

Nota de Investigación/Research Note

Consideraciones para el diseño de un programa de monitorización de los efectos biológicos del vertido del *Prestige*Considerations in the design of a monitoring program of the biological effects of the *Prestige* oil spill

A. Carballeira

Grupo de Ecotoxicología – Área de Ecología
 Facultad de Biología
 Universidad de Santiago de Compostela
 15782 S. de Compostela (A Coruña), España
 E-mail: bfalejo@pop.usc.es

Recibida en enero de 2003; aceptada en febrero de 2003

Introducción

La evaluación o vigilancia ecotoxicológica de una situación ambiental requiere la medición de una multiplicidad de parámetros tomados de manera y en cantidad suficiente para que permitan extraer conclusiones robustas a través de un análisis estadístico correcto. Pero además, para conseguir una idea comprensiva del conjunto de relaciones establecidas entre los parámetros es preciso contar con una aproximación conceptual. Para estos propósitos es muy apropiada y recomendable la aproximación TRIAD (Chapman, 1996; 2000) ya utilizada en la costa española con anterioridad (DelValls *et al.*, 1998). Esta aproximación fue aplicada a diversidad de situaciones acuáticas incluida la contaminación con hidrocarburos (Chapman, 1991), e involucra tres ejes o componentes, análisis químico de los contaminantes, indicadores de toxicidad e indicadores ecológicos (fig. 1), los cuales necesitan ser combinados adecuadamente para conseguir una evaluación integrada de la situación ambiental. De manera aislada, o desequilibrada, no se podrá disponer de la información buscada puesto que la aproximación TRIAD aporta mas información que la procedente de la suma de los componentes tomados aisladamente.

Ante situaciones catastróficas como las mareas negras es normal que se movilicen todos los recursos disponibles y que se actúe en los tres componentes indicados, pero no es habitual que esto se haga de forma coordinada. En consecuencia, a pesar de aumentar inexcusablemente el esfuerzo y el coste, se pierde la oportunidad de obtener información muy valiosa.

El método triaxial, aplicado a la contaminación por hidrocarburos en un área tan extensa como la afectada por el derrame del *Prestige*, debe seleccionar lo más adecuadamente posible lo que se va a estudiar en cada eje (fig. 2).

Dentro de los ecosistemas marinos, las comunidades endo y epi bentónicas son las más expuestas y a más largo plazo a los contaminantes, pues los sedimentos actúan como pozos donde acaban la mayoría de los contaminantes vertidos a la columna de agua. También es cierto que, en determinadas ocasiones, los

Introduction

The ecotoxicological assessment and surveillance of an environmental situation requires the determination of many parameters, taken in a way and sufficient number that will enable conclusions to be obtained through proper statistical analysis. Furthermore, to get a comprehensive idea of the relationships established between parameters, a conceptual approach is required. For this purpose, the TRIAD analysis (Chapman, 1996, 2000), which has already been applied to the



Figura 1. Representación esquemática de la *Sediment Quality Triad*. El área solapada entre los componentes químicos y biológicos representa la zona disponible para identificar la contaminación existente en el sistema bentónico. Además, en esta zona se pueden calcular, utilizando análisis multivariante, los valores específicos de calidad de sedimento para las zonas estudiadas (SQV) (Obtenido de DelValls y Chapman, 1998).

Figure 1. Schematic representation of the *Sediment Quality Triad*. The overlapped area between chemical and biological elements represents the zone available to identify the pollution existing in the benthic system. Moreover, by means of multivariate analysis, in this area specific sediment quality values can be calculated for the studied areas (SQV) (from DelValls and Chapman, 1998).

sedimentos pueden actuar como fuente de contaminación, por difusión o por resuspensión, debido a procesos de bioturbación, corrientes, acción mareal, dragados, etc., principalmente en las áreas costeras más someras. Los procesos de removilización de los contaminantes, remoción y liberación, son muy complejos dependiendo del tipo de contaminante, de la naturaleza de los sedimentos y de los factores ambientales, incluida su variabilidad temporal. Así, se observaron repuntes de contaminación meses después del desastre, ligados a efectos mareales, en el caso del *Erika* (Burgeot, 2001) y, a la remoción de fondos por la extracción de arenas, en el caso del *Aegean Sea* (MMA, 1993).

Eje I: Concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) en medio y organismos (estima de la toxicidad potencial)

Los PAHs se consideran contaminantes persistentes de origen antrópico con efectos biológicos a largo plazo. Aunque existen numerosos trabajos que intentan establecer los rangos de concentraciones de los contaminantes en el medio, agua o sedimentos (Long *et al.*, 1995; DelValls y Chapman, 1998) con efectos biológicos adversos, la primera aproximación realista al estudio de los posibles efectos de los contaminantes es la evaluación de su acumulación en los organismos, puesto que integra la acción de los diferentes factores que controlan su biodisponibilidad. Para obtener una imagen integrada de la toxicidad potencial se puede hacer uso del concepto de tóxico equivalente (TEQ), aplicado a las concentraciones de PAHs

coastal zone of Spain (DelValls *et al.*, 1998), is very suitable and recommendable. This approach has been used to follow a diversity of aquatic issues, including hydrocarbon pollution (Chapman, 1991), and involves three axes or components: the chemical analysis of pollutants, toxicity indices and ecological indices (fig. 1); these need to be properly combined to attain an integrated assessment of the environmental situation. Separately, or through an unbalanced approach, the information required will not be made available since the TRIAD approach yields more information than just the sum of the isolated components.

When catastrophic situations occur, such as black tides, all the resources available are usually set in motion and action is taken regarding the three components mentioned; however, this is not usually done in a coordinated way. Consequently, despite the effort and ever-increasing costs, the opportunity of acquiring very valuable information is lost.

In the triaxial method, when applied to hydrocarbon pollution in such an extended area as that affected by the *Prestige* oils spill, the appropriate choice of what is to be studied in each axis is important (fig. 2).

Within the marine ecosystems, the endo- and epibenthic communities undergo greater exposure and for a longer period of time to pollutants, since sediments act as sinks where most of the pollutants discharged into the water column end up. On occasion, sediments may also act as pollution sources, by diffusion or resuspension, due to processes such as bioturbation, currents, tidal action, dredging, etc., mainly in shallow coastal areas. The remobilization processes of pollutants, their removal and release, are very complex depending on the type

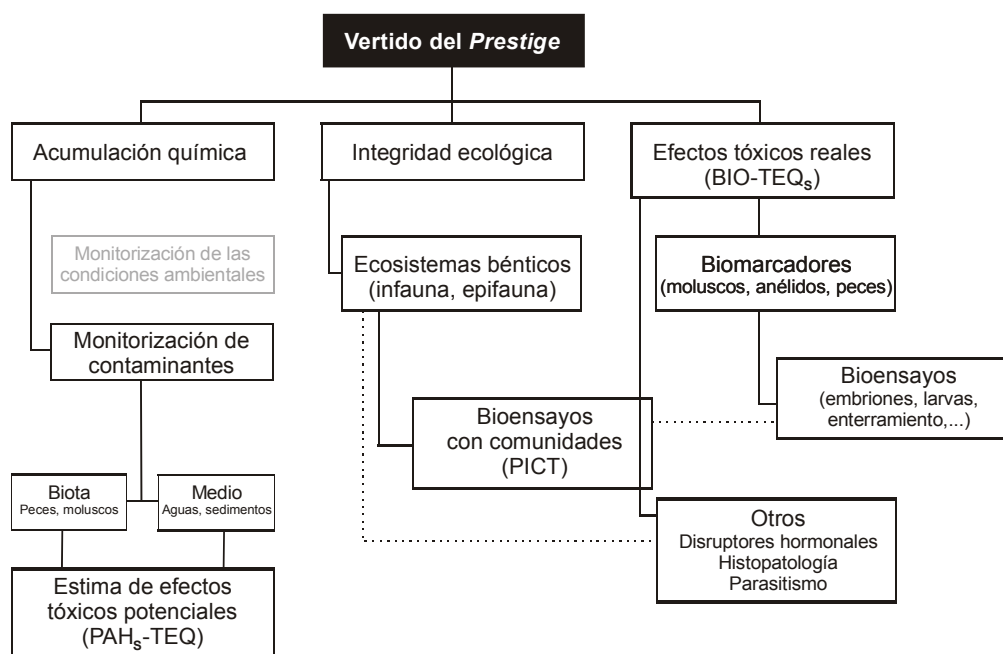


Figura 2. Diseño triaxial para la biomonitorización de los ecosistemas marinos polucionados por el derrame del *Prestige*.
Figure 2. Triaxial design for biomonitoring the marine ecosystems polluted by the *Prestige* oil spill.

determinadas en medio u organismos. En este caso, para calcular las unidades PAHs-TEQ se debe utilizar como referencia un hidrocarburo del que se disponga amplia información toxicológica (i.e. benzo(a)pireno). Pero dado que los efectos de los PAHs pueden ser debidos, en mayor medida a los compuestos biotransformados (Michel *et al.*, 1995) que a los originales, en caso de concentraciones bioacumuladas se pueden sesgar las interpretaciones. Una solución consiste en ampliar las determinaciones analíticas de los PAH-metabolitos. Otra opción es recurrir, como un descriptor del grado de exposición a los tóxicos petroquímicos, a la bioacumulación de un marcador del tipo de fuel. Por ejemplo, en el caso del *Prestige*, al factor de contaminación (concentración corporal observada/concentración corporal de referencia¹) de arsénico, níquel, vanadio y titanio, o a la alteración de las relaciones entre concentraciones corporales.

Las predicciones QSARs (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) para PAHs no están bien desarrolladas. La principal QSAR para PAHs es el coeficiente de reparto octanol-agua (Kow), que depende de su peso molecular, permite explicar la bioconcentración de la fracción soluble, por ejemplo en autótrofos (algas). Pero, al depender la bioacumulación en heterótrofos de las ofertas relativas de PAHs en las diferentes vías de entrada (agua, material particulado, alimento/presa), las predicciones basadas en las QSARs suelen tener menos éxito.

En cambio, las concentraciones relativas de los PAHs, tetra, penta y hexa-aromáticos, en medio y organismos, permiten evaluar su movilidad, biodisponibilidad y metabolización. La relación entre BeP/BaP—benzo(e) y (a)pireno, respectivamente—es un índice de la posible metabolización de los PAHs por los organismos, pues suele ser inferior en el medio y aumentar con el nivel trófico (Fernández *et al.*, 1997).

La mayoría de los PAHs del vertido del *Prestige* son de peso molecular de intermedio a alto. Este tipo de PAHs no suelen mostrar toxicidad aguda dentro de sus límites de solubilidad en el agua. Sin embargo, es necesario advertir que ciertos PAHs pueden aumentar su peligrosidad por fotomodificación, lo que ya ha sido demostrado anteriormente mediante experimentos de laboratorio. Pelletier *et al.* (1997; 2000) comprueban que antraceno, fluoranteno y pireno incrementan altamente su toxicidad (LC₅₀/12 a 50000) sobre larvas y embriones de invertebrados marinos. Esto es particularmente peligroso para los organismos que viven en la franja intermareal o cerca de la capa superficial del agua.

Eje II: Evaluación de la toxicidad (biomarcadores, bioensayos y estudios epidemiológicos)

La exposición de los ecosistemas a hidrocarburos, tras un vertido accidental de petróleo como el del *Prestige*, causa una serie de daños ambientales—unos muy evidentes y en corto plazo y otros insidiosos a largo plazo—de tal forma que no es

of pollutant, the characteristics of the sediment and the environmental factors, including its temporal variation. Hence, increases in the levels of contamination have been observed several months after a disaster, associated with tidal effects in the case of the tanker *Erika* (Burgeot, 2001) and with bottom dredging for sand extraction in the case of the *Aegean Sea* (MMA, 1993),

Axis I: Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment and organisms (potential toxicity measurement)

The PAHs are considered persistent pollutants of anthropogenic origin with long-term biological effects. Although many works attempt to determine the concentration ranges of contaminants with adverse biological effects in the environment, water and sediments (Log *et al.*, 1995; DelValls and Chapman, 1998), the first realistic approach to the study of the possible effects of pollutants is the assessment of their accumulation in organisms, since this integrates the action of the different factors controlling their bioavailability. In order to obtain an integrated image of the potential toxicity, the equivalent toxic (TEQ) concept can be used, applied to the PAH concentrations measured in the environment and organisms. In this case, to estimate the PAH-TEQ units, it is necessary to use as reference a hydrocarbon for which abundant toxicological information is available (i.e., benzo(a)pyrene). However, since the effects of the PAHs may be due more to the biotransformed compounds (Michel *et al.*, 1995) than to the original ones, the interpretations can be biased in the case of the bioaccumulated concentrations. One solution is to extend the analytical determinations to the PAH metabolites. Another option is to use the bioaccumulation of a specific fuel marker as a descriptor of the degree of exposure; for example, in the case of the *Prestige*, the pollution factor (observed body concentration/reference body concentration¹) of arsenic, nickel, vanadium and titanium, or the alteration in the relationships of the body concentrations.

The Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) for PAHs are not well developed. The main QSAR for PAH is Kow (octanol/water partition coefficient), which depends on the molecular weight and allows the explanation of the bioconcentration of the soluble fraction in, for example, autotrophs (algae). However, since bioaccumulation in heterotrophs depends on the relative supply of PAHs (through water, particulate matter, food/prey), predictions based on QSARs are usually less successful.

With the relative concentrations of PAHs (tetra-, penta- and hexa-aromatics) in the environment and organisms it is possible to determine their mobility, bioavailability and metabolism. The relationship between BeP/BaP—benzo(e) and (a) pyrene, respectively—is an index of the possible PAH metabolization by organisms, which is usually less in the environment and increases with the trophic level (Fernández *et al.*, 1997).

suficiente detectar la presencia de contaminantes en el medio y en los organismos; además, es necesario comprobar los efectos provocados a todos los niveles, desde alteraciones moleculares a ecológicas, para poder evaluar el daño real causado y el tiempo que se necesita para su rehabilitación.

En general, bivalvos, crustáceos decápodos, anfípodos y equinodermos son los animales más sensibles a los PAHs, destacando las actinias y anémonas entre los resistentes. Los peces al tener fuerte movilidad huyen, aunque algunos pueden ser dañados por ser territoriales. Se ha comprobado que las zonas con contaminaciones crónicas dan lugar a un aumento en la frecuencia de tumores en peces y neoplasias en bivalvos. Entre las macroalgas marinas, las especies más sensibles son *Fucus* spp., *Ulva* spp. y *Pelvetia* spp., mientras que *Laminaria* spp., *Chondrus* spp. y *Ascophyllum* spp. son más resistentes.

Biomarcadores

Moluscos y anélidos han sido sujetos de la mayoría de los estudios sobre biomarcadores en medio marino debido a su facilidad de muestreo, por ser sésiles, por su tamaño y morfología, y porque muchos de ellos son especies cultivadas. Son estas últimas especies (mejillón, almeja, ostra, berberecho, etc.) las que reciben más atención, junto con algunas especies de peces como las platijas.

El estudio con biomarcadores de los efectos debidos al vertido de petróleo del *Aegean Sea* (Cinta *et al.*, 1993) se realizó en tres especies de bivalvos—mejillón de roca, almeja babosa y berberecho—, aplicando los índices bioquímicos: sistema MFO, enzimas antioxidantes, enzimas fase II (glutación-S-transferasa) y peroxidación de lípidos. Los resultados obtenidos apoyan el uso de citocromo P450 total y de la proteína CYP1A como biomarcadores de exposición a productos petrogénicos en bivalvos, detectándose diferencias significativas en los niveles de estas enzimas, entre la zona más próxima del vertido y el resto de estaciones. Los efectos deletéreos se pusieron de manifiesto por los elevados niveles de peróxidos de lípidos detectados seis meses después del vertido.

La disrupción endocrina (ED), o interferencia de compuestos ambientales sobre el comportamiento normal del sistema endocrino (hormonal), afecta claramente a las poblaciones de invertebrados, sobre todo a gasterópodos prosobranquios. Existen hidrocarburos capaces de mimetizar las hormonas de invertebrados y vertebrados, alterando su funcionamiento. El fenómeno de intersex en *Littorina* es utilizado en este sentido, pero en Galicia existe amplia información sobre la estructura poblacional y la aparición del fenómeno imposex en *Nucella lapillus* como biomarcador de contaminación, con campañas realizadas recientemente que nos informan de su situación en todo el litoral (Quintela, 2002).

El sistema enzimático MFO (función oxigenasa mixta) es la primera vía de detoxificación de numerosos contaminantes orgánicos (PAHs, PCBs). El citocromo P450 1A1 (CYP1A1) es el componente terminal del sistema MFO, y la actividad de la

Most of the PAHs spilled by the *Prestige* are of intermediate to high molecular weight. These PAHs do not usually show severe toxicity within their solubility limits in water. However, it is necessary to note that some PAHs can become more dangerous due to their photomodification; this has been demonstrated in laboratory experiments. Pelletier *et al.* (1997, 2000) have shown that anthracene, fluoranthene and pyrene increase their toxicity ($LC_{50}/12$ at 50000) on larvae and embryos of marine invertebrates. This is particularly dangerous for organisms living in the intertidal zone or near the water surface.

Axis II: Toxicity assessment (biomarkers, bioassays and epidemiological studies)

The exposure of ecosystems to hydrocarbons after an oil spill such as that from the *Prestige*, produces a series of environmental damages, some of which are evident and short-term, whereas others are long-term. Therefore, it is not enough just to detect the presence of pollutants in the environment and organisms; it is also necessary to determine the effects caused at all levels, from molecular to ecological alterations, to be able to assess the actual damage and the time needed for the recovery.

In general, bivalves, decapod crustaceans, amphipods and echinoderms are the animals most susceptible to PAHs, whereas actinians and anemones are the most resistant. Fishes are highly mobile and able to escape, although some territorial species may be harmed. An increase in the frequency of tumors in fishes and neoplasias in bivalves has been found in chronically polluted areas. The most susceptible marine macroalgae are *Fucus* spp., *Ulva* spp. and *Pelvetia* spp., whereas *Laminaria* spp., *Chondrus* spp. and *Ascophyllum* spp. are the most resistant.

Biomarkers

Mollusks and annelids have been the object of most of the studies about biomarkers in the marine environment, due to their easy sampling, because they are sessile, because of their size and morphology, and because many of them are cultured species. The latter species (mussel, clam, oyster, cockle, etc.) are the most studied, along with some fish species such as flounders.

The biomarker study of the effects of the oil spill by the *Aegean Sea* (Cinta *et al.*, 1993) was carried out on three bivalve species—rock mussel, *babosa* clam and cockle—using the MFO system, antioxidant enzymes, enzymes phase II (glutathione S-transferase) and lipid peroxidation as biochemical indices. The results obtained support the use of total cytochrome P450 and CYP1A protein as biomarkers of bivalve exposure to petroleum-derived products, detecting significant differences in the levels of these enzymes between the area closest to the oil spill and the rest of the stations. The

Etoxirosorufin-O-dietilasa (EROD) es CYP1A1-dependiente. Por ello, la EROD representa un buen marcador de la inducción de la MFO. Además, la inducción de la MFO para la detoxificación puede traer efectos perjudiciales: (1) muchos compuestos carcinogénicos y genotóxicos solamente adquieren formas activas después de su transformación por la MFO (i.e. formación de benzo(a)pireno diol-epóxido, a partir de un precursor); (2) sustancias esenciales de tipo endógeno, como muchos esteroides, pueden estar regulados por el sistema MFO, y niveles elevados del mismo pueden determinar funcionamientos anómalos en el crecimiento y la reproducción.

La medida de la EROD en peces es un elemento importante en el programa de monitorización del *Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*, (CEFAS) del Reino Unido, y es considerado un monitor de exposición a la contaminación e indicador de problemas potenciales futuros en la salud de las poblaciones de peces. CEFAS utiliza habitualmente como organismos centinela a *Limanda limanda*, *Pleuronectes platessa* y *Platichthys flesus*. Un problema es que la actividad EROD está afectada por factores ambientales, pero sobre todo por la actividad reproductora. Cuando se realizan estudios sincrónicos esto no tiene mucha importancia, pero si los datos proceden de diferentes épocas del año, es necesario normalizarlos. El estudio realizado por CEFAS recopilando información respecto a los PAHs durante la segunda mitad de los noventa, en 87 localidades del Reino Unido, concluye que la información sobre los efectos, mediante biomarcadores, fue insuficiente para extraer conclusiones generales (CEFAS, 2000). Por otro lado, los ensayos EROD, en *L. limanda* y *P. platessa*, fueron empleados para valorar la extensión afectada por PAHs derivados del vertido del *Sea Empress* (1996) y se observó como la actividad EROD varió fuertemente, según la fecha del muestreo en la zona afectada, muy por encima del ruido estacional normal.

La disrupción endocrina también afecta a las poblaciones de vertebrados. Existen sustancias capaces de mimetizar las hormonas femeninas de los vertebrados (estrógenos), causando la feminización de peces machos y de otros organismos. La feminización involucra la síntesis de un precursor natural, la proteína vitelogenina (VTG), y la condición inducida es conocida como ovotestis. Los peces en este estado se conocen como intersexo, aunque genéticamente permanecen como machos. Este proceso puede reducir la probabilidad de reproducción de las poblaciones de peces. Para investigar el grado de feminización y otras condiciones intersexo, se toman medidas sobre relación entre sexos, pesos gonadales, análisis de determinados compuestos (esteroides) en hígado y VTG en plasma².

Bioensayos

Durante las últimas dos décadas se han desarrollado numerosos bioensayos, más o menos estandarizados, para estudiar los efectos de los contaminantes, localizados en el agua o en los sedimentos, utilizando adultos, larvas o

deleterious effects were revealed by the increased levels of lipid peroxides detected six months after the spillage.

The endocrine disruption (ED) or interference of environmental compounds over the normal behavior of the endocrine system (hormonal) clearly affects invertebrate populations, mainly prosobranch gasteropods. There are hydrocarbons that are able to mimic invertebrate and vertebrate hormones and alter their function. The intersex phenomenon in *Littorina* is used in this sense, but considerable information exists in Galicia on the population structure and the appearance of the imposex phenomenon in *Nucela lapillus* as pollution biomarker, with recent campaigns indicating their proliferation throughout the littoral (Quintela, 2002).

The enzymatic system MOF (mixed oxygenase function) is the first mode of detoxification of many organic pollutants (PAHs, PCBs). Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) is the terminal component of the MOF system and the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity is CYP1A1-dependent, hence EROD represents a good marker in MOF induction. Moreover, MOF induction for detoxification can bring noxious effects: (1) many carcinogenic and genotoxic compounds only acquire active forms after their transformation to MOF (i.e., benzo(a)pyrene diol-epoxide formation from its precursor); (2) essential endogen-type substances such as steroids can be regulated by the MOF system and high levels can determine anomalous growth and reproduction processes.

The EROD measurement in fish is an important element in the monitoring program at the Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS) in the UK; it is considered a monitor of pollution exposure and an indicator of potential future problems in the health of fish populations. CEFAS normally uses sentinel organisms: *Limanda limanda*, *Pleuronectes platessa* and *Platichthys flesus*. One problem is that EROD activity is affected by environmental factors and, in particular, by reproduction. This is not important when synchronous studies are performed, but the data must be standardized if they were obtained at different times of the year. The CEFAS study collected information during the second half of the 1990s at 87 locations in the UK, and with regard to the PAHs, concluded that the information on the effects obtained with biomarkers were inconclusive (CEFAS, 2000). On the other hand, the EROD assay in *L. limanda* and *P. platessa* was used to evaluate the extent of the area affected by PAHs derived from the *Sea Empress* spill (1996); the EROD activity was found to vary significantly, depending on the date of the sampling in the affected zone, above the normal seasonal noise.

Endocrine disruption also affects the vertebrate populations. Substances exist that are capable of mimicking the female hormones of vertebrates (estrogens), causing the feminization of male fish and other organisms. Feminization involves the synthesis of a natural precursor, the vitellogenin protein (VTG), and the induced condition is known as ovotestis. Fish in this situation are known as intersex,

embriones de numerosos organismos marinos, pelágicos y bentónicos, como: anfipodos, poliquetos, copépodos, anélidos, moluscos, peces, etc.

La selección de los organismos tests es determinada por su relevancia, prevalencia, accesibilidad, simplicidad de mantenimiento y cultivo, bajo coste, y efectos de fácil observación y cuantificación.

Actualmente son numerosísimas las técnicas de biomarcadores y bioensayos, desarrolladas y estandarizadas en mayor o menor grado, para aplicar en programas de biomonitorización marina, como se puede ver en el resumen (tabla 1) de las conclusiones extraídas por los grupos de trabajo sobre efectos biológicos de los contaminantes (Working Group on Biological Effects of Contaminants, WGBEC) en medio marino, en distintas conferencias³ del International Council for the Exploration of the Sea (ICES). Se considera que todos los métodos recomendados cumplen con los requisitos de: haber sido ensayados en condiciones de laboratorio y campo; dar relaciones dosis-respuesta o concentración-respuesta satisfactorias y éstas son conocidas para un número razonable de contaminantes; que su sensibilidad sea comparable a las técnicas ya conocidas; que su protocolo sea aprobado por WGBEC y publicado por ICES.

Entre los bioensayos mencionados, los realizados con algas son muy populares. Mientras las microalgas (*Chlorella*, *Phaeodactylum*, *Scenedesmus*, *Selenastrum*, etc.) son utilizadas preferentemente en tests toxicológicos, las macroalgas lo son como bioacumuladores, informando de la fracción soluble (Carballeira *et al.*, 2000) pero también han sido utilizadas como especies-test frente a hidrocarburos (Zambrano y Carballeira, 1999).

Los bioensayos de comportamiento dan excelentes resultados, destacando los tests de aclarado⁴ aplicados a moluscos bivalvos para evaluar la calidad del agua, y los de enterramiento, realizados con moluscos bivalvos o crustáceos (*Corophium*) para la evaluación de la calidad del sedimento. Ambos métodos permiten evaluar tanto toxicidades subletales (comportamiento) como letales (supervivencia) y son aplicables tanto *in vitro* como *in situ*. Aunque estos métodos están homologados, es conveniente adaptarlos a las especies y tipos de ambientes de cada región. Así, para las costas de Galicia los organismos a ensayar en los tests de enterramiento preferentemente son las especies de almeja de alto interés económico (*Venerupis decussata*, *V. pullastra* y *Ruditapes philippinarum*). Cada especie presenta un comportamiento y unos requerimientos ecológicos diferentes. De esta forma, al desarrollar el test con las tres especies se aumenta la precisión del método por ajustarse mejor a cada circunstancia ambiental (Kaschl y Carballeira, 1999).

La mayoría de los trabajos de evaluación de la calidad del agua marina se vienen realizando con embriones de erizos y de moluscos bivalvos, sobre lo que existe buena experiencia en laboratorios de nuestra comunidad. Incluso se han desarrollado con éxito métodos alternativos, como es el caso del bioensayo realizado con gametos, embriones y larvas de ascidia solitaria (*Ciona intestinalis*) (Bellás, 2001).

although genetically they remain males. To study the degree of feminization and other intersex conditions, measurements are made of the sex rate, gonad weight, analysis of certain liver compounds (steroids) and VTG in plasma².

Bioassays

During the last two decades several, more or less standardized, bioassays have been developed to study the effects of pollutants found in the water or in the sediments, using adults, larvae or embryos of many marine, pelagic and benthic organisms, such as amphipods, polychaetes, copepods, annelids, mollusks, fishes, etc.

The selection of test organisms is determined by their relevance, prevalence, accessibility, ease of maintenance and culture, low cost and effects that permit easy observation and quantification.

At present, there are numerous biomarker and bioassay techniques, developed and standardized to a greater or lesser extent, that can be used in marine monitoring programs, as can be seen in the summary (table 1) of the conclusions obtained by the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC) in the marine environment, in different conferences³ of the International Council for the Exploration of the Seas (ICES). All the recommended methods must have been tested in laboratory and field conditions; must yield satisfactory dose-response or concentration-response relations and must be known for a reasonable number of pollutants; their sensibility must be comparable to techniques already known; and their protocol must be approved by WGBEC and published by ICES.

Among the bioassays mentioned, those carried out with algae are very popular. Whereas microalgae (*Chlorella*, *Phaeodactylum*, *Scenedesmus*, *Selenastrum*, etc.) are preferably used in toxicological tests, macroalgae are preferably used as biomarkers, giving information on the soluble fraction (Carballeira *et al.*, 2000), and they have also been used as test-species for hydrocarbons (Zambrano and Carballeira, 1999).

The behavior bioassays yield excellent results, particularly the tests⁴ applied to bivalve mollusks to assess water quality, and the burrowing tests carried out with bivalve mollusks and crustaceans (*Corophium*) to determine sediment quality. Both methods can be used to evaluate sublethal (behavior) and lethal (survival) toxicities, and they are applicable *in vitro* as well as *in situ*. Although these methods have been standardized, it is convenient to adapt them to the species and types of environments in each region. Hence, for the Galician coasts, the organisms to assay in the burrowing test should preferably be the highly-commercial clam species (*Venerupis decussata*, *V. pullastra* and *Ruditapes philippinarum*). Each species presents a different behavior and diverse ecological requirements; so, by conducting the test with all three species, the accuracy of the method increases as it adjusts to each environmental circumstance (Kaschl and Carballeira, 1999).

Tabla 1. Resumen de los métodos recomendados por el Working Group on Biological Effects of Contaminants del International Council for the Exploration of the Seas (ICES).

Table 1. Summary of the methods recommended by the Working Group on Biological Effects of Contaminants of the International Council for the Exploration of the Seas (ICES).

Método	Organismo	IC	Contaminantes	Significado biológico
Formación DNA- aductos	Peces	+++	PAHs, pesticidas	Efectos genotóxicos
Inhibición AchE	Peces Bivalvos	+ +	Organofosforados, carbamatos y tóxicos algales	Medida de exposición
Inducción de meta- lotioneinas	Peces <i>Mytilus sp.</i>	+++ +	Metales (Zn, Cu, Cd, Hg,...)	Medida de exposición y perturbación a metales
Inducción EROD o P450IA	Peces	+++	PAHs, PCBs, Dioxinas,..	Indicador de exposiciones pasadas o actuales. Predictor de patologías
ALA-D inhibición	Peces	+++	Pb	Índice de exposición
Metabolitos de PAHs	Peces	++	PAHs	Medida de exposición y metabolismo de PAHs
Estabilidad lisoso- mal	Mejillón Ostra Peces	+ -	Amplia variedad de contaminantes. Respuesta no específica	Medida de daños celulares y buen predic- tor de patologías. Posible indicador de inmunodepresión en células sanguíneas.
Histopatología de lesiones toxicopáti- cas, preneoplasias y neoplasias en hígado	Peces	-	PAHs y otros xenobióticos (pesticidas nitroorgánicos, triazinas,...)	Medida de cambios patológicos asociados a exposiciones de compuestos carcinogé- nicos genotóxicos y no-genotóxicos.
Bioensayos con sedimentos	<i>Corophium, Echinocardium,</i> <i>Arenicola, Leptocheirus,</i> <i>Grandidierella, Rhexopyn-</i> <i>lus, Ampelisca</i>	+++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes.	Toxicidad aguda (letal o subletal) actual. Permite interpretaciones retrospectivas de cambios en la comunidad
Agua intersticial de los sedimentos	Organismos de la columna de agua (embrión de erizo, embrión de bivalvos, <i>Acartia</i> , etc.). Microtox	-	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes	Toxicidad aguda (letal o subletal) y genotoxicidad actual. La toxicidad de contaminantes hidrofóbicos puede ser subestimada en el agua intersticial.
Elutriados de sedi- mentos con agua de mar	Idem	-	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes. Utilizada en valoración de draga- dos, resuspensión de sedimentos,...	Toxicidad aguda (letal o subletal) y genotoxicidad actual
Bioensayos con agua	Idem	+++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes. Utilizada en aguas costeras y estuarios.	Toxicidad aguda (letal o subletal) y genotoxicidad actual
Reparto energético (scope for growth)	Moluscos bivalvos (mejillón, ostra,...)	++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes.	Respuesta integrada subletal
Deformidad de la concha	<i>Crassostrea gigas</i>	-	Específica de organoestánicos	Disruptor de la formación de la concha
Imposex	Moluscos neogasterópodos (<i>Nucella lapillus, Buccinum</i> <i>undatum</i>)	+++	Idem	Disruptores hormonales. <i>Nucella lapillus</i> en estuarios y litoral costero, y <i>Buccinum</i> <i>undatum</i> en aguas libres.
Intersex	<i>Littorina littorea</i>	+++	Idem	Interferencia en la reproducción en aguas del litoral costero.
Suceso reproductor en peces	<i>Zoarcis viviparus</i>	+++	Contaminación no específica. Amplio rango de contaminantes.	Medida sobre la capacidad de reproduc- ción y supervivencia de huevos. Restringida al período de reproducción, cuando la hembra porta los juveniles.

IC: Intercalibración internacional con diferentes grados de desarrollo.

Independientemente de los biomarcadores o bioensayos utilizados en un programa de biomonitorización es conveniente transformar los resultados obtenidos a unidades tóxicas equivalentes (BIO-TEQs), a modo de control positivo, frente a un tóxico determinado. El objetivo de los BIO-TEQs junto a los PAHs-TEQs es integrar la información y facilitar la obtención de correlaciones entre componentes y ejes del método TRIAD.

Técnicas epidemiológicas

Existen otras técnicas de biocontrol de tipo epidemiológico y de compleja estandarización, por lo que es necesario que sean aplicadas por personal experto, sobre las que habitualmente no se dispone de niveles de referencia locales, pero aun así son de gran utilidad, como: (1) el examen histopatológico de peces e invertebrados (lesiones toxicopáticas, preneoplasias y neoplasias, índices de parasitismo, etc.). En este grupo se pueden incluir los fenómenos antes mencionados de imposex e intersex y la frecuencia de aparición de micronúcleos, fundamentalmente en moluscos; y (2) la frecuencia de asimetrías fluctuantes y la probabilidad de aparición de deformidades son buenos índices de condiciones de estrés y de presencia de contaminantes no específicos que exhiben propiedades genotóxicas (teratogénicas, mutagénicas y/o carcinogénicas). Los grupos de organismos utilizados en estos estudios son muy diversos: esqueletos de foraminíferos y equinodermos, crustáceos, peces, aves y mamíferos marinos (Servia, 2001).

Ambas técnicas suministran información sobre daños netos ocasionados a las poblaciones, frente a los daños potenciales que revelan la mayoría de los biomarcadores disponibles⁵. La aproximación eco-epidemiológica, muy útil en el caso del *Prestige* porque permite identificar los sectores más afectados y los efectos a largo plazo, y su aplicación se puede simplificar seleccionando entre las especies comerciales, aquellas ecológicamente más relevantes y/o sobre las que se dispone de más conocimiento en general y sobre los útiles niveles de referencia pre-actividad. De todos modos, siempre se podrán utilizar los datos obtenidos para establecer comparaciones entre estaciones ecológicas y a través de su evolución en el tiempo.

Eje III: Evaluación de la integridad ecológica

La mayoría de los estudios sobre integridad ecológica en medio marino (evaluación de efectos de vertidos urbano-industriales, mareas negras, dragados, etc.) se centran en el estudio de las biocenosis bentónicas marinas, utilizando primordialmente los invertebrados (macro y meio bentos) de fondos blandos.

Dentro del *continuum* del medio marino, existen unos gradientes ambientales principales (salinidad, profundidad, tipo de sustrato, grado de exposición) que van a crear patrones de distribución naturales de especies y comunidades bénticas. Para evaluar los efectos de una contaminación en medio marino, a nivel de estructura y composición de estas comunidades, es necesario tener un conocimiento, más o

Most of the marine water quality assessments have been done with sea urchin and bivalve mollusk embryos, and our laboratories are quite experienced in this. Alternative methods have also successfully been developed, such as bioassays carried out with solitary ascidian (*Ciona intestinalis*) gametes, embryos and larvae (Bellás, 2001).

Regardless of the biomarkers or bioassays used in a biomonitoring program, it is convenient to transform the results obtained into equivalent toxic units (BIO-TEQs), as a positive control for a certain toxin. The objective of the BIO-TEQs and PAH-TEQs is to integrate the information and facilitate the correlations between the components and axes of the TRIAD method.

Epidemiological techniques

There are other epidemiological-type biocontrol techniques of complex standardization that must be applied with expertise, for which there are usually no local reference levels but are still very useful, such as: (1) histopathological exams of fishes and invertebrates (toxicopathic injuries, preneoplasias and neoplasias, parasitism indices, etc.); the imposex and intersex phenomena mentioned above can be included within this group, as well as the frequency of appearance of micronuclei, mainly in mollusks. (2) The frequency of fluctuating asymmetries and the probability of the occurrence of malformations are good indices of stressful conditions and the presence of unspecific pollutants that show genotoxic properties (theratogenic, mutagenic and/or carcinogenic). The groups of organisms used in these studies are very diverse and include foraminifer and echinoderm skeletons, crustaceans, fishes, and marine birds and mammals (Servia, 2001).

Both techniques provide information about net damages caused to populations, compared to the potential damages revealed by most of the biomarkers available⁵. The eco-epidemiological approach is very useful in the case of the *Prestige*, because it allows the identification of the most affected sectors and the long-term effects, and its application can be simplified by choosing among the most-ecologically relevant commercial species and/or those for which more knowledge and the useful pre-activity reference levels are available. The data obtained can always be used to establish comparisons among ecological stations and through their evolution in time.

Axis III: Assessment of the ecological integrity

Most of the research on the ecological integrity in the marine environment (assessment of the effects of urban and industrial runoff, black tides, dredging, etc.) focuses on the study of marine benthic biocenosis, primarily using soft-bottom invertebrates (macro- and meio-benthos).

menos amplio, del tipo de comunidad que debería existir de no haberse producido la perturbación. Para ello, hay dos opciones: una, que haya estudios previos de las localidades afectadas y, dos, realizar estimas por comparación con escenarios semejantes geográficamente próximos sobre que tipo de comunidad debería habitar el lugar en estado prístino o antes de haberse producido la nueva alteración. Desde los años setenta, se vienen realizando numerosos y tediosos estudios sobre macrozoobentos por todo el litoral de Galicia, de tal forma que están perfectamente cubiertos los niveles de referencia que se necesitan. Además, existen estudios específicos de efectos de mareas negras sobre las comunidades bentónicas de nuestro litoral (Mora *et al.*, 1993a, b; López-Jamar *et al.*, 1993).

La estructura de las comunidades puede ser descrita y cuantificada mediante diferentes parámetros, tales como dominancia, biomasa, niveles tróficos, etc., que pueden ser utilizados como criterios (*end points*) para evaluar cambios (antes-después) o comparar escenarios. Pero la obtención de estos parámetros suele ser compleja, costosa y lenta. Por ello es muy importante decidir que tipo de datos tomar (componentes, atributos, nivel taxonómico,...) que no supongan una pérdida gruesa de información y que se ajusten al procedimiento analítico que se vaya a emplear (Warwick, 1993). En este campo existe mucho debate entre ecólogos y gestores respecto a la operatividad de las diferentes aproximaciones.

Debido a la gran extensión de costa afectada por el vertido del *Prestige*, consideramos que un estudio extensivo espacio-temporal, debe centrar los esfuerzos en el seguimiento de las poblaciones de especies indicadoras específicas para este tipo de impacto, especies con sensibilidad conocida frente a los hidrocarburos, gracias a los estudios antes mencionados. Cambios de distribución y abundancia de las especies indicadoras, cambios entre grupos de especies de diferente sensibilidad, comparación con datos normalizados (curvas ataxonómicas) de las poblaciones de estas especies, etc., podrían informar con suficiente precisión y fiabilidad sobre las alteraciones de los ecosistemas afectados. De esta forma se pueden derivar esfuerzos hacia una mayor densidad de muestras, en el espacio y en el tiempo, con la idea de obtener resultados más robustos sobre la inercia y resiliencia de estas comunidades frente a esta catástrofe.

Estos estudios de integridad ecológica se verían reforzados por los resultados de los estudios epidemiológicos y, especialmente, con el test PICT (*Pollution-Induced Community Tolerance*). Este test de toxicidad a nivel de comunidad, realizado con las comunidades nativas del endo-bentos y con diseños sencillos de tipo funcional (i.e. respirometría), pueden suministrar una información tóxico-específica complementaria, muy valiosa y a bajo coste. La diferente respuesta funcional entre las comunidades expuestas y las no expuestas, y de la misma comunidad en el tiempo, a la contaminación petroquímica propia del *Prestige* reflejaría el grado adaptativo que es proporcional al daño sufrido. Es decir, el incremento de tolerancia es el resultado de cambios en la composición específica, la aclimatación individual y los cambios genéticos

Within the marine environment continuum, there are major environmental gradients (salinity, depth, type of substrate, degree of exposure) that create natural distribution patterns of benthic species and communities. To evaluate the effects of contamination in a marine environment, in relation to the structure and composition levels of these communities, it is necessary to have knowledge of the type of community that would have existed if no perturbation had occurred. There are two options for this: the existence of previous studies on the affected sites or to figure out the type of community that must have inhabited the site when pristine or before its recent alteration, by comparing with other similar geographically-close scenarios. Since the 1970s, numerous studies have been carried out on the macrozoobenthos along the entire Galician littoral, so the reference levels required are perfectly covered. Furthermore, there are specific studies of the effects of black tides on the benthic communities of this littoral (Mora *et al.*, 1993a, b; López-Jamar *et al.*, 1993).

The structure of the communities can be described and quantified with different parameters, such as dominance, biomass, trophic levels, etc., that can be used as criteria (*end-points*) to assess the changes (before and after) or to compare scenarios. Obtaining these parameters, however, can be complex, expensive and slow. Therefore, it is important to decide what data are necessary (components, attributes, taxonomic level, ...), without the loss of information and fitting the analytical procedure to be used (Warwick, 1993). In this field, there is an on-going debate between ecologists and managers regarding the workability of the different approaches.

Due to the large coastal area affected by the *Prestige* spill, we consider that an extensive study in space and time must focus on monitoring the populations of indicator species specific for this type of impact, species with known susceptibility to hydrocarbons, thanks to the afore-mentioned studies. Changes in the distribution and abundance of the indicator species, changes among groups of species of different susceptibility, comparisons with normalized data (ataxonomic curves) of populations of these species, etc., could provide sufficiently accurate and reliable information on the alterations of the affected ecosystems. Hence, efforts could be directed to a higher sampling density in space and time, in order to obtain more solid results regarding the inertia and resilience of the communities facing this catastrophe.

These ecological integrity studies would be reinforced by the results of epidemiologic studies and, especially, with the PICT (*Pollution-Induced Community Tolerance*) tests. This community-level toxicity test, carried out with native endo-benthos communities and with simple functional-type designs, can provide complementary toxic-specific information, very valuable and at low cost. The different functional response obtained from the exposed communities and from those not exposed, and from the same community in time, to the petrochemical pollution from the *Prestige* would reflect the adaptability that is proportional to the damage suffered. That

de las poblaciones que forman la comunidad original, inducidos por la exposición a los hidrocarburos. Las pruebas PICT se pueden asimilar a una medida de la respuesta inmunológica a nivel de comunidad, con propiedades retrospectivas tóxico-específicas (Molander, 1991).

Ecosistemas pelágicos

Mientras que existe amplia metodología para evaluar los efectos biológicos de los contaminantes petroquímicos sobre ecosistemas béticos, habitualmente los más afectados, la relativa a ecosistemas pelágicos es escasa. Evidentemente las técnicas de biomarcadores y los ensayos de toxicidad antes comentados son válidos para evaluar la calidad del agua de estos ecosistemas. Sin embargo, existen diferencias importantes: en el medio pelágico la calidad del agua puede variar sustancialmente con el tiempo; los organismos se desplazan con el agua (plancton) o se desplazan fuertemente entre las aguas (necton); mientras que el plancton suministra pequeñas muestras que dificultan su análisis químico, el necton integra grandes masas de agua, pero no representa bien la calidad de su localización.

Los trasplantes de organismos en jaulas puede ser una buena aproximación para la biomonitorización de la zona donde se hundió el *Prestige*, mientras siga vertiendo fuel. En este sentido el proyecto que viene desarrollando el grupo de trabajo del ICES sobre los efectos de los contaminantes sobre las comunidades pelágicas resulta muy instructivo (Hylland, 2000). El objetivo consiste en seleccionar una metodología para detectar los efectos biológicos de los contaminantes derivados de actividades petrolíferas (plataformas) que puedan ser aplicados en futuros programas de monitorización. El diseño experimental consiste en la realización de trasplantes en jaulas de diferentes organismos (*Gadus morhua*, *Gasterosteus aculeatus*, huevas de *Clupea harengus* y *Mytilus edulis*). Además de analizar los efectos en los organismos trasplantados, se caracteriza la calidad biológica del agua mediante tests *in vitro*, como los indicados anteriormente (biomarcadores y tests de toxicidad), y tests *in situ* de desarrollo embrionario y mortalidad larvaria de arenque. Paralelamente se estudian numerosos organismos planctónicos recolectados en el entorno de las jaulas. Lamentablemente las conclusiones finales sobre la batería de tests capaz de eliminar redundancias en la información suministrada por las numerosas pruebas utilizadas, pero que cubran el espectro más amplio posible de contaminantes, aun no están publicadas.

Consideraciones sobre un sistema integrado de biomonitorización del vertido del *Prestige*

La complejidad de técnicas y aproximaciones que pueden ser empleadas en la biomonitorización del medio marino, junto a la extensión y diversidad de espacios afectados por el *Prestige*, obligan a dirigir el esfuerzo adecuadamente, simplificando desde la toma de muestras hasta las determinaciones químicas y biológicas. En primer lugar, hay

is, the increase in tolerance is the result of the changes in species composition, individual acclimation and genetic changes of the populations that composed the original community, all induced by the exposure to hydrocarbons. The PICT tests can be integrated into a measure of the immunologic response at the community level, with toxic-specific retrospective properties (Molander, 1991).

Pelagic ecosystems

While there are numerous methods to assess the biological effects of petrochemical pollutants on benthic ecosystems, usually the most affected, they are scarce in regard to pelagic ecosystems. The previously mentioned biomarker techniques and toxicity assays are valid to determine the quality of the water of these ecosystems. However, important differences exist: in the pelagic environment the water quality may substantially vary in time; organisms move with the water (plankton) or shift abruptly within the water (nekton); small plankton samples are usually obtained making the chemical analysis more difficult, whereas nekton covers huge water masses but does not represent well the quality of its location.

Organism transplants in cages could be a good way to biomonitor the area where the *Prestige* has sunk as long as fuel continues to seep out. In this sense, the study being conducted by the ICES group on the effects of pollutants on pelagic communities is very useful (Hylland, 2000). The objective is to select a methodology to detect the biological effects derived from oil drilling (platforms) that may be applied in future monitoring programs. The experimental design consists of transplanting different organisms in cages (*Gadus morhua*, *Gasterosteus aculeatus*, *Clupea harengus* eggs and *Mytilus edulis*). The effects on the transplanted organisms are analyzed, and the biological water quality is characterized by means of *in vitro* tests, such as those previously indicated (biomarkers and toxicity tests), and *in situ* tests of the embryonic development and larval mortality of the herring. At the same time, many planktonic organisms collected around the cages are studied. Unfortunately, the final conclusions of the battery of tests that would eliminate redundancies in the information provided by the numerous tests used, but that covers the widest pollutant spectrum possible, have not yet been published.

Considerations regarding an integrated biomonitoring system of the *Prestige* oil spill

The complexity of techniques and approaches that can be used to biomonitor the marine environment as well as the extent and diversity of the areas affected by the *Prestige*, make it necessary to address the issue properly, by simplifying the effort, from the taking of the samples to the chemical and biological determinations. The spatial heterogeneity has to be simplified into a few types of habitats that represent all those

que simplificar la heterogeneidad espacial en unos pocos tipos de hábitats representativos de la totalidad y afinar el seguimiento temporal, programando apropiadamente cada tipo de prueba.

En cada hábitat tipo es necesario seleccionar las especies más representativas para su análisis químico-biológico, y a igual esfuerzo conviene simplificar las determinaciones a favor de las réplicas para conseguir resultados robustos. Así, en el ámbito de las pruebas de toxicidad se puede optar por una batería mínima capaz de evaluar la calidad del agua y de los sedimentos marinos.

Recientemente en Alemania⁶ se plantean cual sería la batería mínima de ensayos (*minimal marine test set*) para evaluar la calidad de sus ecosistemas marinos. Los criterios utilizados para seleccionar los bioensayos fueron: que las especies deben representar diferentes taxones y niveles tróficos para cubrir las diferentes vías de entrada de los tóxicos, y ser nativas; ser sensibles a un amplio espectro de contaminantes; y los tests deben estar estandarizados, ser razonablemente prácticos y sus costes adecuados a los resultados.

La propuesta más simple, quizás excesivamente simple, consistió en tres bioensayos, dos para evaluar la calidad del agua (reducción de luminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* e inhibición del crecimiento de la microalga *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin) y uno para evaluar los sedimentos (supervivencia y enterramiento del anfípodo *Corophium volutator* Pullas).

En la actualidad en España existe una batería de bioensayos para determinar la toxicidad y bioacumulación producida por contaminantes asociados a sedimentos acuáticos que se está utilizando con éxito en la caracterización de sedimentos de estuarios y marinos (tabla 2, DelValls *et al.* en prensa; http://www.uca.es/Facultad_ccmar/rcmarinas).

En el diseño de un programa de seguimiento se debe tener en cuenta el equilibrio entre especificidad y relevancia ecológica. Quizás no importe tanto la especificidad si las pruebas fueran seleccionadas adecuadamente hacia el tipo de contaminación a vigilar. Sin embargo, sí que interesa combinar equilibradamente los diferentes niveles de relevancia (controlando las fuentes de variabilidad) y observar la evolución de los parámetros para saber el sentido (rehabilitación/empeoramiento) y la elasticidad de la respuesta de cada jerarquía biológica (fig. 3).

Dentro del contexto definido por el tipo y la extensión del impacto ocurrido, el estado de conocimiento de los ecosistemas afectados y la experiencia de los grupos de investigación regionales, consideramos que se deberían priorizar las técnicas de biomonitorización recogidas en la tabla 3.

Este diseño de estudios, estrictamente marinos, es necesario acompañarlo de otros sobre ecosistemas adyacentes como estuarios, lagunas costeras, marismas, zonas supralitorales de las playas, etc., que son también vulnerables a la contaminación petroquímica del *Prestige*, y en los que muchas poblaciones de aves, peces, crustáceos, etc. desarrollan parte de su ciclo vital e interaccionan con otras especies propias de estos hábitats.

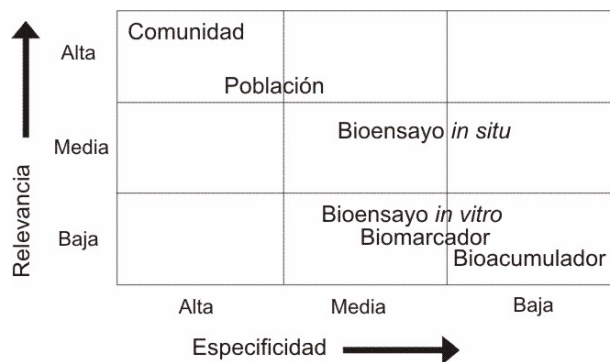


Figura 3. Relación entre especificidad y relevancia ecológica de los diferentes métodos de evaluación de efectos biológicos de los polucionantes.

Figure 3. Relationship between specificity and ecological relevance of the different assessment methods of the pollutant effects.

affected, and the monitoring work and each kind of test must be properly programmed.

In each type of habitat, the most representative species must be selected for their chemical and biological analysis, and the determinations must be simplified in favor of replicas to obtain strong results. Regarding toxicity tests, a minimum set of tests capable of evaluating the water quality and marine sediments can be chosen.

In Germany⁶, researchers are determining the minimal marine test set to evaluate the quality of their marine ecosystems. The criteria used to select the bioassays were: native species must represent different taxa and trophic levels, to comprehend the different means of toxic input, and they must be sensitive to a wide pollutant spectrum; and the tests must be standardized, reasonably practical and cost-related to the results.

The simplest proposal, perhaps too simple, consisted of three bioassays, two to evaluate the water quality (luminescence reduction of the bacteria *Vibrio fischeri* and growth inhibition of the microalga *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin) and one to evaluate sediments (survival and burrowing of the amphipod *Corophium volutator* Pullas).

In Spain, there is a set of bioassays to determine the toxicity and bioaccumulation produced by pollutants associated with aquatic sediments, which is being successfully used in estuarine and marine sediment characterization (table 2; DelValls *et al.*, in press; http://www.uca.es/Facultad_ccmar/rcmarinas).

In the design of a monitoring program, the balance between specificity and ecological relevance must be considered. Specificity may not be that important if the appropriate tests are selected for the type of pollution to be monitored. However, it is of interest to evenly balance the different relevance levels (controlling the sources of variability) and to observe the evolution of parameters to know the direction (recovery/deterioration) and the elasticity of the response of each biological hierarchy (fig. 3).

Tabla 2. Pruebas de toxicidad de sedimentos realizadas en España.
Table 2. Sediment toxicity tests carried out in Spain.

Organismo	Vía de exposición	Temperatura	Duración	Criterio (<i>end point</i>)
• <i>Microdeutopus gryllotalpa</i> (anfípodo, adulto)	1:4 (todo el sedimento)	20°	10 d	Sobrevivencia (%)
• <i>Ampelisca brevicornis</i> (anfípodo, adulto)	<i>idem</i>	<i>idem</i>	<i>idem</i>	<i>idem</i>
• <i>Corophium volutator</i> (anfípodo, adulto)	<i>idem</i>	<i>idem</i>	<i>idem</i>	<i>idem</i>
• <i>Se esta diseñando también para todo el ciclo de vida</i>	<i>idem</i>	<i>idem</i>	1-3 m	Reproducción, huevos, etc.
• <i>Crassostrea angulata</i> (larvas de bivalvos)	Agua intersticial	20°C	48 h	Sobrevivencia (%)
• <i>Fertilización de huevos (equinodermos)</i>	1:4 (extracto de sedimento)			Deformaciones (%)
• <i>Ruditapes philippinarum</i> (almejas juveniles)	1:1.5 (todo el sedimento)	20 °C	48 h-15 d	Enterramiento (ET ₅₀ -h-)
• <i>Scrobicularia plana</i> (bivalvos adultos)	<i>idem</i>	20°C	10 d-1 m	Sobrevivencia (%)
(<i>mismos criterios que para las almejas</i>)				Bioacumulación
• <i>Mytilus edulis</i> (bivalvos juveniles y adultos)	<i>idem</i>	20°C	10 d-1 m	Enfermedades patológicas
(<i>mismos criterios que para las almejas</i>)				Biomarcadores (metaltioneinas, rojo neutro, etc.)
• <i>Brachionus plicatilis</i> (población de rotíferos)	Agua intersticial	25°C	7 d	Decaimiento poblacional (TL ₅₀ -h-)
	1:4 (extracto de sedimento)			
• <i>Carcinus maena</i> (cangrejo, adulto)	1:2 (todo el sedimento y extracto)	15°C	21 d-3 m	Sobrevivencia (%)
				Bioacumulación
				Enfermedades patológicas
				Biomarcadores (igual que en almejas)
				ELYSA
• <i>Sparus aurata</i> (larvas de peces)	1:4 (extracto de sedimento)	20°C	48 h	Sobrevivencia (%)
• <i>Solea senegalensis</i> (larvas de peces de fondo)	1:4 (todo el sedimento y extracto)	20°C	48-96 h	Sobrevivencia (%)
				Deformaciones (%)
• <i>Sparus aurata</i> (pez juvenil)	1:4 (todo el sedimento y extracto)	20°C	1-3 m	Enterramiento (ET ₅₀ -h)
• <i>Solea senegalensis</i> (juvenil de peces de fondo)				Sobrevivencia (%)
(<i>mismos objetivos para ambos ensayos, a excepción del enterramiento</i>)				Enfermedades patológicas
				Bioacumulación
				Biomarcadores
• <i>Pseudomonas fluorescens</i> (población bacteriana)	(todas las vías)	30 °C	48 h	Actividades enzimáticas (deshidrogenasa, etc.)
• <i>Vibro fisheri</i> (población bacteriana)	(todas las vías)	15°C	15 min-1 h	Reducción de la luminiscencia (EC ₅₀ -%-)

Organismos y pruebas utilizados en diferentes rangos de salinidad (5-35) y pH (6.5-8.5) (verdaderos salobres): *Corophium*, *Ruditapes philippinarum*, *Scrobicularia plana*

Tabla 3. Selección de técnicas para la biomonitorización de los efectos biológicos y ecológicos del vertido del *Prestige*.
Table 3. Selection of the techniques for biomonitoring the biological and ecological effects of the *Prestige* oil spill.

Técnicas	Indicador de impacto (I) o estado (E)	Facilidad, coste, experiencia,...	Tipo de indicación	Tipos de organismos
Bioacumuladores				
PAHs y metabolitos Níquel, vanadio, etc.	I+E	+++	Nivel de contaminación (grado de exposición)	Macroalgas: <i>Fucus vesiculosus</i> , <i>F. serratus</i> , <i>F. ceranoides</i> Detritívoros: <i>Nereis diversicolor</i> (poliqueto) <i>Scorbellaria plana</i> (molusco) Filtradores: <i>Mytilus galloprovincialis</i> (roca) y comerciales (mejillón de batea, ostra, almeja, berberecho)
Biomarcadores				
Inducción EROD	E	+	Salud población Mutagenidad potencial	Peces (platija)
Citocromo P450 Peroxidación lípidos	E	++	Salud población Mutagenidad potencial	Moluscos bivalvos (<i>Mytilus</i>)
Estudios Epidemiológicos				
<i>Nucella</i> imposex	I+E	+++	Disrupción hormonal	Molusco gasterópodo
Histopatología, enfermedades, parasitismo, etc.	E	++	Salud población	Peces comerciales
Deformidades, asimetría fluctuante	E	+	Salud población	Embriones, larvas o adultos de peces e invertebrados
Micronúcleos	E	+	Salud población	Hemocitos de moluscos bivalvos
Bioensayos de Toxicidad				
Bioensayo con bacterias	E	+++	Calidad sedimento (fase sólida ,primera aproximación)	<i>Vibrio fisheri</i>
Bioensayo de microalgas	I	+++	Calidad del agua	Microalgas (<i>Phaeodactylum</i>)
Bioensayo de embriones-larvas	I+E	+++	Calidad del agua	Diferentes opciones (erizo, ostra, mejillón, ascidia)
SFG en mejillón	E	+++	Calidad del agua	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
Test de enterramiento (sublethal)	I+E	+++	Calidad del sedimento	<i>Corophium o tenerupis</i>
Integridad Ecológica				
Índices bióticos, composición y estructura de comunidades	I+E	+++	Calidad del sedimento	Meio/macrobentos
Bioensayos de Tolerancia Inducida en la Comunidad (PICT)	I+E	+	Calidad del sedimento	Microorganismos/Meio-macrobentos

También estos estudios de evaluación de riesgos del *Prestige* requieren completar la información sobre aspectos tales como capacidad del medio para la inmovilización de los contaminantes, capacidad de la microbiota (de sedimentos y agua) para metabolizar las sustancias vertidas, análisis de los productos modificados (fotoquímica, biodegradación), etc.

Conclusiones

La gran superficie afectada y la diversidad de hábitats existentes exige:

- Optimización de todas las técnicas de estudio a emplear en la red de vigilancia. Esto requiere un adecuado ajuste del esfuerzo de muestreo espacio-temporal en todos los estudios, reducción de los costes de los análisis químicos y de biomarcadores orientándolos de manera precisa, una batería de bioensayos mínima, pero que cubra todas las posibles respuestas biológicas esperadas, estudios de integridad ecológica operativos, planteamientos efectivos de menor coste, etc.
- Aunque estos desgraciados accidentes permiten aumentar el conocimiento científico sobre las respuestas de las poblaciones y los ecosistemas, lo que no ha de ser desaprovechado, es necesario que el gran esfuerzo investigador a emplear esté fuertemente coordinado entre todos los estamentos participantes y que cada estamento/grupo de trabajo priorice los estudios multidisciplinarios frente a sus inquietudes científicas particulares. Una buena coordinación reduce el esfuerzo colectivo y de esta forma, además de poder extraer mejores conclusiones, se pueden liberar más recursos hacia propuestas de trabajo más básicas o singulares.
- El conocimiento del medio, la necesidad de realizar ensayos *in situ* o *in vitro* lábiles (escaso margen de tiempo disponible entre muestreo y determinación, necesidad de almacén en nitrógeno líquido,...), los costes de desplazamiento, etc., aconsejan asignar prioritariamente (incluso animar a participar) a los grupos de investigación gallegos en todas aquellas tareas en las que sean expertos, reservando la solicitud de ayudas a otros grupos de investigación. En nuestra comunidad existe un amplio abanico de profesionales⁷ que pueden dar buen cumplimiento a la mayoría de los trabajos a realizar. Además cuentan con el apoyo de colegas pertenecientes a prestigiosos centros de investigación nacionales y extranjeros.
- A lo largo del periodo de estudio, el cual se prevé amplio, los diferentes grupos de investigación deberían suministrar los resultados obtenidos a una comisión de coordinación de las investigaciones científicas sobre la vigilancia de los efectos del *Prestige*, con el objeto de proceder a su análisis

Within the context defined by the type and extent of the impact occurred, the information available of the affected ecosystems, and the experience of the regional research groups, priority should be given to the biomonitoring techniques summarized in table 3.

This study design, strictly marine, should be complemented with other studies on adjacent ecosystems, such as estuaries, lagoons, marshes, supralittoral beach areas, etc., that are also vulnerable to the petrochemical pollution from the *Prestige* and serve as habitat for many populations of birds, fishes, crustaceans, etc., that develop part of their life cycle in these environments and interact with species from these habitats.

These risk assessment studies of the *Prestige* oil spill should also deal with aspects such as: the environment's capacity to immobilize pollutants; capacity of the microbiota (in sediments and water) to metabolize the spilled substances; and analysis of the modified products (photochemical, biodegradation, etc.).

Conclusions

The large area affected and its diversity of habitats require:

- Optimization of all the study techniques to be used in the surveillance. That is, a proper adjustment of the spatio-temporal sampling effort in all studies; a reduction in the costs of the appropriately chosen chemical and biomarker analyses; a minimal set of bioassays, covering all the expected biological responses; operative ecological integrity studies; effective objectives with reasonable cost; etc.
- Although these unfortunate accidents lead to greater scientific knowledge of the responses of populations and ecosystems, which must not be wasted, it is necessary that the large research effort be strongly coordinated among the sectors involved and that each sector/work group give priority to multidisciplinary studies rather than to particular scientific interests. A good coordination reduces the collective effort and, in addition to attaining better conclusions, more resources can be diverted to more basic or singular studies.
- The knowledge of the environment, the need to carry out *in situ* or *in vitro* labile assays (with little time between sampling and determination, need for liquid nitrogen storage, ...), the transportation costs, etc., suggest that Galician research groups should be assigned (even encouraged to participate) all those tasks in which they have expertise, allowing them to ask other groups for support. Our research community⁷ is well-prepared to undertake most of the work, with the support of colleagues belonging to other prestigious national and foreign research centers.
- Throughout the long-foreseen study period, the different research groups should present their results to a

y al posible replanteo de las estrategias de trabajo (bioensayo en *continuum*).

- Esta comisión de investigación coordinadora deberá informar a los poderes públicos de la marcha de los estudios, de cambios de estrategias, contingencias y, sobre todo, de todos aquellos aspectos que afecten a la salud pública y de los ecosistemas.
- Un producto final muy deseable sería, aprovechando la oportunidad que nos da un estudio de esta envergadura, sobre la base de los conocimientos y habilidades adquiridos y de las relaciones causales establecidas, diseñar e implantar una excelente Red de Vigilancia del Litoral, estable y realista para nuestros ecosistemas.

Notas en el texto

- ¹ Desde hace unos años el Gobierno Autonómico a través de su Consellería de Medio Ambiente (Xunta de Galicia), en colaboración con el Grupo de Ecotoxicología de la Universidad de Santiago de Compostela, viene desarrollando el Banco de Especímenes Ambientales de Galicia (Carballeira y Aboal, 2000). La última campaña litoral del BEAG se realizó en el verano del 2001 en 42 localidades distribuidas por toda la costa gallega. Por tanto, mediante esta herramienta ambiental se dispone de material reciente sobre especies pertenecientes a distintos tipos tróficos—macroalgas, filtradores, detritívoros—en el que se puede determinar con precisión los niveles de referencia de los contaminantes antes del accidente del *Prestige*. La comparación de los niveles suministrados por el BEAG con los resultados de sucesivos análisis permitirán decidir cuando se ha completado la detoxificación de los organismos. La rehabilitación de los ecosistemas es un proceso posterior.
- ² La necesidad de clarificar ciertas cuestiones, tales como: ¿Cuáles son las principales sustancias estrogénicas en los estuarios? ¿Cuáles son sus fuentes? ¿Qué implicaciones reales tienen sobre las poblaciones de peces, crustáceos, moluscos, etc.?, llevaron al OSPAR (*Oslo and Paris Commissions*) a redactar el programa JAMP (*Assesment and Monitoring Programma*), donde se incluyen estos y otros aspectos relacionados con la contaminación de estuarios y costas europeos. Entre los aspectos relacionados se está estudiando la incidencia de biomarcadores externos de enfermedades y patologías hepáticas (ulceraciones y papilomas epidérmicos, linfocitos, nódulos macroscópicos en hígado e hiperpigmentación) en especies estuáricas o costeras y en especies comerciales de bajura y altura.
- ³ Hylland, K. (2001): Biological effects of contaminants in pelagic ecosystems: A practical workshop. (ICES ASC 2000 CM 2000/s:05) Annual Sci. Conference. Bruges, Belgium.
ICES-WGBEC report (2002): Biological effects of contaminants (CM 2002/E:02), Annual Sci. Conference. Murcia, España.
- ⁴ En el caso del *Aegean Sea*, éste fue el único bioensayo (score for growth) realizado, con *Mytilus galloprovincialis*, que presenta la ventaja de informar sobre toxicidad subletal y al mismo tiempo sobre pérdidas de productividad acuícola en una especie tan representativa de nuestros ecosistemas (Larretxea y Pérez-Camacho, 1993).
- ⁵ La mayoría de los biomarcadores, bioquímicos o moleculares, de efectos presentan el inconveniente de que son altamente especulativos por ser poco realistas las condiciones experimentales, y por la alta variabilidad natural que necesita ser eficientemente modulada, tanto en el tiempo como inter e intrapoblacionalmente. Es decir, en condiciones naturales es muy difícil interpretar los cambios (aumento o disminución) de los

commission coordinating the research of the effects of the *Prestige* oil spill, so that they can be analyzed and the work strategies possibly re-considered (bioassay in continuum).

- This coordinating research commission would have to keep the authorities informed as to the state of the studies, changes in strategy, contingencies and, most importantly, the issues affecting public health and ecosystems.
- Finally, taking advantage of the opportunity provided by such a complete study, it would be advantageous, based on the knowledge and skills acquired, to design and implement an excellent Littoral Surveillance Network, stable and realistic for our ecosystems.

Notes on text

- ¹ A few years ago, the Autonomous Government through the Consellería de Medio Ambiente (Xunta de Galicia), together with the Ecotoxicology Group of the Universidad de Santiago de Compostela, began to develop the Environmental Species Data-bank of Galicia (BEAG; Carballeira and Aboal, 2000). The last BEAG littoral campaign was carried out in the summer of 2001, at 42 sites along the entire Galician coast. Therefore, recent material is available of species belonging to different trophic levels—macroalgae, filter-feeders, detritivores—that can be used to determine the reference levels of the pollutants prior to the *Prestige* accident. The comparison of the BEAG levels with those resulting from successive analysis will show when the detoxification of the organisms has been completed. The recovery of the ecosystems is a longer process.
- ² The need to clarify some issues, such as determining the main estrogen substances in estuaries, their sources, and their actual effects on the populations of fishes, crustaceans, mollusks, etc., lead to the Assessment and Monitoring Programme (JAMP) proposed by OSPAR (Oslo and Paris Commissions), in which these and other aspects related to the pollution of the European estuaries and coasts are addressed. Among the related aspects, the incidence of external biomarkers of illnesses and hepatic pathologies (epidermic ulcerations and papillomas, lymphocysts, macroscopic nodules in the liver and hyperpigmentation) is being studied in estuarine or coastal species, and in offshore and shallow-water commercial species.
- ³ Hylland, K. (2001): Biological effects of contaminants in pelagic ecosystems: A practical workshop (ICES ASC 2000 CM 2000/s:05). Annual Sci. Conference, Bruges, Belgium.
ICES-WGBEC Report (2002): Biological effects of contaminants (CM 2002/E:02), Annual Sci. Conference, Murcia, Spain.
- ⁴ This was the only assay (score for growth) carried out for the *Aegean Sea*, with *Mytilus galloprovincialis*, that yields information about sublethal toxicity and, at the same time, about losses of aquaculture productivity in such a representative species of our ecosystem (Larretxea and Pérez-Camacho, 1993).
- ⁵ Most of the biomarkers, biochemical or molecular, have the inconvenience of being highly speculative because the experimental conditions are not very realistic and because of the high natural variability, which needs to be efficiently modulated, in time as well as in and among different populations. That is, in natural conditions it is very difficult to interpret the changes (increase or decrease) of the data provided by this type of biomarkers. Most of these biomarkers, to date, are valid only in the laboratory (*in vitro*) with test-species, and others are limited by their high costs. Their appeal lies in: (i) their attributed

datos suministrados por este tipo de biomarcadores. La mayoría de estos biomarcadores, en el estado de desarrollo actual, sólo son válidos en condiciones de laboratorio (*in vitro*) con especies test y otros están limitados por su alto coste. Su atractivo se basa, uno, en el carácter—también discutido—que se les atribuye de bioindicadores tempranos (primeros síntomas) y, dos, por su asimilación a los análisis químicos convencionales, dando una imagen simplificadora de las respuestas biológicas a nivel de individuo y, muy lejanas de la complejidad de las respuestas biológicas poblacionales y ecosistémicas.

⁶ Proyecto: “Validation, harmonisation and implementation of minimal biological test set for the assesment of marine water and sediment samples” financiado por Federal Environmental Agency of Germany y coordinado por el grupo de trabajo alemán de estandarización (DIN AK 5.3) “Sediment bioassay and marine bioassay”. In: Peters *et al.* (2002) *Ecotoxicology* 11(5):379-383).

⁷ Centros en Galicia donde se realizan investigaciones marinas: Tres universidades (A Coruña, Santiago de Compostela y Vigo) con facultades de Biología, Ciencias del Mar, Veterinaria, Químicas, Ingeniería Ambiental, etc. e Institutos Universitarios (Medio Ambiente Acuicultura, Toxicología, Alimentario, etc.); Centros Autónomos dependientes de diferentes Consejerías: Medio Ambiente (Laboratorio de Medio Ambiente, A Coruña), Pesca (Centro de Control del Medio Marino, Centro de Investigaciones Marinas) y Sanidad; Instituciones estatatales con centros en Galicia: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e Instituto Español de Oceanografía (IEO); y otros centros e instituciones públicos o privados relacionados con actividades marinas que pueden dar soporte a los trabajos a desempeñar.

character of early bioindicators (first symptoms) and (ii) their easy incorporation into conventional chemical analyses, providing a simplifying image of the biological responses at the individual level and far from the complex biological responses of populations and ecosystems.

⁶ Project: “Validation, harmonisation and implementation of minimal biological test set for the assessment of marine water and sediment samples”, financed by the Federal Environmental Agency of Germany and coordinated by the German standardization work-group (DIN AK 5.3), “Sediment bioassay and marine bioassay”. In: Peters *et al.* (2002), *Ecotoxicology*, 11(5): 379–383).

⁷ Centers in Galicia where marine research is carried out. Three universities (A Coruña, Santiago de Compostela and Vigo) with faculties of biology, marine sciences, veterinary, chemistry, environmental engineering, etc., and institutes of environment, aquaculture, toxicology, food, etc. Autonomous centers depending on the different Consejerías: Environment (Laboratorio de Medio Ambiente, A Coruña), Fisheries (Centro de Control del Medio Marino, Centro de Investigaciones Marinas) and Health. State institutions with centers in Galicia: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) and Instituto Español de Oceanografía (IEO). Other marine-related centers and public and private institutions that can support the work to be developed.

English translation by Manuel Gardea and Christine Harris.

Referencias

Beek, B., Böhling, S., Bruckman, Franke, U., Jöhncke, C. and Studiger, G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In: B. Beek (ed.), *Bioaccumulation: New aspects and developments*. Springer, Berlin.

Bellas, J. (2001). Evaluación de la calidad del agua en ecosistemas costeros mediante criterios biológicos: Bioensayos con gametos, embriones y larvas de la ascidia solitaria (*Ciona intestinalis*).

Burgeot, T. (2001). An overview of status and monitoring of the *Erika* oil spill. Report Wgbec-Ices-cm (Warnemünde, Germany).

Carballeira, A., Carral, E., Puente, X. and Villares, R. (2000). Regional-scale monitoring of coastal contamination: Nutrients and heavy metals in estuarine sediments and organisms on the coast of Galicia (Northwest Spain). *Int. J. Environ. Pollut.*, 13(1–6): 534–572.

Carballeira, A. y Aboal, J. (2000). Bancos de Especímenes Ambientales. Una propuesta para Galicia. Publ. Univ. de Santiago de Compostela.

CEFAS (2000). Monitoring and surveillance of non-radioactive contaminants in the aquatic environment and activities regulating the disposal of wastes at sea, 1997. Aquatic Environmental Monitoring. Report No. 52. Lowestoft.

Chapman, P.M. (1996). Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicology*, 5: 327–339.

Chapman, P.M. (2000). The sediment quality triad then, now and tomorrow. *Int. J. Environ. Pollut.*, 13: 351–356.

Chapman, P.M., Dexter, R.N, Anderson, H.B. and Power, E.A. (1991). Evaluation of effects associated with an oil platform using the sediment quality triad. *Environ Toxicol. Chem.*, 10: 407–424.

Cinta, P., Biosca, X., Solé, M., Pastor, D. y Albaiges, J. (1993). Efectos del vertido de petróleo del *Aegean Sea* sobre las

poblaciones de bivalvos de la costa de Galicia. En: Seguimiento de las Contaminaciones Producidas por el Accidente del Buque *Aegean Sea*. Ed. Centro Publ. Sec. G. Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.

Connell, D.W., Caisuksant, Y. and Yu, J. (1999). Importance of internal biotic concentrations in risk evaluations with aquatic systems. *Mar. Pollut. Bull.*, 39: 54–61.

DelValls, T.A. and Chapman, P.M. (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. *Ciencias Marinas*, 24(3): 313–336.

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(6): 1073–1084.

DelValls, T.A., Casado-Martínez, M.C., Riba, I. and Buceta, J.L. Upgrading the inventory of sediment bioassays to characterize the environmental quality of dredging material and sediments in Spain. *Ciencias Marinas* (in press).

Donkin, P. (1993). Quantitative structure-activity relationships. In: P. Callow (ed.), *Handbook of Ecotoxicology*. Vol 2. Blackwell Sci. Publ.

Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A. and Tronczynski, Y. (1997). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distribution in the Seine River and its estuary. *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 857–867.

Hollert, H., Dürr, M.J., Olsman, H., Halldin, K., Van Bavel, B., Werner, B., Tysklind, M., Engwall, M. and Braunback, T. (2002). Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the River Neckar. *Ecotoxicology*, 11: 323–336.

Hylland, K. (2000). Biological effects of contaminants in pelagic ecosystems: A practical workshop. Report Annual Science Conference (ICES). Bruges. Belgium.

- Kaschl, A. and Carballeira, A. (1999). Behavioural responses of *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) and *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) to copper-spiked marine sediments. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 15(1-4): 383-394.
- Larretxea, X. y Pérez-Camacho, A. (1993). Evaluación temporal de la contaminación por hidrocarburos en el mejillón de batea. Incidencia de concentraciones subletales de la fracción acomodada en agua sobre los parámetros del balance energético. En: Seguimiento de las Contaminaciones Producidas por el Accidente del Buque *Aegean Sea*. Ed. Centro Publ. Sec. G. Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, pp. 110-127.
- Michael, X.R., Beasse, C. and Narbonne, J.F. (1995): *In vivo* metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archv. Environ. Contam. Toxicol.*, 28: 215-22.
- MMA (1993). Seguimiento de las Contaminaciones Producidas por el Accidente del Buque *Aegean Sea*. Ed. Centro Publ. Sec. G. Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Molander, S. (1991). Detection, validity and specificity of pollution. Induced community tolerance (PICT). Ph. Dr. Dept. Plant Physiology. Univ. Göteborg. Sweden.
- Long, E.R., McDonald, D.D., Smith, S.L. and Calder, F.D. (1995). Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Management*, 19: 81-97.
- Mora, J., Garmendía, J.M., Gómez, J.M., Parada, J.M., Abella, F.E., Sánchez, A., García, M., Palacio, J., Currás, A. y Lastra, M. (1993a). Seguimiento mensual del bentos infralitoral de la ría de Ares y Betanzos antes y después de la marea negra del *Aegean Sea*. En: Seguimiento de las Contaminaciones Producidas por el Accidente del Buque *Aegean Sea*. Ed. Centro Publ. Sec. G. Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, pp. 139-150.
- Mora, J., Parada, J.M., Garmendía, J.M., Gómez, J.M., Sánchez, A., García, M., Palacio, J., Currás, A. y Lastra, M. (1993b). Estudio biosedimentario de la ría de Ares y Betanzos tras la marea negra del *Aegean Sea*. En: Seguimiento de las Contaminaciones Producidas por el Accidente del Buque *Aegean Sea*. Ed. Centro Publ. Sec. G. Técnica. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid, pp. 150-166.
- Pelletier, M.C., Burgess, R.M., Cantwell, M.G., Serbst, J.R., Ho, K.T. and Ryba, S.A. (2000). Importance of material transfer of the photoreactive polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene from benthic adult bivalves to their pelagic larvae. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2691-2698.
- Pelletier, M.C., Burgess, R.M., Ho, K.T., Kuhn, A., McKinney, R.A. and Ryba, S.A. (1997). Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 2190-2199.
- Peters, C., Becker, S., Noack, U., Pfitner, S., Bülow, W., Barz, K., Ahlf, W. and Berghahn, R. (2002). A marine bioassay test set to assess marine water and sediment quality: Its need, the approach and first results. *Ecotoxicology*, 11(5): 379-384.
- Quintela, S. (2002). *Nucella lapillus* (L.) en Galicia: Imposax como biomarcador de contaminación por TBT y estructura de la población. Tesis doctoral. Universidad de A Coruña, España.
- Servia, M.J. (2001). Causalidad ontogenia y aplicación práctica en la detección del estrés ambiental de la asimetría fluctuante y las deformidades en larvas de *Chironomus riparius* Mg (Diptera: Chironomidae) de ecosistemas acuáticos de Galicia. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Warwick, R.M. (1993). Environmental impact studies on marine communities: Pragmatical considerations. *Aust. J. Ecol.*, 18: 63-80.
- Zambrano, J. and Carballeira, A. (1999). Effects of hydrocarbons on the physiology and growth of *Ulva* sp. (*Chlorophyta*). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 15(1-49): 373-381.