

Nota de Investigación/Research Note

Ejercicio interlaboratorio con bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros. III. Bioensayo con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*

Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. III. Bioassay using embryos of the sea urchin *Paracentrotus lividus*

MC Casado-Martínez^{1*}, N Fernández¹, J Lloret², A Marín³, C Martínez-Gómez⁴,
I Riba⁵, R Beiras⁶, L Saco-Álvarez⁶, TA DelValls¹

¹ 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.es

² Servicio de Cultivo Celulares, SACE, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

³ Departamento de Ecología e Hidrología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, España

⁴ Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Murcia, Varadero, I. Lo Pagán, 30740 San Pedro del Pinatar (Murcia), España

⁵ Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España

⁶ Laboratorio de Ecoloxía Mariña, Universidade de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende, E-36200, Vigo, España

Resumen

El presente trabajo resume los resultados del ejercicio realizado para estudiar la variabilidad interlaboratorio del ensayo con estadios larvarios del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Este ejercicio, que se desarrolló en dos fases distintas, incluyó cuatro laboratorios cada uno de los cuales estudió la toxicidad de las seis muestras de sedimento distribuidas. Las muestras, provenientes de distintos puertos de la costa española, se caracterizaron mediante la exposición de embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus* durante 48 h a los lixiviados de los sedimentos. La Fase I se utilizó para rediseñar las condiciones del ensayo y evitar posibles factores de confusión al interpretar los resultados. Los resultados de la Fase II fueron más homogéneos al clasificar las muestras según la toxicidad registrada, a pesar de la variabilidad en los protocolos de obtención y ensayo de los lixiviados. De acuerdo con estos resultados, el ensayo es adecuado para la caracterización de este tipo de muestras con una variabilidad interlaboratorio similar a la encontrada para otros bioensayos en estudios interlaboratorio previos.

Palabras clave: material de dragado, toxicidad embrionaria, ecotoxicología, lixiviados.

Abstract

The present paper reports the results of an interlaboratory variability study of a bioassay using larval stages of the marine sea urchin *Paracentrotus lividus*. This exercise was developed in two different phases and included four laboratories, each of which determined the toxicity of six sediment samples. The samples were collected from different Spanish ports and were characterized by exposing sea urchin embryos for 48 h to sediment elutriates. Phase I was used to redesign test parameters and to avoid possible interfering factors when interpreting test results. Laboratories were more homogeneous in the classification of sediments according to the toxic responses in Phase II despite the high variability of the elutriate testing protocols. Based on our results, the test seems suitable to characterize dredged material, the interlaboratory variability being similar to that found for other bioassays in previous studies.

Key words: dredged material, embryo toxicity, ecotoxicology, elutriates.

Introducción

Los bioensayos con estadios embrionarios y larvarios de invertebrados marinos han sido frecuentemente utilizados para evaluar la calidad ambiental de muestras de sedimentos (Carr 1996; DelValls *et al.* 1998; Beiras *et al.* 2001, 2003a, 2003b; Mariño-Balsa *et al.* 2003), así como la toxicidad de contaminantes concretos (Fernández y Beiras 2001, Cesar *et*

Introduction

Bioassays using marine invertebrate embryos and larvae have been widely used to evaluate environmental quality (Carr 1996; DelValls *et al.* 1998; Beiras *et al.* 2001, 2003a, 2003b; Mariño-Balsa *et al.* 2003) and the toxicity of contaminants (Fernández and Beiras 2001, César *et al.* 2002). Moreover, they have been considered a rapid and sensitive tool to

al. 2002), y son considerados un método rápido y sensible para la caracterización de la toxicidad de sedimentos marinos. Entre los biossayos embrio-larvarios más utilizados se encuentran los realizados con ostras (*Crassostrea gigas*) y con erizos de mar (*Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *S. droebachiensis*, *Dendraster excentricus* o *Arbacia punctulata*). Estas especies son abundantes y se encuentran distribuidas a lo largo de las costas españolas, generalmente son fáciles de recoger y pueden ser mantenidas fácilmente en el laboratorio. La obtención de gametos y su fecundación *in vitro* son relativamente simples y, debido a la rapidez con que se completa el desarrollo embrionario, pueden obtenerse resultados en un corto periodo de tiempo. Desde que el erizo de mar fue utilizado por primera vez en 1951 por Wilson, se han desarrollado numerosas investigaciones para la estandarización de protocolos y para evitar los diferentes factores de confusión que pueden interferir en los resultados y su interpretación. Hoy en día existen distintos protocolos estándar (SOPs) para la evaluación de la toxicidad de lixiviados de sedimentos con distintas especies, entre ellos cabe citar el USEPA (1995) para *S. purpuratus* y *S. droebachiensis*, RIKZ (1999) para *C. gigas* y el de la ASTM (1995) para *A. punctulata*, *S. droebachiensis*, *S. purpuratus* y *D. excentricus*.

Para este ejercicio interlaboratorio se distribuyó a cada laboratorio participante un protocolo obtenido de acuerdo con los distintos estándares disponibles. Los principales factores que podían contribuir a la variabilidad interlaboratorio incluían el distinto origen de los organismos (y por lo tanto distinto estado de desarrollo gonadal, distinta aclimatación y manipulación) y la introducción de variantes durante el proceso de obtención de los lixiviados. Otras fuentes de variabilidad importantes están relacionadas al contenido en sulfuros o material en suspensión de los lixiviados (Fernández 2002). El objetivo de este trabajo fue evaluar la habilidad de los diferentes laboratorios para caracterizar materiales de dragado mediante el ensayo con el desarrollo embrionario de erizos de mar, y evaluar las diferencias obtenidas entre los resultados de cada laboratorio.

Material y métodos

Fase I

El primer ejercicio de intercalibración se llevó a cabo en 2003. En esta primera fase se evaluó la toxicidad de seis muestras de sedimento provenientes de distintas zonas de la costa española (Casado-Martínez *et al.* 2006). Para la obtención de los lixiviados se recomendó la siguiente modificación del método USEPA (1998): los sedimentos previamente homogeneizados debían mezclarse con agua de mar control en una proporción 1:4 v/v (sedimento:agua) y mantenerse en agitación rotatoria durante 30 min a 20°C. Se recomendó un tiempo de decantación de 12 h transcurrido el cual se retiraría el sobrenadante sin remover el sedimento del fondo.

characterize marine sediment toxicity. The most common bioassays are those using the oyster *Crassostrea gigas* and the sea urchins *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *S. droebachiensis*, *Dendraster excentricus* and *Arbacia punctulata*. These species are abundant and widely distributed along the coast of Spain, they are easy to collect and can be maintained in the laboratory for long periods of time. Gametes and fecundation are easy to obtain and since the embryo develops rapidly the larval phase can be completed in a short period. The sea urchin test was first used in 1951 and since then much research has been conducted to standardize the protocol and to avoid the different interfering factors affecting data interpretation. Diverse standard operational procedures (SOPs) to assess sediment elutriate toxicity using different species are available from several agencies, among them those of USEPA (1995) for *S. purpuratus* and *S. droebachiensis*, of RIKZ (1999) for *C. gigas*, and of ASTM (1995) for *A. punctulata*, *S. droebachiensis*, *S. purpuratus* and *D. excentricus*.

A protocol based on available SOPs was sent to the laboratories participating in this exercise even if all of them had previous experience using this test. Variability factors, discussed further in the results section, included different batches of organisms (different gonad development, acclimation and handling) and different elutriation procedures. Other important sources of variability were the possible seasonal viability of eggs and the presence of hydrogen sulphide or suspended solids in elutriates (Fernández 2002). The main objective was to evaluate the ability of the different laboratories to characterize dredged materials as toxic or not toxic and to determine interlaboratory variability.

Material and methods

Phase I

The first phase of the study was developed in 2003. Six sediment samples from Spanish ports were sent to each laboratory (Casado-Martínez *et al.* 2006). A modification of the USEPA (1998) method was recommended to obtain the elutriates: previously homogenized sediments were mixed with clean seawater at a ratio of 1:4 v/v (sediment:water) for 30 min at approximately 20°C. A settling period of 12 h was recommended before the overlying water was siphoned.

Embryos were obtained from a couple of mature organisms of the species *P. lividus*, collected from sites where the laboratories were located. Gametes were obtained either by dissecting the organisms and extracting them directly with a pipette or by osmotic shock (using 1 mL KCl 0.5 N). Eggs were maintained in seawater, while sperm was kept dry and refrigerated until being used. Less than 30 min after obtaining the gametes, optimal eggs were mixed with a few microlitres of sperm in a measuring cylinder with control seawater. After gently stirring the suspension to facilitate fecundation, which was completed in a few minutes, the density and percentage of

Los embriones utilizados para las pruebas provenían de una sola pareja de organismos maduros de *P. lividus*, recogidos *in situ* en la localidad correspondiente a cada laboratorio. Los gametos se obtuvieron o bien provocando la puesta por choque osmótico (inyectando 1 mL de KCl 0.5 M) o mediante la disección de los organismos y la extracción directa de los gametos. Los huevos se mantuvieron en agua de mar control mientras que el espermatozoos se conservó en seco y en frío hasta el momento de su uso. Treinta minutos o menos después de la obtención de los gametos se realizó la fecundación *in vitro* añadiendo unos microlitros de espermatozoos a la suspensión de huevos en agua de mar control. Tras una agitación suave para facilitar la fecundación, que ocurre en pocos minutos, se estimaron la densidad y el porcentaje de fecundación (indicado por la presencia de la membrana de fecundación característica) en al menos tres muestras y se tomó el valor medio. Una vez conseguida la fecundación, se introdujeron 20–30 embriones mL⁻¹ en los recipientes de incubación conteniendo los lixiviados. Se recomendó un mínimo de cuatro réplicas por cada uno de los lixiviados, más una serie control conteniendo agua de mar como matriz. Este control negativo de toxicidad permite evaluar la calidad del agua utilizada para la obtención de los lixiviados así como la idoneidad del material biológico, evitando falsos positivos. Pasadas 48 h de incubación a 20°C y oscuridad, las muestras se fijaron con unas gotas de formaldehído al 40%. La respuesta biológica estudiada fue el éxito en la embriogénesis tras el periodo de incubación, medido como porcentaje de larvas pluteus normales (que presentaron los cuatro brazos bien desarrollados). Esta respuesta fue observada en cada réplica de 100 individuos. Los parámetros y condiciones para el desarrollo del ensayo se recogen en la tabla 1.

Fase II

El segundo ejercicio se realizó en 2004. El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo estándar proporcionado para la Fase I, con algunas modificaciones encaminadas a mejorar la homogeneidad metodológica en base a los resultados obtenidos durante la fase previa. Se recomendó la aireación de los lixiviados antes de la incubación de los organismos, con el objetivo de eliminar falsos positivos causados por la presencia de sulfuro o amonio en las muestras.

Análisis de los resultados

Las diferencias significativas entre las respuestas a los distintos lixiviados se determinaron mediante ANOVA y el test de Tukey. Previamente se comprobó la homocedasticidad de los datos aplicando el test de Levene. Estos análisis se realizaron con el software estadístico SPSS 11.5. Para estudiar la variabilidad interlaboratorio se utilizó el coeficiente de la varianza (CV) calculado como el cociente entre la desviación estándar (SD) y la media de todos los laboratorios (X):

$$CV (\%) = \frac{SD}{X} \cdot 100$$

fecundación (presence of the fertilization membrane) were observed in at least three samples.

Once fecundation was successfully completed, embryos were introduced in 20-mL vials with the sediment elutriates at 20°C at a density of 20–30 embryos mL⁻¹. A minimum of four replicates were used per sample and a negative toxicity control consisting of clean seawater (the same used to obtain the elutriates) was tested in parallel with the samples to evaluate the seawater quality and biological material and to avoid any false positive response. After 48 h at 20°C and darkness, the samples were fixed with two drops of 40% formaldehyde. Laboratories were asked to report the success of embryogenesis after the incubation period, calculated as the percentage of normal pluteus (defined as those with four well-developed arms). For this endpoint, 100 organisms were studied per replicate. Test parameters and conditions are summarized in table 1.

Phase II

A second set of sediment samples was distributed in 2004 (Casado-Martínez *et al.* 2006). The tests followed the protocol used in Phase I, though some modifications were recommended after considering the Phase I results to homogenize the methodology among laboratories. Aerating the elutriates prior to the introduction of embryos was recommended to avoid false positive responses caused by the presence of ammonia or sulphide.

Data analysis

An ANOVA and Tukey's test were used to establish differences among the responses. Levene's test was used to ensure normality and homogeneity of the data. The SPSS 11.5 software was used to develop these tests. To study interlaboratory variation, the coefficient of variation (CV) was calculated by dividing the standard deviation (SD) by the mean of the laboratories (X):

$$CV (\%) = \frac{SD}{X} \cdot 100$$

Results

The days elapsed from receiving the sediments to performing the tests in each of the participating laboratories in both phases of the exercise are summarized in table 2. Five laboratories already trained in this bioassay using sea urchin embryos were asked to participate in Phase I, whereas four laboratories participated in the Phase II of this study. Phase I was successfully completed by all laboratories in less than one month after sediment sampling (USEPA 1994), so differences due to time storage were not expected. Phase II was successfully developed by all laboratories in a few days following sediment sampling, except for laboratory 4 that performed the assay after three months due to logistic problems.

Tabla 1. Parámetros y condiciones para el desarrollo del bioensayo con embriones de erizo de mar recomendados a los laboratorios para la realización de este ejercicio.

Table 1. Parameters and conditions to develop the test using sea urchin embryos in the laboratory.

Parameters	Conditions
Type of test	On elutriate; static
Temperature	20°C
Salinity	30–40
Photoperiod	16:8 h light:dark or darkness
Test chambers	20 mL
Water renewal	None
Density in test chamber	20–30 embryo mL ⁻¹
Number of replicates	4
Aeration	Soft for 5 min before introducing the embryos
Water quality	Temperature, salinity, pH and dissolved oxygen
Test duration	48 h
Endpoints	Embryo success (percentage of normal pluteus larvae)
Number of measures per replicate	100
Test acceptability	90% normal larvae in controls

Resultados

En la tabla 2 se muestran los laboratorios participantes y los días transcurridos desde la recepción de las muestras hasta que se desarrollaron ambas fases del estudio. El ejercicio contó con cinco participantes para la Fase I y cuatro para la Fase II con la estructura necesaria para realizar el bioensayo. Todos ellos finalizaron la primera fase en menos de un mes desde la recepción de los sedimentos (USEPA 1994) y por lo tanto no se esperan diferencias debidas a distintos tiempos de almacenamiento de los sedimentos. Para la Fase II del estudio todos los laboratorios iniciaron el ensayo en menos de tres días desde la recepción de las muestras, excepto el laboratorio 4 que realizó el ensayo después de tres meses de almacenaje de los sedimentos debido a problemas logísticos.

Los resultados de la Fase I se resumen en la tabla 3. Aunque se envió un protocolo con las muestras de sedimento, se encontraron diferencias importantes en las condiciones de ensayo de los distintos laboratorios: en algunos laboratorios los lixiviados se airearon antes de introducir los organismos y/o se filtraron después de la decantación. Todos los factores que podían introducir variabilidad en los resultados fueron estudiados antes de la preparación de la serie de muestras enviadas en la Fase II. Otro factor a tener en cuenta es el resultado de los controles de toxicidad negativos en tres de los laboratorios (marcados con un asterisco en la tabla) ya que no cumplían los criterios de aceptabilidad del ensayo al no obtenerse el porcentaje mínimo de larvas normales del 90%. Esto puede estar indicando una baja calidad del agua o del material biológico detectándose una toxicidad espuria.

Otros factores de confusión importantes son los relacionados con la obtención del lixiviado, como por ejemplo el uso de

Phase I results are summarized in table 3. Even though a protocol was sent with the sediment samples, important differences were reported by the laboratories: some laboratories aerated the elutriates and/or filtered them after settling. All factors were studied before the next sediment samples were sent out with the new protocol in Phase II. Another important factor was the percentage of normal pluteus registered by three laboratories (marked with an asterisk in table 3) for the negative toxicity control since they did not meet the acceptance criterion of 90% normal pluteus. Low fertility values in the controls can be due to poor seawater quality or poor quality of the biological material.

The use of different methods during elutriation, such as employing magnetic stirrers instead of vortex methods or increasing the settling time, may also have caused variability in the results because they can affect the test sensibility by

Tabla 2. Tiempo transcurrido desde la recepción de los sedimentos hasta el desarrollo del bioensayo, en cada uno de los laboratorios participantes en ambas fases del ejercicio. La fecha de ensayo se ha contado desde el día de muestreo de los sedimentos.

Table 2. Time elapsed since the reception of sediments until developing the bioassay at each participating laboratory for both phases of the exercise. Test date is counted from the day of sediment sampling.

Laboratory	Test date Phase I	Test date Phase II
1	1 day	5 days
2	28 days	8 days
3	27 days	8 days
4	8 days	90 days
5	15 days	

Tabla 3. Precisión interlaboratorio de los resultados de mortalidad media del bioensayo de toxicidad con embriones de erizo de mar para la primera fase del ejercicio. n.a. significa dato no disponible.**Table 3.** Interlaboratory precision of the mean percentage of normal pluteus from sediment toxicity tests using sea urchin embryos during Phase I; n.a. = not available, X = mean, SD = standard deviation and CV = coefficient of variation.

Laboratory	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E	Sample F	Control
1	n.a.	85.2	3.8	96.4	n.a.	n.a.	96.8
2	0.0	0.0	14.7	45.0	50.3	43.7	76.7*
3	68.5	80.0	17.8	89.5	64.6	0.0	81.5*
4	16.5	5.6	0.0	92.0	93.0	94.5	93.8
5	34.5	12.0	10.8	86.6	76.0	87.0	84.7*
X	29.9	36.6	9.4	81.9	71.0	56.3	86.7
SD	29.4	42.3	7.4	20.9	18.0	43.7	8.4
CV %	98.3	116.0	78.8	25.6	25.4	77.7	9.73

* Controls not meeting the acceptance criterion

agitadores magnéticos en lugar del método del volteo, o el aumento del tiempo de decantación de la mezcla. Estos factores pueden influir en el resultado y la sensibilidad del ensayo ya que afectan directamente a la movilidad de los distintos contaminantes desde el sedimento a la fase líquida. Un factor relacionado con éstos es la aireación de la muestra. En este sentido se ha registrado una extremadamente alta inhibición en el desarrollo embrionario con la muestra A, con niveles de contaminación, aunque muy bajos, según los resultados de los análisis químicos (Casado-Martínez *et al.* 2006) y que podrían estar directamente relacionados con la presencia de sulfuro de hidrógeno. Esta sustancia, presente de forma natural en los sedimentos anóxicos y cuya concentración puede aumentar durante el almacenamiento de la muestra, puede producir resultados de toxicidad elevada para el ensayo con embriones del erizo de mar que pueden ser atribuidos erróneamente a la presencia de contaminantes en el sedimento (Lapota *et al.* 2000). En este sentido, al parecer, las muestras que han podido verse afectadas por este factor son las correspondientes al puerto de Cádiz (muestras A y B) con una gran variabilidad en el porcentaje de larvas normales y en la clasificación de las muestras. El CV medio para la Fase I fue de 61%, con valores comprendidos entre 9.7% para el control de toxicidad negativo y 115% para la muestra B. Las muestras D y E, no tóxicas, obtuvieron los CV más bajos, de 25.6% y 25.4% respectivamente.

Todos los factores que podían introducir variabilidad en los resultados fueron estudiados antes de la preparación de la serie de muestras enviadas en la Fase II. Para ésta se envió de nuevo un conjunto de muestras a cada uno de los laboratorios participantes, con un protocolo más detallado e instrucciones para evitar los factores de confusión encontrados en la Fase I. Los resultados de la Fase II se incluyen en la tabla 4 como porcentaje de pluteus normales (corregidos por el porcentaje de larvas normales en el control) así como X, SD y CV para cada muestra. Los resultados se representan en la figura 1 conjuntamente con el criterio para clasificar las muestras como

changing the mobility of contaminants to the liquid phase. A related factor is sample aeration, which can also be a critical step. High toxic effects were registered for sample A that had low chemical contamination (Casado-Martínez *et al.* 2006), possibly related to hydrogen sulphide. This compound, which is naturally present in anoxic sediments and can increase during sample storage, is very toxic for sea urchin embryos, and this toxicity can be falsely attributed to the sample itself (Lapota *et al.* 2000). The samples that could be affected by this factor are those from the port of Cádiz, samples A and B, which reported very variable results. Mean CV for Phase I was 61%, with values ranging from 9.7% for the negative toxicity control to 115% for sample B. Samples D and E, clearly not toxic, had the lowest CV, 25.6% and 25.4%, respectively.

All factors that could be identified were studied before Phase II was organized. A new set of samples was sent to each participating laboratory, including a detailed protocol and special guidelines to avoid interfering factors found during Phase I. The results are presented in table 4 as the percentage of normal pluteus corrected by the corresponding control and the X, SD and CV calculated for each sample. Figure 1 shows the results together with the toxicity criterion (decrease in percentage of normal pluteus higher than 20%) established based on previous results (DelValls *et al.* 2003). Except for the results reported by laboratory 3, which found higher toxicity for all the samples including the one with the lower chemical content, the laboratories reported more homogenous results than those for Phase I: all laboratories classified sample E' as highly toxic (for which high levels of organic compounds have been reported; Casado-Martínez *et al.* 2006), and samples A' (except for laboratory 3) and B' as not toxic. Samples C', D' and F' were classified as toxic by all laboratories, except for sample F' by laboratory 2, even though the percentages of normal pluteus varied greatly; thus, the selection of other toxicity criteria could introduce differences in sample classification. This variability in the percentage of normal pluteus was also found for the CV, which ranged from 12% to

Tabla 4. Porcentaje medio de éxito en la embriogénesis obtenido por los distintos laboratorios en los lixiviados de las muestras evaluadas durante la segunda fase del ensayo. X es la gran media, SD la desviación estándar y CV el coeficiente de variación en porcentaje.

Table 4. Mean percentage of normal pluteus for each laboratory and each sample of Phase II; X = grand mean, SD = standard deviation and CV = coefficient of variation.

Laboratory	Sample A'	Sample B'	Sample C'	Sample D'	Sample E'	Sample F'	Control
1	82	87	60	36	1	7	98
2	91	96	78	79	24	92	96
3	53	71	9	11	0	47	98
4	93	91	19	70	0	70	97
X	79.6	86.3	41.5	49.0	6.25	54.0	97.3
SD	18.5	10.8	32.9	31.4	11.8	36.3	0.96
CV	23.2	12.5	79.2	64.0	189	67.3	0.98
X ^a	88.7	91.3	52.3	61.7	8.3	56.3	97.0
SD ^a	5.9	4.5	30.2	22.7	13.6	44.1	1.0
CV ^a %	6.6	4.9	57.8	36.8	162.9	78.3	1.0

^a Calculated excluding data from laboratory 3

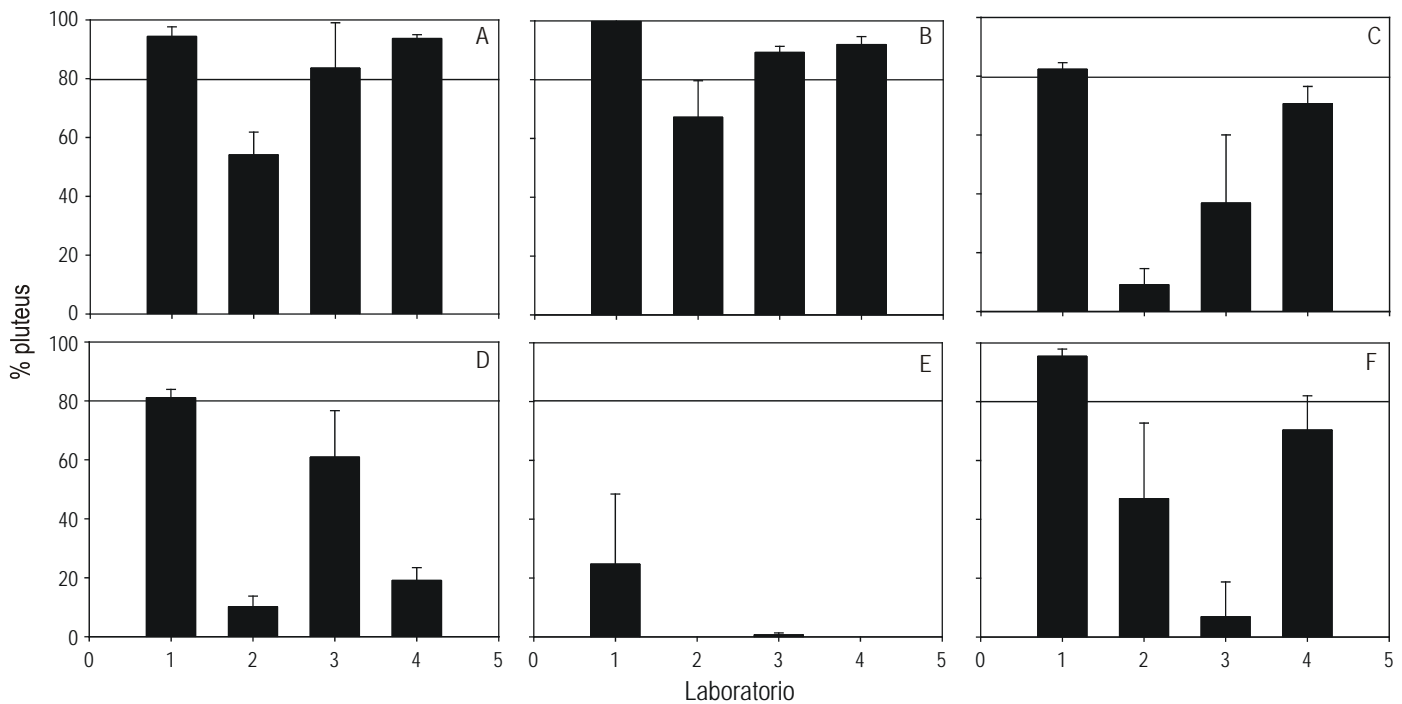


Figura 1. Resultados en porcentaje medio de pluteus normalmente desarrolladas para cada laboratorio y cada una de las muestras (nombradas de A a F). El 80% marca el umbral de toxicidad.

Figure 1. Mean percentage of normal pluteus for each laboratory and each of the samples (named A to F); 80% indicates the toxicity threshold.

tóxicas o no tóxicas (reducción del porcentaje de larvas pluteus normales superior a 20% respecto al control) establecido en base a resultados previos (DeIvalls *et al.* 2003). Excepto los resultados del laboratorio 3, en donde se encontraron niveles de toxicidad superiores en todas las muestras incluida la de menor contaminación, los de los otros tres laboratorios son más homogéneos que los obtenidos en la Fase I: todos los laboratorios consideraron la muestra E' (con niveles altos de compuestos de tipo orgánico; Casado-Martínez *et al.* 2006)

190% in this second phase. In Phase II, the mean percentage of normal pluteus in the controls was 97% and all laboratories met the acceptance criterion, with a CV value lower than 1%. The CV for samples A' and B' was 23% and 12%, respectively, according to the lower toxicity. For samples with intermediate toxicity, CV ranged from 64% to 79% and, as mentioned before, sample E' had the highest CV despite the homogeneous classification. The results of the statistical parameters calculated, excluding laboratory 3 that tended to report higher

altamente tóxica, y las muestras A' (excepto para el laboratorio 3) y B' no tóxicas. El resto de las muestras (C', D' y F') fueron consideradas tóxicas en todos los casos excepto la muestra F' en el laboratorio 2, aunque los porcentajes de larvas normales observados varían mucho entre laboratorios y por lo tanto una variación en el criterio de toxicidad podría hacer variar considerablemente la homogeneidad en la clasificación de las muestras de los laboratorios. Esta variabilidad en los porcentajes de larvas normales observados se refleja en los valores de CV, que varían entre 12% y 190% para esta segunda fase.

En el caso de la Fase II el porcentaje medio de larvas pluteus normales en los controles fue de 97% y en todos los laboratorios se superó el criterio de aceptabilidad del ensayo, con un CV menor a 1%. Para las muestras A' y B' el CV fue de 23% y 12% de acuerdo con la baja toxicidad registrada, las muestras con un grado de toxicidad intermedio obtuvieron CV entre 64% y 79% y, como se ha mencionado anteriormente, la muestra E' obtuvo la mayor variabilidad aunque los resultados sean más semejantes en la clasificación. Los resultados de los parámetros estadísticos calculados excluyendo los resultados del laboratorio 3 que parece evidenciar cierta tendencia anómala a registrar toxicidades superiores que el resto de laboratorios, reflejan una menor variabilidad especialmente para las muestras A', B' y C'.

Discusión

En general, se encontraron pocos laboratorios con infraestructura y un mínimo de experiencia en el desarrollo del ensayo con embriones de erizo de mar para la evaluación de la calidad de lixiviados de sedimentos. La variabilidad interlaboratorio de este ensayo, en estudios precedentes, ha sido de 63% cuando se calibra la EC50 (concentración efectiva que causa una disminución de la respuesta en el 50% de la población), valor similar a los registrados por los análisis químicos (Environment Canada 1992). Los resultados de este estudio son similares y, como en otros estudios, la variabilidad es mucho mayor cuando se ensayan sedimentos contaminados. En Holanda se han incluido dos ensayos para la evaluación de la toxicidad de lixiviados de sedimentos en los estudios de precisión interlaboratorio: el ensayo con embriones de ostra y el ensayo con rotíferos. Mientras el primero de ellos obtuvo CVs entre 34% y 210%, el ensayo con rotíferos fue considerado directamente no aconsejable ya que los resultados demostraron que era fundamental la experiencia previa para el desarrollo del ensayo (Stronkhorst 2003).


En nuestro estudio, el criterio para considerar las muestras como tóxicas o no tóxicas es doble e implica una diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) y una reducción del porcentaje de larvas pluteus normales superior a 20% respecto al control negativo de toxicidad. El resultado de estos análisis estadísticos se incluye en la figura 2. La clasificación es homogénea entre laboratorios aunque se encuentran algunas diferencias entre las estaciones de toxicidad intermedia (F', C'

toxicities than the other laboratories, show less variability especially for samples A', B' and C'.

Discussion

Few laboratories were found with the appropriate technology and experience to develop the bioassay using sea urchin embryos for sediment elutriate toxicity assessment. Previous studies reported interlaboratory variability of 63% when the calibrated endpoint was the EC50 value (effective concentration causing a response decrease of 50% in the total population), which is similar to the variability registered for chemical analyses (Environment Canada 1992). Our results are similar and, as in previous studies, variability is much higher when testing contaminated sediments. Two sediment elutriate toxicity bioassays were calibrated in the Netherlands, one using oyster embryos and the other using rotifers. The first showed a CV between 34% and 210%, while the second was considered not recommendable for regulatory purposes since the results showed that previous experience was essential for the successful development of the test (Stronkhorst 2003).

In this study, the criterion to consider samples toxic or not toxic is double and implies a statistically significant difference ($P \leq 0.05$) and a decrease of at least 20% of normal pluteus compared with the negative toxicity control. The results of the statistical analysis are summarized in figure 2. Sample classification is homogenous among laboratories although some differences were found for the intermediate toxic samples (F', C' and D'). Unrandom tendencies were observed for some laboratories and these tendencies appear to be related to the criteria established to consider larvae normal or abnormally developed; for example, laboratory 2 reported lower toxicity than the other laboratories and laboratory 3 found higher toxic responses in all samples. It seems that there is no confounding factor in the controls and in clearly toxic samples where embryos did not develop further than the early stages (gastrolula), but this factor seems critical when toxicity levels arrest



1 (0.06)	Control	B	A	C	D	F	E
	96	96	92	91	79	78	24
2 (0.03)	Control	B	F	A	D	C	E
	97	93	91	70	70	19	0
3 (0.01)	Control	B	A	F	C	D	E
	98	87	82	60	36	7	1
4 (0.08)	Control	A	B	F	D	C	E
	98	71	53	47	11	9	0

Figura 2. Resultado del análisis estadístico de los resultados del ejercicio de intercalibración del bioensayo de erizos de mar (estadístico de Levene entre paréntesis).

Figure 2. Results of the statistical analysis of the intercalibration exercise for the bioassay using sea urchin larvae (Levene's statistic in parentheses).

y D'). Se observaron determinadas tendencias en los resultados de algunos laboratorios y estas tendencias parecen ser debidas a los criterios utilizados por el operador para clasificar las larvas como normales o no normales. Por ejemplo, el laboratorio 2 tiende a detectar menor toxicidad que el resto de laboratorios mientras que el laboratorio 3 detecta siempre valores superiores. Parece no haber confusión en los controles o en las muestras claramente contaminadas donde los embriones no pasan de los primeros estadios de desarrollo (gástrula), pero este factor puede ser decisivo para niveles de toxicidad que interrumpen el desarrollo larvario en estados intermedios de desarrollo ya que el cambio exacto de pre-pluteus a pluteus es muy subjetivo (ver fig. 3). Por esta razón se recomienda la formación específica de los operadores.

Las diferencias entre los niveles de toxicidad interlaboratorio, pueden también deberse al contenido en material en suspensión de los lixiviados ya que éstos no fueron filtrados. La filtración no fue recomendada ya que puede introducir cambios o pérdidas de ciertos contaminantes (ASTM 1994). De cualquier modo, se ha demostrado que la presencia de material particulado puede afectar al desarrollo embrionario del erizo de mar y por tanto el resultado final (Carr 1998). Por ello, la centrifugación a altas velocidades para retirar el material particulado parece ser más recomendable en el caso de los ensayos realizados con el agua intersticial de los sedimentos (Ho *et al.* 1997). Del mismo modo, la centrifugación debe ser recomendable para evitar este factor de confusión y homogeneizar, en lo posible, los resultados entre laboratorios.

Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente desarrollado bajo subvención del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (REN2002_01699/TECNO). El diseño de los ensayos agudos para la caracterización de materiales de dragado se realizó en un proyecto conjunto entre el CEDEX y la Universidad de Cádiz (2001 y 2003). MC Casado-Martínez agradece la financiación del Ministerio Español de Educación y Ciencia en el programa de becas de Formación de Personal Investigador (FPI). Nuestro agradecimiento a E Luque durante la preparación del manuscrito final.

Referencias

- ASTM. 1994. Guide for collection, storage, characterization and manipulation of sediments for toxicological testing. Designation E1391-94. Vol. 11.04. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1786 pp.
- ASTM. 1995. Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos. Designation E1563-95. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Beiras R, Vázquez E, Bellas J, Lorenzo JI, Fernández N, Macho G, Mariño JC, Casas L. 2001. Sea urchin embryo bioassay for *in situ* evaluation of the biological quality of coastal sea water. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52: 29–32.
- Beiras R, Fernández N, Bellas J, Besada V, González-Quijano A, Nunes T. 2003a. Integrative assessment of marine pollution in

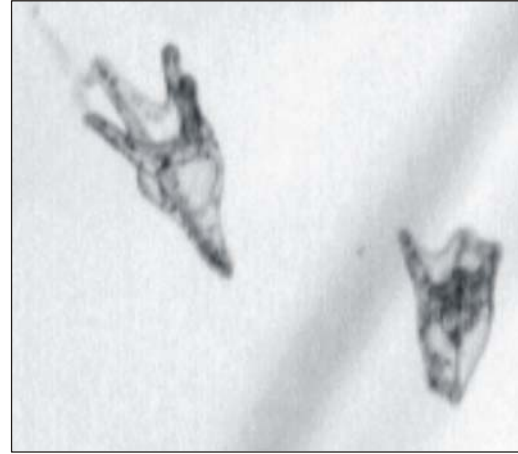


Figura 3. Ejemplo de estados de desarrollo donde el criterio del operador es crítico. A la izquierda una larva normal. A la derecha un embrión con las espículas y el aparato digestivo formado, pero donde los 4 brazos no están claramente separados como indica la definición de larva normal para este ejercicio.

Figure 3. Example of developmental stages where the selection criterion used to consider normal larvae is subjective: on the left, a normal larva; on the right, a developed embryo but with the four arms not completely separated.

embryogenesis in the intermediate developmental stages since the change from prepluteus to pluteus is highly subjective (see fig. 3). It is therefore recommendable that the operators running this bioassay receive specific training if it is to be used for regulatory purposes.

The interlaboratory variability may also be a consequence of differences in suspended material in the elutriates since they were not filtered after settling. Filtration was not recommended because it can lead to loss of some contaminants (ASTM 1994). Nevertheless, it has been reported that particulate material can affect sea urchin embryo development and hence test results (Carr 1998), so centrifugation has been recommended when testing pore water (Ho *et al.* 1997). Centrifugation could therefore be suitable for testing sediment elutriates and to avoid this interfering factor.

Acknowledgements

This study was carried out 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. We thank A Luque for their useful comments on the final manuscript.

Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52: 1209–1224.

Beiras R, Bellas J, Fernández N, Lorenzo JI, Cobelo-García A. 2003b. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian

- Península), metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Mar. Environ. Res.* 56: 531–553.
- Carr RS. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1218–1231.
- Carr RS. 1998. Marine and estuarine pore water toxicity testing. In: Wells PG, Lee K, Blaise C (eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advantages, Techniques, and Practices*. CRC, Boca Raton FL, pp. 526–538.
- Casado-Martínez MC, Buceta JL, Forja JM, DelValls TA. 2006. 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).
- César A, Marín-Guirao L, Vita R, Marín A. 2002. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. *Cienc. Mar.* 28: 407–417.
- DelValls TA, Forja JM, Gómez-Parra A. 1998. The use of multivariate analysis in linking sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: An example in the Gulf of Cádiz (Spain). *Cienc. Mar.* 24: 127–154.
- DelValls TA, Casado-Martínez MC, Riba I, Martín-Díaz ML, Forja JM, García-Luque E, Gómez-Parra A. 2003. Investigación conjunta sobre la viabilidad de utilizar ensayos ecotoxicológicos para la evaluación de la calidad ambiental del material de dragado. *Rep. Téc. CEDEX*, noviembre de 2003, Puerto Real, Cádiz.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Fertilisation Assay Using Echinoids Sea urchins and Sand dollars. *EPS 1/RM/27*.
- Fernández N. 2002. Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. Tesis doctoral, Universidad de Vigo, España.
- Fernández N, 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. *Ecotoxicology* 10: 263–271.
- Ho KT, McKinney RA, Kuhn A, Pelletier MC, Burgess RM. 1997. Identification of acute toxicants in New Bedford Harbor sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 551–558.
- Lapota D, Duckworth D, Word J. 2000. Confounding factors in sediment toxicology. Issue papers. SPAWAR Systems Center, San Diego, 19 pp.
- Mariño-Balsa JC, Pérez P, Estévez-Blanco P, Saco-Álvarez L, Fernández E, Beiras R. 2003. Assessment of the toxicity of sediment and sea water polluted by the *Prestige* fuel spill using bioassays with clams (*Venerupis pullastra*, *Tappes decussatus*, and *Venerupis rhomboideus*) and the microalga *Skeletonema costatum*. *Cienc. Mar.* 29: 115–122.
- RIKZ. 1999. Standard operating procedure. Species-05. Marine oyster *Crassostrea gigas* embryo-larvae mortality and development sediment toxicity test. RIKZ/AB-99.118x.
- Stronkhorst J. 2003. Ecotoxicological effects of Dutch harbour sediments. The development of an effects-based assessment framework to regulate the disposal of dredged material in coastal waters of the Netherlands. PhD thesis, Vrije Universiteit.
- USEPA. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. United States Environmental Protection Agency, EPA/600/R-94/025.
- USEPA. 1995. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to West Coast marine and estuarine organisms. United States Environmental Protection Agency, EPA/600/R-95/136.
- USEPA. 1998. Evaluation of dredge material proposed for discharge in waters of the US. Testing manual (The Inland Testing Manual). United States Environmental Protection Agency, EPA-823-F-98-005.

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