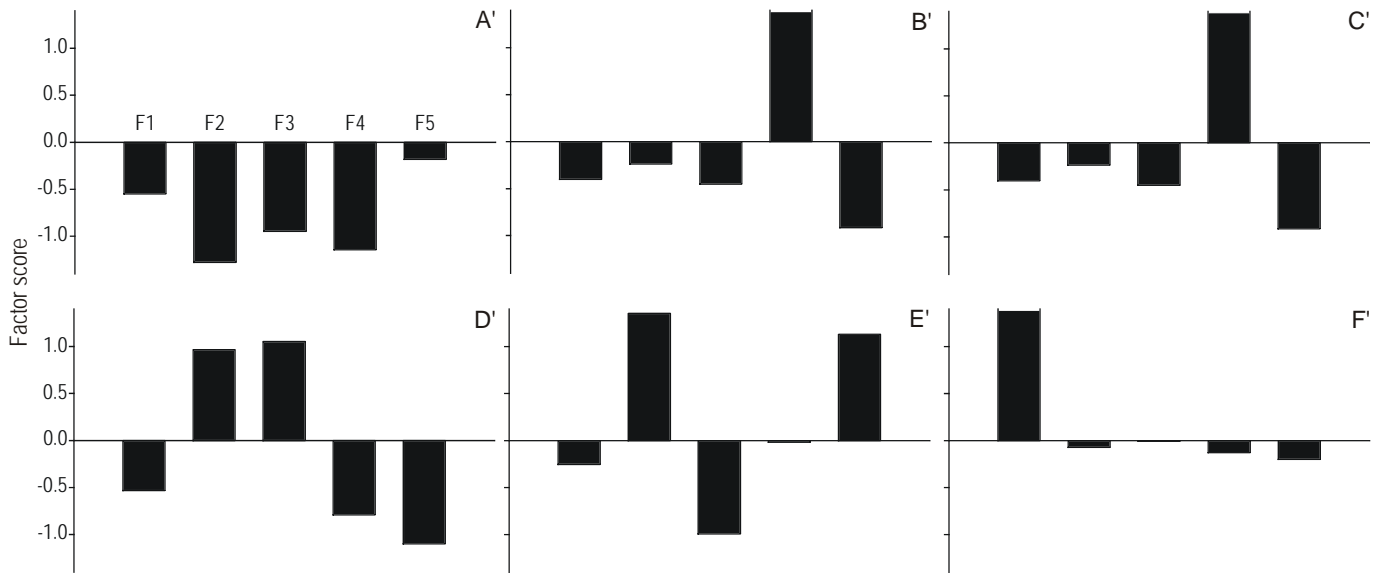


Figura 2. Contribución de los factores estimados para cada uno de los seis casos de la fase II (A', B', C', D', E' y F') al centroide de todos los casos para los datos originales.

Figure 2. Factor scores estimated for each of the six Phase II cases (A', B', C', D', E' and F') relative to the centroid of all cases from the original data.

esperaban. La presencia de algunos factores de confusión a la hora de interpretar los resultados de la Fase I se evitó en la Fase II. Tras el segundo ejercicio la variabilidad interlaboratorio disminuyó hasta encontrarse en rangos similares a los de estudios previos. La homogeneidad de los protocolos para asegurar la compatibilidad de los resultados obtenidos por los diferentes operadores indica que los bioensayos sobre sedimento parecen recomendables. Si los resultados van a ser utilizados con fines de regulación ambiental, el personal debería estar convenientemente formado y sería recomendable su participación en ejercicios y cursos de evaluación continuada, lo que permitiría la evaluación de la variabilidad inter e intralaboratorio para cada uno de los bioensayos que se utilizan en la gestión del material de dragado en España.

Es difícil interpretar los resultados de los ensayos de toxicidad con relación a los resultados de contaminación y otros factores fisicoquímicos del sedimento. La conclusión más convincente sería la de relacionar estadísticamente los resultados de toxicidad con concentraciones de contaminantes específicos o con determinados grupos de contaminantes. Según los resultados del análisis multivariante parece de especial interés la correlación con altos pesos para el Hg, los PCBs y el contenido en materia orgánica del sedimento identificada en el factor 4, que también explica parte de los efectos tóxicos registrados en el ensayo Microtox®. Si suponemos que estas tres variables normalmente registran valores altos en sedimentos de puertos y áreas urbanas, principalmente relacionados con el vertido de residuos sin depurar, el Microtox® parece recomendable para la evaluación inicial de la toxicidad de sedimentos provenientes de este tipo de zonas.

La batería de efectos tóxicos medidos no se relaciona con las mismas especies de contaminantes. Además la toxicidad

and is related to the toxic effects measured by half of the laboratories that reported results for the Microtox® bioassay. On the other hand, factor 5 groups the effect of the Ni concentration and the toxic effects registered by the sea urchin embryos. Some contribution to the decrease in luminescence was also identified.

Even though the Phase II results are similar to those reported in Phase I, the reproducibility of the toxic responses in Phase II seems more conservative, especially for the new Microtox® BSPT protocol. The multivariate analysis identified a strong relationship between Hg, PCBs and the organic matter content of the sediment in factor 4 that also explains part of the toxic effects. On the other hand, the contribution of some metallic compounds to the toxic response registered in the sea urchin embryo assay, such as those of As, Cr, Pb and Zn, appeared in both phases, though Hg and Ni were also identified in Phase II.

Discussion

The results of the interlaboratory comparison for the Microtox® and amphipod bioassays are satisfactory according to the development conditions and especially to the particular circumstances for each laboratory. The bioassay using clams did not produce satisfactory results because of the small number of laboratories that could be included in the study, though it is feasible for sediment toxicity assessment and further development is required for its use in relation to dredged material management. Moreover, the sensitivity of this organism is lower than that observed for the amphipods, the latter proving far more suitable for dredged material quality assessment. The interlaboratory study was repeated for the

Tabla 4. Peso de los tres factores principales para cada una de las 27 variables. Sólo aquellos pesos superiores a 0.25 están incluidos. Las medidas de toxicidad son A# = 100/EC50 SPT, B# = 100/EC50 BSPT, C# = % de larvas anormalmente desarrolladas; # son los códigos asignados previamente a cada laboratorio.

Table 4. Sorted rotated factor loadings of 27 variables in the five principal factors. Only loadings greater than 0.25 are included. Toxicity endpoints are A# = 100/EC50 SPT, B# = 100/EC50 BSPT, and C# = percent of abnormal sea urchin larvae; # indicates the code number assigned to each laboratory.

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
% sand	-0.348	-0.900	-	-	-
% fine sediment	-	0.952	-	-	-
OM	0.601	0.428	-	0.592	-0.312
As	-	0.379	0.892	-	-
Cd	0.680	-0.458	0.405	-	-0.348
Cr	0.337	0.788	-0.321	-	0.331
Cu	-	-	0.969	-	-
Hg	-	0.538	-	0.795	-
Ni	-	-	0.388	0.292	0.874
Pb	0.621	-	0.772	-	-
Zn	-	-	0.971	-	-
Σ_7 -PCBs	0.825	-	-0.329	0.402	-
Σ_{16} -PAHs	0.969	-	-	-	-
A1	0.970	-	-	-	-
A2	0.986	-	-	-	-
A3	0.879	-	-	0.395	-
A4	-	-	-	0.957	-
A5	0.679	-	0.420	0.429	0.408
A6	0.983	-	-	-	-
A7	0.353	0.271	-	0.709	0.519
B1	0.988	-	-	-	-
B2	0.984	-	-	-	-
B3	0.966	-	-	-	-
C1	-	0.801	0.338	-0.297	0.366
C2	-	0.605	-0.369	-	0.701
C3	0.473	0.337	-	-	0.784
C4	0.554	0.671	-0.263	-	0.403

para cada una de las especies y las medidas registradas no siguen las mismas tendencias en todos los casos (tabla 5) y estas diferencias se pueden también identificar mediante el análisis multivariante de los resultados. Se recomienda una batería de ensayos que incluya distintas medidas y distintos medios de exposición para proteger de modo efectivo todos los compartimentos ambientales. En este sentido y de acuerdo con los resultados de este ejercicio, una batería que incluya el ensayo Microtox[®], el bioensayo con anfipodos desarrollado sobre la fase sólida y el ensayo de desarrollo larvario con embriones de erizo de mar sobre los lixiviados de los sedimentos, parece ser adecuada para la gestión de la toxicidad de sedimentos de dragado. Las distintas especies que se usaron han mostrado resultados satisfactorios si los criterios de

bioassays using sea urchin larvae and Microtox[®] since the results were not satisfactory. Some interfering factors may have critically influenced the results during Phase I and were thus avoided during Phase II, after which the interlaboratory variability decreased and was in the range of previously reported studies. The state of homogenization of the protocols to ensure the compatibility of results obtained by different technicians indicates that sediment bioassays are suitable tools, but if they are intended for use in a regulatory context, the staff should be trained and the validity of the test results should be certified through periodic exercises to evaluate inter- and intra-laboratory variability.

It is difficult to interpret toxicity tests and to relate the results to the mixture of potential environmental contaminants

Tabla 5. Caracterización de los materiales de dragado según la comparación de los resultados químicos con las guías de calidad de sedimento para la caracterización de material de dragado (CEDEX, 1994) y comparada con la caracterización de la toxicidad mediante ensayos de toxicidad en el laboratorio. **Table 5.** Dredged material characterization based on the comparison of the chemical results with the traditional sediment quality guidelines for dredged material characterization (CEDEX 1994) and compared with the toxicity characterization by laboratory toxicity tests.

Sample	Category	Chemicals of concern	Microtox® SPT	Microtox® BSPT	Bioassay using amphipods	Bioassay using juvenile bivalves	Bioassay using sea urchin embryos
A	I	–	Not toxic	–	Not toxic	Not toxic	Toxic
B	III	PCBs	Toxic	–	Toxic	Not toxic	Toxic
C	III	As and Cu	Toxic	–	Toxic	Toxic	Toxic
D	III	PCBs and high PAHs	Toxic	–	Toxic	Not toxic	Not toxic
E	III	Cu, Hg and PCBs	Toxic	–	Toxic	Moderately toxic	Moderately toxic
F	III	Cd, Cu, Hg and PCBs	Toxic	–	Toxic	Moderately toxic	Moderately toxic
A'	I	–	Not toxic	Not toxic	–	–	Not toxic
B'	III	PCBs	Toxic	Toxic	–	–	Not toxic
C'	III	As, Cd, Cu and Ni	Toxic	Toxic	–	–	Toxic
D'	III	As, Cd and Cu	Toxic	Toxic	–	–	Toxic
E'	III	PCBs high PAHs	Toxic	Toxic	–	–	Toxic
F'	III	PCBs and high PAHs	Toxic	Toxic	–	–	Toxic

toxicidad se refieren a los resultados de un control de toxicidad negativo y si se utilizan técnicas estadísticas adecuadas para identificar diferencias en las respuestas. La selección de las especies para cada caso de estudio debe hacerse de acuerdo a las circunstancias particulares, pero siempre que se pueda asegurar que los resultados pueden ser utilizados para la toma de decisiones. Las agencias españolas a utilizar los resultados de los ensayos deberían ser las encargadas de decidir los criterios de aceptabilidad.

Finalmente, y de acuerdo con los resultados obtenidos para contaminantes bioacumulables no asociados a ninguno de los efectos agudos medidos, debería recomendarse para el futuro ensayos nuevos y específicos para evaluar la bioacumulación y sus efectos potenciales en el ambiente y en la salud humana, especialmente para contaminantes especialmente dañinos como por ejemplo las dioxinas o los PAHs. En resumen, esta es la primera iniciativa española para la evaluación interlaboratorio de ensayos de toxicidad con muestras de dragados portuarios. En cualquier caso los resultados no son definitivos ya que los ensayos deberían someterse a ejercicios periódicos que ayudasen a la mejora continua de los protocolos y a asegurar que los resultados de los laboratorios cumplen ciertos requisitos de calidad.

Agradecimientos

Este estudio se realizó como parte de un proyecto conjunto entre el CEDEX y la Universidad de Cádiz. Parte del trabajo fue financiado por el Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (REN2002_01699/TECNO). MC Casado-Martínez agradece la financiación mediante una beca del programa Nacional de Formación de Personal Investigador al Ministerio de Educación y Ciencia. Nuestro agradecimiento a A. Luque por sus comentarios durante la preparación del manuscrito final.

and natural physicochemical factors. The most convincing results would be those that are based on demonstrating a significant relationship between multiple measures of toxicity and specific contaminants or groups of contaminants. The strong relationship between Hg, PCBs and the organic matter identified by the multivariate analysis in factor 4, which also explains part of the toxic effects registered by the Microtox®, is of special concern. Since high values of these three variables are expected in commercial ports and urban areas, principally due to untreated urban waste and the routine activities of ports and waterways, the Microtox® bioassay seems suitable for screening sediment toxicity in these types of zones.

The whole battery of toxic effects measured was not related to the same set of contaminants. Moreover, the toxicity measured for each test species and the endpoints do not follow the same patterns in all cases (table 5); these differences are also identified by means of multivariate statistical techniques. A battery of tests that includes different endpoints through different exposure routes and modes of action is recommended to effectively protect the environment. A battery that includes the Microtox® screening test, the bioassay using amphipods developed on the whole sediment and the bioassay using sea urchin larvae developed on the elutriate is suitable for this particular objective based on the results obtained in this study. The different species reported satisfactory results if the toxicity criteria are related to a control or reference sediment, using proper statistical analyses to elucidate significant differences. Test species for a particular case study should be selected according to each particular circumstance but always ensuring that the results can be used in a regulatory context. The Spanish agencies that will be the final users of the test results should decide the acceptability criteria for these techniques.

Based on our results concerning contaminants not clearly associated with the acute endpoints and possibly bioaccumulated early, new specific tests should be incorporated to

Referencias

- Casado-Martínez MC, Buceta JL, Forja JM, DelValls TA. 2006a. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. I. Exercise description and sediment quality. *Cienc. Mar.* (this issue).
- Casado-Martínez MC, Campisi T, Díaz A, Lo Re R, Obispo R, Postma JF, Riba I, Sneekes AC, Buceta JL, DelValls TA. 2006b. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment. *Cienc. Mar.* (this issue).
- Casado-Martínez MC, Beiras R, Belzunce MJ, González-Castromil MA, Marín-Guirao L, Postma JF, Riba I, DelValls TA. 2006c. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV. Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods. *Cienc. Mar.* (this issue).
- Casado-Martínez MC, Blasco J, González-Castromil MA, Riba I, DelValls TA. 2006d. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. V. Whole sediment toxicity test using juveniles of the bivalve *Ruditapes philipinarum* (Reeves 1864). *Cienc. Mar.* (this issue).
- Casado-Martínez MC, Fernández N, Lloret J, Marín L, Martínez-Gómez C, Riba I, Saco-Álvarez L, DelValls TA. 2006e. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. III. Bioassay using embryos of the marine sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Cienc. Mar.* (this issue).
- CEDEX. 1994. Recomendaciones para la gestión del material de dragado en los puertos españoles. Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, Puertos del Estado, Madrid.
- properly address environmental and human health issues. In summary, this is the first initiative in Spain to include bioassays for regulatory purposes; however, the outcome is not definitive and continuous improvements are recommended to ensure the good quality of results.

Acknowledgements

This study was conducted under a joint research project between CEDEX and the University of Cádiz. The Spanish Ministry of Science and Technology (REN2002_01699/TECNO) supported part of the work. The first author was supported by a grant (FPI) from the Spanish Ministry of Education and Science.

DelValls TA, Chapman PM. 1998. Site-specific sediment quality values for the Gulf of Cádiz (Spain) and San Francisco Bay (USA), using the sediment quality triad and multivariate analysis. *Cienc. Mar.* 24(3): 313–336.

Riba I, Zitko V, Forja JM, DelValls TA. 2003. Deriving sediment quality guidelines in the Guadalquivir Estuary associated with the Aznalcóllar mining spill: A comparison of different approaches. *Cienc. Mar.* 29: 261–274.

*Recibido en noviembre de 2004;
aceptado en septiembre de 2005.*