

**ADVANCES IN MARINE ECOTOXICOLOGY: LABORATORY TESTS
VERSUS FIELD ASSESSMENT DATA ON SEDIMENT QUALITY STUDIES**

**AVANCES EN ECOTOXICOLOGÍA MARINA: COMPARACIÓN ENTRE
TESTS DE LABORATORIO Y ESTUDIOS *IN SITU* PARA LA EVALUACIÓN
DE LA CALIDAD AMBIENTAL DE LOS SEDIMENTOS**

T.A. DelValls¹

M. Conradi²

¹ Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias del Mar
Universidad de Cádiz
Apartado 40
11510 Puerto Real, Cádiz, España
E-mail: angel.valls@uca.es

² Ecotoxicology Laboratory, Plymouth Environmental Research Center
Davy Building (404), Drake Circus
Plymouth, Devon PL4 8AA, UK

Recibido en septiembre de 1998; aceptado en agosto de 1999

ABSTRACT

Ecotoxicology is concerned with describing and predicting the behaviour of substances in the environment and the response of biological systems, and ultimately with assessing the risks associated with emissions. These assessments are complicated from a basic-science point of view and they should be carried out by using integrative assessments. Contaminated sediments are a significant regulatory issue with important science implications. Determining the impact of contaminated sediments is a key element in environmental risk assessment and management of water resources. Tests for ecotoxicology assessment in sediments may be conducted either in the laboratory or field. Both approaches have advantages and disadvantages. Data from different studies performed in laboratory conditions and in field assessments are compared here. The principal advantages of sediment toxicity tests in the laboratory are the possibility to standardize methodologies and to provide direct evidence of sediments as causative agents of toxicity; however, the results are difficult to extrapolate to the field. The results obtained here show the importance of the end point selected in each test and the variability of the responses. Therefore, the results highlight the necessity and importance of the battery-of-tests approach for toxicity assessment. On the other hand, field sediment toxicity has the advantage of empirical evidence and strong correlative indication of the contaminants responsible for toxicity; however, the results obtained from these tests are highly affected by casualty, so it is not possible to isolate a single causative factor. When structural macrofaunal parameters are incorporated into field tests, the results are even more difficult to interpret, because their parameters can be mainly related to organic enrichment or another kind of natural stress, such as salinity gradient, tidal stress conditions, etc.

Key words: ecotoxicology, toxicity tests, macrobenthic structure parameters, integrative assessment.

RESUMEN

La ecotoxicología es la ciencia que describe y predice el comportamiento de las sustancias en el medio ambiente y las respuestas biológicas del sistema para así, finalmente, evaluar el riesgo asociado con estas emisiones. Estas evaluaciones son difíciles de realizar desde el punto de vista científico y deberían ser elaboradas mediante métodos integrados. Los sedimentos se contemplan, desde el punto de vista científico, como un componente clave en el ecosistema para la evaluación de la calidad ambiental. Los tests de toxicidad de los sedimentos se pueden llevar a cabo tanto en el laboratorio como en el medio teniendo ambos ventajas y desventajas. En este trabajo se comparan los datos obtenidos de distintos experimentos realizados en el laboratorio y un estudio elaborado en el campo. Las principales ventajas de los tests que se han llevado a cabo en el laboratorio fueron la posibilidad de estandarizar la metodología y la evidencia directa que se obtiene de que el sedimento contaminado es el causante de la respuesta biológica; sin embargo, estos resultados son difíciles de extrapolar a la naturaleza. Los resultados obtenidos en este estudio muestran también la importancia de la variable seleccionada en cada test así como la variabilidad en sus respuestas. Por lo tanto, los resultados resaltan la necesidad y la importancia de la utilización de una batería de tests para la evaluación de la toxicidad. Por otra parte, los estudios realizados *in situ* tienen la ventaja de la evidencia empírica y la fuerte indicación entre la correlación de la toxicidad y los resultados obtenidos; sin embargo, estos resultados están muy afectados por el azar, lo que imposibilita aislar un único factor causante de la respuesta biológica. Los resultados son incluso más difíciles de interpretar cuando se realizan índices estructurales de la macrofauna porque éstos pueden estar más relacionados con el contenido en materia orgánica u otra causa de estrés natural, como puede ser un gradiente de salinidad producido por la marea, etc.

Palabras clave: ecotoxicología, tests de toxicidad, parámetros estructurales de la macrofauna, métodos integrados.

INTRODUCTION

Over 2000 years ago, Aristotle placed freshwater animals in seawater and observed their response, presumably to answer the question: How does this change affect this organism? In doing so, he conducted an aquatic toxicity test. This initial curiosity regarding physiology arose in the early 1800s and developed into a formal discipline known as toxicology, in response to the development of organic chemistry (Zapp, 1980). Man synthesized chemicals and then tested their effects. Toxicity tests have been used to answer many types of questions: (1) Is the material lethal to the test organism and at what concentration? (2) What are the effects on organisms exposed to sublethal concentrations of a toxicant for part or all of a life cycle? (3) Which waste, or

INTRODUCCIÓN

Hace más de 2000 años, Aristóteles traspasó animales de agua dulce a salada para observar sus respuestas y, presumiblemente, para contestar a la pregunta ¿cómo afecta este cambio a los organismos? Al realizar dicho ensayo, él realizó un test de toxicidad. El desarrollo de esa inicial curiosidad sobre la fisiología del animal hasta la actual disciplina conocida como toxicología no surgió hasta principios del siglo XIX como respuesta al progreso de la química orgánica (Zapp, 1980). Se sintetizan nuevos productos y se determinan o estudian sus posibles efectos. Los tests de toxicidad han sido utilizados para responder a numerosas preguntas: (1) ¿Es el producto sintetizado letal para el organismo y a qué concentración? (2) ¿Cuál es el efecto producido

waste component, is most toxic? (4) Which organism is most sensitive? (5) Under which conditions are the wastes more toxic? (6) Does toxicity change when the material enters into the environment? (7) Does the waste or pure compound pass or fail some regulatory standard? (8) How much of the receiving system is affected? (9) What are the short-term effects of episodic spills? Attempts to answer these questions have primarily involved acute toxicity testing and, since the late 1950s, the acute toxicity test has become the “work-horse” in monitoring pollution effects. Little information has been added to the theoretical framework presented in the early works with acute toxicity tests, but much has been done to confirm and expand the utility of toxicity tests in biomonitoring. With increasing legal requirements, emphasis has been placed on developing these methods to reach specified management goals (Cairns, 1980).

Hence, ecotoxicology arose as a young scientific discipline concerned with describing and predicting the behaviour of substances in the environment and the response of biological systems, and ultimately with assessing the risks associated with emissions (Genoni, 1997). To meet this objective it is necessary (a) to anticipate how toxicants are likely to impact ecological systems and (b) to assess what changes are taking place in ecological systems under the influence of released toxic substances. Anticipatory tests are usually carried out in laboratory-type circumstances, with appropriate design and control. On the contrary, assessments are often related to more or less particular circumstances and are sometimes too unique to provide an unequivocal standard for comparison. Only integrative methods can anticipate and assess. To evaluate this concern, integrative assessments should be carried out defined as investigations involving attempts to integrate measures of environmental quality to make an overall assessment of the

en el organismo expuesto a concentraciones subletales de dicho producto en parte o en el total de su ciclo de vida? (3) ¿Qué residuo o cuál de sus componentes es más tóxico? (4) ¿Qué organismo es más sensible? (5) ¿En qué condiciones son más tóxicos los residuos? (6) ¿Cambia la toxicidad cuando el residuo entra en el medio ambiente? (7) ¿El residuo o el producto puro cumple los patrones de regulación? (8) ¿Qué porcentaje del ecosistema se ve afectado? (9) ¿Cuáles son los efectos de estos vertidos a corto plazo? Inicialmente, los tests de toxicidad se llevaron a cabo para intentar contestar estas preguntas y, a partir de 1950, se convirtieron en el “caballo de batalla” para el seguimiento de la toxicidad sobre el medio ambiente. Desde entonces se ha avanzado poco en la realización de estos tipos de tests pero todos los trabajos realizados confirman su utilidad, de ahí que su aplicación en estudios medio ambientales se halla extendido. Al incrementarse los requerimientos legales, se produjo un mayor desarrollo de estos tests para así alcanzar determinados objetivos (Cairns, 1980).

La ecotoxicología nació de esta forma como una ciencia joven que pretendía describir y predecir el comportamiento de las sustancias en el medio ambiente así como sus respuestas biológicas para, de esta forma, evaluar los riesgos de los vertidos (Genoni, 1997). Para conseguir este objetivo es necesario (a) conocer y predecir cómo las sustancias tóxicas van a afectar al ecosistema y (b) evaluar cómo estos cambios van a producirse en el medio. Los tests que pueden predecir el efecto de las sustancias tóxicas son los que normalmente se realizan en el laboratorio con un determinado diseño y mediante el uso de controles. Por el contrario, la evaluación ambiental frecuentemente se ha realizado en el medio bajo unas circunstancias más o menos particulares que generalmente son únicas, no pudiéndose estandarizarse o comparar. Sólo los métodos integrados pueden, a la vez, prevenir y evaluar. Éstos deberían de

status of the system. The purpose of such investigations is to determine environmental quality, which may be defined in terms of relative and/or current status, but particularly related to ecosystem health. In doing so, environmental quality values should be proposed (not criteria, see Chapman, 1991, for more details), which can be used not only by the scientific community but also by the general public, in the hope that these values will protect the environment.

Sediments are an ecologically important component of the aquatic habitat and they are also a natural reservoir of contamination. They play an important role in mediating the exchange of chemicals between particulate, dissolved and biological phases. Many contaminants are relatively insoluble in water and are known to adsorb to suspended particulate organic matter, which eventually settles on the bottom sediment. Most toxic chemicals accumulate in sediments at concentrations many orders of magnitude higher than in water. Thus, sediments can integrate pulses of contaminant input, progressively accumulate contamination from chronic sources and retain contaminants from historic episodes of inputs. While sediments may rightfully be considered as the ultimate sink for contaminants, there are a number of processes that turn them into a secondary source of contamination to the overlaying water. Physical resuspension by hydrodynamic action can result in particles re-entering the water column. Chemical flux processes in the sediment-water interface, particles and pore waters can produce concentration gradients that mediate exchange of materials. Bioturbation by benthic organisms during burrowing activity and ingestion of particles, as well as the transfer of particles through adsorption to the body wall can be factors in the re-release of contaminants to the water column. Food chain biomagnification can also result in a redistribution of

llevarse a cabo definidos como estudios que integran diferentes medidas de determinación de la calidad ambiental, facilitando una evaluación global del ecosistema. El objetivo de dichos estudios es determinar la calidad ambiental, la cual puede ser definida en términos relativos y/o del estado actual, pero particularmente relacionado con la salud del ecosistema. De esta forma, se debe proponer valores de calidad ambiental (y no criterios, ver Chapman, 1991, para más detalles), que puedan ser usados no sólo por la comunidad científica sino también por la opinión pública, con la esperanza que dichos valores protegerán el medio ambiente.

Desde el punto de vista ecológico, los sedimentos son uno de los componentes de mayor importancia ecológica dentro de los ecosistemas acuáticos al jugar un papel relevante en el intercambio de sustancias químicas entre las fases particulada, disuelta y biológica. Muchos contaminantes son relativamente insolubles en el agua y son adsorbidos por la materia orgánica particulada, la cual eventualmente se asienta en el fondo del sedimento. De esta forma, los sedimentos pueden acumular tanto antiguos como recientes pulsos de episodios de contaminación, actuando como uno de los mayores depósitos naturales de contaminantes persistentes, con concentraciones varios órdenes de magnitud mayores que las existentes en el agua. Mientras que los sedimentos pueden considerarse como el último destino de los contaminantes, existe una serie de procesos que pueden convertirlos en una fuente secundaria de contaminación del agua. La resuspensión física de partículas debida a la acción hidrodinámica puede conllevar a una reentrada de partículas en la columna de agua. Así mismo, procesos de flujo entre distintas sustancias químicas que se producen en la interfase agua-sedimento, partículas y el agua intersticial pueden producir gradientes de concentración que median el intercambio de material. La

contaminants within an ecosystem. Remediation, particularly dredging activity, can result in contaminated sediments being resuspended and acting as a secondary source of contamination to the water column and the food chain. Any and all of these processes can produce ecotoxicological effects, which operate from the cellular level of the organism to the population and/or community level.

The objective of this paper is to compare a battery of toxicity tests available for determining the direct effects of contaminants associated with sediments on aquatic biota and the role of these tests in monitoring processes by using both laboratory and field data obtained from different studies.

MATERIAL AND METHODS

Sediment operative phases defined for sediment toxicity testing

There are basically four different exposure routes for sediment toxicity testing that define three operative phases for sediment. First, organisms or biological systems can be exposed to whole, intact sediments (the solid phase). Second, they can be exposed to sediment elutriates, which may comprise the suspended phase (with particles) or the liquid phase (without particles). Third, they can be exposed to solvent sediment extractions, using the chemical extraction procedure similar to that used for sediment chemistry analyses (principally for organic contaminant toxicity). Fourth, they can be exposed to the interstitial water (pore water) obtained from the sediment, which can be considered the liquid phase. In summary, we have a solid phase (whole sediment), a liquid phase (elutriates and interstitial water) and an extract (chemical extraction). Although it is not the objective of the present paper, we are describing the potential of any of these phases because they will be

bioperturbación por organismos bentónicos durante su actividad excavadora y/o la ingestión de partículas así como su transferencia a través de la pared del cuerpo del animal, también pueden ser considerados como factores que liberan contaminantes a la columna de agua. La biomagnificación a lo largo de la cadena trófica alimenticia puede también redistribuir las sustancias tóxicas dentro del ecosistema. La regeneración, en especial los procesos que incluyen dragados de sedimentos, pueden resuspender sedimentos contaminados al agua y así actuar como una fuente secundaria de contaminación para el agua y la cadena trófica. Cualquiera o todos estos procesos pueden producir efectos tóxicos que pueden afectar desde el nivel celular del organismo hasta el nivel de población y/o de comunidad.

El objetivo de este trabajo es comparar los tipos de tests de toxicidad disponibles para determinar el efecto de la contaminación de los sedimentos en la biota acuática y su papel en la regeneración y seguimiento continuo de la toxicidad del sistema, usando tanto experimentos en el laboratorio como datos obtenidos directamente *in situ*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fases del sedimento definidas en los tests de toxicidad

Básicamente hay cuatro métodos de exposición en los tests de toxicidad de sedimentos que definen tres fases operativas distintas. En la primera, los organismos o los sistemas biológicos considerados son expuestos al sedimento bruto que no se ha manipulado (fase sólida). Los animales también pueden ser expuestos a extractos de sedimento, que comprende la fase en suspensión (con partículas) o la fase líquida (sin partículas). En la tercera fase, los organismos pueden exponerse a extracciones del sedimento usando el procedimiento químico de

taken into account through the description of the toxicity tests.

Laboratory tests

These tests (i.e., sediment bioassays or toxicity tests) are conducted to estimate the amount of biologically active material that has an effect on the test organism. Field tests measure ecological effects and arbitrate ecological integrity. The major advantages and disadvantages of both laboratory and field sediment tests are presented in table 1. Therefore, prior to any ecotoxicological investigation, serious consideration should be given to the inclusion of both field and laboratory testing in the investigation. There is no such thing as a universally applicable test or test organism; all tests are useful, but it is critical to understand their limitations. The following are criteria with which sediment tests could be selected: (1) the results should be ecologically relevant and related to field events; (2) the assay end point(s) should be sufficiently sensitive to identify a problem and discriminatory to allow sites to be ranked; (3) the tests should be rapid and reproducible and the control response should be predictable; (4) the test method should be standardized; (5) the test end points should respond similarly within classes of toxicants; (6) the test animals should be easily cultured and maintained in the laboratory, and be readily available for testing in a range of sediment types throughout the year.

During sediment testing in the Gulf of Cádiz, a battery of tests was designed to evaluate sediment toxicity in the laboratory (table 2). The results obtained have been integrated and used for sediment quality values (DelValls and Chapman, 1998; DelValls *et al.*, 1998b, c), but the significance of the design has not been compared or evaluated in terms of the organism or sediment operative phase. This evaluation will be carried out here.

extracción similar al usado en los análisis químicos de sedimentos (principalmente aquellos para la determinación de contaminación orgánica). Por último, los animales pueden ser expuestos únicamente al agua intersticial (agua del poro) que se ha obtenido de los sedimentos; este último método puede ser considerado como la fase líquida. En resumen, los métodos descritos son la fase sólida (el sedimento sin alteraciones), la líquida (extractos o el agua intersticial) y un extracto del sedimento (extracción química). Aunque no es el objetivo del presente trabajo, se ha descrito el potencial de cada uno de estos métodos ya que son frecuentemente mencionados durante la descripción de los tests de toxicidad.

Experimentos en el laboratorio

Estos tests (i.e., bioensayos de sedimentos o de toxicidad) son llevados a cabo para estimar la cantidad de material potencialmente activo que posee un efecto sobre el organismo utilizado en el test. Las mayores ventajas y desventajas de ambos, tests y estudios de campo, vienen resumidas en la tabla 1. Por lo tanto, antes de plantear cualquier investigación en ecotoxicología, se debe tener en cuenta si es conveniente la realización de estudios en el laboratorio, *in situ*, o en ambos. No hay un test ni un organismo universal para utilizarlo en los experimentos de laboratorio, pero todos los tests tienen su utilidad; sin embargo, es esencial entender las limitaciones de estos tests de toxicidad. Al elegir un test de toxicidad deben tenerse en cuenta varias premisas: (1) los resultados deben ser relevantes a nivel ecológico y estar relacionados con los sucesos ocurridos en el ecosistema objeto de estudio; (2) el ensayo y las variables a estudiar deben ser suficientemente sensibles para identificar el problema y distinguir entre los distintos puntos o sitios considerados; (3) los tests deben ser rápidos, reproducibles y la respuesta del control

Table 1. Major advantages and disadvantages associated with laboratory and field sediment tests.
Tabla 1. Principales ventajas y desventajas asociadas con los tests de toxicidad en el laboratorio y los estudios de campo.

Type	Advantages	Disadvantages
Laboratory	<ul style="list-style-type: none"> • Availability of standardized methodologies. • Ability to rank sediments. • Comparison of species from different trophic levels. • Ability to provide direct evidence of sediments as the causative agent of toxicity. • Possibility of using the most sensitive or critical species. 	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of realism. • Inability to predict effects under field conditions. • Applicability to only the species being tested.
Field	<ul style="list-style-type: none"> • Provide unequivocal evidence of impairment. • Results can be correlated with physicochemical data providing: (1) empirical evidence and (2) strong correlative indications of the contaminants responsible for toxicity. 	<ul style="list-style-type: none"> • Inability to isolate single causative factors. Casualty. • Not amenable to hypothesis testing (no or little manipulation of field populations).

Organisms

Bacteria

The degradation of organic matter by bacteria in sediment is a major component of the chemical carbon and nutrient cycles in aquatic systems. In addition, their growth rates, easy culture and ubiquitous presence in aquatic systems present great potential for toxicity testing. In toxicity of metals, bacteria are equally or less sensitive to metals than other organisms. The test used in the battery was the commercially available Microtox[®], which uses the luminous bacteria *Photobacterium phosphoreum* to estimate the inhibitory effect of sediment interstitial water or sediment extracts through changes in its luminescence. It is automated, standardized and rapid to

predecible; (4) la metodología debe ser estándar; (5) las variables a medir en los tests deben responder de manera similar a sustancias químicas parecidas; (6) el animal utilizado debe cultivarse en cautividad con facilidad y estar disponible a lo largo de todo el año para su utilización en los tests.

En el presente estudio, se diseñó una batería de tests de toxicidad para evaluar la contaminación de los sedimentos del Golfo de Cádiz (tabla 2). Los resultados obtenidos han servido para realizar, mediante métodos integrados, una valoración de la calidad de los sedimentos (DeI Valls y Chapman, 1998; DeI Valls *et al.*, 1998b, c), pero la importancia del diseño utilizado tanto en los experimentos realizados en el laboratorio como en el estudio ejecutado *in situ* no han sido comparados ni evaluados con anterioridad. Éste es el objetivo de este trabajo.

Table 2. Summarized description of the sediment bioassays performed in this study (organism type, sediment:water ratio, temperature, time duration and end point evaluated). The sediment:water ratio is shown as v:v relation. IW represents the toxicity tests in which interstitial water was used (cf. DelValls *et al.*, 1998a).

Tabla 2. Resumen descriptivo de los bioensayos de sedimento diseñados para este estudio (tipo de organismo, relación sedimento:agua, temperatura, duración en el tiempo y variable evaluada). El cociente entre sedimento:agua se muestra como una relación en v:v. El índice IW representa aquellos tests de toxicidad que se desarrollaron sobre agua intersticial (cf. DelValls *et al.*, 1998a).

Sediment toxicity test	Sediment:water	Temperature	Duration	End points
<i>Microdeutopus gryllotalpa</i> (adult amphipods)	1:4	20°C	10 d	Survival (%)
<i>Crassostrea angulata</i> (bivalve larvae)	1:4	20°C	48 h	Survival (%)
<i>Ruditapes philippinarum</i> (juvenile bivalves)	1:1.5	20°C	48 h	Clam reburial (ET ₅₀ -h-)
<i>Brachionus plicatilis</i> (rotifer population)	IW	25°C	7 d	Population decline (TL ₅₀ -h-)
<i>Sparus aurata</i> (fish larvae)	1:4	20°C	48 h	Survival (%)
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (bacteria population)	IW	15°C	15 m	Luminiscence decrease (EC ₅₀ -%-)

perform (30 minutes). Nevertheless, *P. phosphoreum* has been shown to be less sensitive to mercury and cadmium than the cladoceran *Daphnia magna* (DeZwart and Slooff, 1983). This bacterium is also tolerant to petroleum hydrocarbons and synthetic pesticides, as well as chlorinated organic compounds, such as selected solvents, PCBs and insecticides (Vitkus *et al.*, 1985).

Rotifers

Among the zooplankton, Rotatoria are suitable organisms for using in tests to evaluate the condition of freshwater, estuarine and marine environments. The rotifer, *Brachionus plicatilis*, used in the test performed here, is an ubiquitous species that forms an important link

Organismos

Bacterias

Las bacterias que degradan el material orgánico en el sedimento son uno de los componentes más importantes en el ciclo del carbono y de los nutrientes en el ecosistema acuático. Además, su rápido crecimiento, facilidad de cultivo y su abundancia en sistemas acuáticos hacen de ellas un organismo potencial para los tests de toxicidad. En estudios de toxicidad de metales, las bacterias han resultado ser igual o más sensibles que otros organismos. El test usado en este estudio fue el Microtox[®], que mide los cambios de luminiscencia en la bacteria *Photobacterium phosphoreum* para estimar el efecto inhibido ya

in the marine and estuarine food chains and is frequently used as live food for marine fish larvae in aquaculture. The principal characteristics of this zooplankton group are: they reproduce by parthenogenesis and can be maintained as clones in laboratory cultures; they have a short generation cycle (e.g., two days at 25°C); and experimental conditions are easily reproduced. Also, their small body size (0.18–0.25 mm) allows cultivation in small volumes with high densities of individuals. After checking their behaviour in different environmental conditions (DelValls *et al.*, 1996), they were used in the battery of tests to compare their acuteness against the Microtox test.

Benthic invertebrates

Benthic invertebrates have the potential of being the ideal test organism for sediment toxicity tests. They are in intimate contact with the sediment, either as surface or infaunal dwellers, and ingest sediment particles. A large number of benthic invertebrates from different taxonomic groups, such as Amphipoda, Annelida, Insecta, Mollusca and Nematoda, have been used for testing sediments and some of them have specific and standardized guidelines for sediment toxicity testing (ASTM, 1991). Unfortunately it is difficult to recommend any one test over another, since each test has its own merits. The attributes and assumptions of each test should be considered in the selection process. Three tests were selected in this paper: two used adults (clams, *Ruditapes philippinarum*, and amphipods, *Microdeutopus gryllotalpa*) for whole sediment toxicity, and one used larvae (oysters, *Crassostrea angulata*) for elutriate sediment toxicity. These tests are described by DelValls *et al.* (1998a).

sea del sedimento contaminado o del agua intersticial. Este test es automático, estándar y muy rápido de realizar (30 minutos); sin embargo, *P. phosphoreum* es menos sensible al mercurio o al cadmio que el cladóceros *Daphnia magna* (DeZwart y Slooff, 1983). Además, esta bacteria es tolerante a hidrocarburos, pesticidas y a compuestos clorados como son los disolventes, PCBs e insecticidas (Vitkus *et al.*, 1985).

Rotíferos

Entre el zooplancton, los rotíferos son los organismos más indicados para tests de toxicidad en agua dulce, estuárica y marina. El rotífero utilizado en este estudio, *Brachionus plicatilis*, es una especie muy abundante y con una importancia en el intercambio de la cadena alimenticia entre el estuario y el mar; de hecho, esta especie es la más usada como alimento vivo para las larvas de los peces en la acuicultura. Las principales características de este grupo del zooplancton son: su reproducción partenogenética, facilidad de cultivo en clones en el laboratorio, periodo de generación muy corto (e.g., dos días a 25°C), y fácil reproducibilidad de las condiciones experimentales. Además, su pequeño tamaño (0.18–0.25 mm) permite su cultivo a altas densidades en pequeños volúmenes. Después de estudiar sus respuestas a distintas condiciones ambientales (DelValls *et al.*, 1996), los cultivos de este rotífero fueron utilizados para compararlos a los resultados obtenidos en el test de Microtox.

Invertebrados bentónicos

Los organismos bentónicos están en contacto íntimo con el sedimento, ya sea en la superficie o como excavadores, y algunos incluso se alimentan de él, por ello son los animales más usados en los tests de toxicidad para

Fish

Fish have not been extensively used in either acute or chronic sediment assays, although they have been widely utilized in effluent toxicity testing and are a standard species for tests of both acute lethality and sub-lethal or chronic effects. Compared to many benthic invertebrates, fish do not have such an intimate contact with sediments and, thus, exposure is less. They also require more test material and laboratory space for testing and culture procedures, which results in increased costs. We selected two tests using fish: one with juveniles and another with larvae, for elutriate/whole and elutriate sediments, respectively. *Sparus aurata* was chosen because it is a common species that easily adapts to laboratory conditions, and has a considerable economic importance in the Gulf of Cádiz and other areas of the world.

Field tests

We distinguished between two types of field tests: sediment bioassays conducted in the field versus estimates of benthic ecosystem structure of function. There are, in fact, few field bioassays and none has gained wide acceptance. This is primarily due to practical considerations of repeatability, availability of control and cost.

Field bioassays that focus on several trophic levels have been developed. Cairns *et al.* (1979) proposed a protozoan colonization test to determine whether the protozoan communities that colonize the artificial substrates were affected by the chemical substances in the substrates (exposure). Burks and Wilhm (1977) described a similar approach using artificial substrates for benthic invertebrates. Both tests were sufficiently sensitive to detect differences between the two types of effluents, but it took a long time to measure the effects (six weeks for

el sedimento. Se utilizan un gran número de especies de diferentes grupos taxonómicos como, por ejemplo, Amphipoda, Annelida, Insecta, Mollusca y Nematoda, y algunas de estas especies son las utilizadas en los tests de toxicidad estandarizados (ASTM, 1991). No es posible recomendar un determinado test ya que cada uno tiene sus propios méritos; sin embargo, se aconseja que antes de realizar cualquier test se tenga en cuenta las características propias de cada uno. En este estudio se han seleccionado tres tests diferentes, en los cuales se usan dos animales adultos (la almeja *Ruditapes philippinarum* y el anfípodo *Microdeutopus gryllotalpa*) para el test de toxicidad del sedimento, y un estadio larvario (la ostra *Crassostrea angulata*) para el test sobre extractos acuosos. La metodología específica de cada test se encuentra detallada en DelValls *et al.* (1998a).

Peces

Los peces no han sido muy utilizados en los tests de toxicidad del sedimento aunque han sido ampliamente usados en otros tipos de ensayos tanto letales como crónicos. Comparándolos con los organismos bentónicos, no tienen tanto contacto con el sedimento y así su exposición a las sustancias tóxicas que éstos acumulen son menores. Además, para su utilización en los tests se requiere más carga animal así como más espacio en el laboratorio para su cultivo, lo que resulta en un aumento en el coste. Se realizaron dos tests distintos: para el test que usaba conjuntamente extracto acuoso y sedimento bruto se utilizaron juveniles y para evaluar el efecto de los extractos acuosos se utilizaron larvas. En este estudio se seleccionó la especie *Sparus aurata*, ya que es muy común en la Bahía de Cádiz, se adapta con facilidad a las condiciones de laboratorio y tiene una considerable importancia económica en esta zona y en otras del mundo.

initial colonization and 32 days for exposure). Also, both tests are prone to the additional difficulty of substrate loss.

As an alternative to field testing, the structural and/or functional response of the biota is now recommended to be measured *in situ*. There are numerous approaches to measure them; however, for the purpose of sediment assessment, the use of the resident benthic infauna or nonmigratory benthic fish is the most appropriate, because they are intimately associated with contaminated sediments, either by direct contact through burrowing activity or by actual ingestion of sediment particles. This kind of study is based on taxonomic analyses of the organisms collected from field samples. Taxonomic identifications are performed to the lowest possible level consistent with presently available references. A variety of univariate, graphical/distributional and multivariate methods are employed in the analyses of the biological data set. We have selected three different kinds of measurements to illustrate the example presented in this paper:

1. Univariate measures. Benthic infauna data analyses are based on community descriptive parameters and abundance analyses, which are calculated for each sample and then summarized for each station. Descriptive indices, such as species richness (Margalef's R), Shannon-Wiener diversity (H') and evenness (Pielou's J) are used. Numerical dominance, calculated as the complement of equitability ($1 - J$), is related to the proportions of the major taxonomic groups.
2. Multivariate methods. The triangular matrix of the Bray-Curtis similarity for double square-root transformed species abundance data between all pairs of samples was computed. Clustering was done with a hierarchical, agglomerative method,

Estudios *in situ*

Se han diferenciado dos tipos distintos de estudios *in situ*: bioensayos realizados en el campo versus estimaciones realizadas en función de la estructura del ecosistema estudiado. De hecho, hay varios tipos de estudio, aunque ninguno de ellos goza de gran aceptación, debido principalmente a consideraciones prácticas de reproducibilidad, disponibilidad de un control y el coste del estudio.

Los estudios en el campo se han realizado sobre distintos niveles tróficos; así, por ejemplo, Cairns *et al.* (1979) proponen un test de la colonización de protozoos que determina si esta comunidad, la cual coloniza substratos artificiales, es afectada por las sustancias químicas existentes en dichos substratos (exposición). Burks y Wilhm (1977) describieron un método muy parecido usando substrato artificial para invertebrados bentónicos. Aunque estos tests son suficientemente sensibles para detectar los efectos producidos por los vertidos, necesitan mucho tiempo para su realización (seis semanas para la colonización inicial y 32 días para la exposición). Además, estos tests también están sujetos a una dificultad adicional como es la pérdida de substrato experimental.

Actualmente, y como alternativa, se recomienda medir las respuestas estructurales y/o funcionales del ecosistema *in situ*. Hay diversos métodos para conseguir esto; sin embargo y concretamente para los sedimentos, el más apropiado es el uso de los invertebrados y peces bentónicos, puesto que ellos son los que están en contacto íntimo con el sedimento, bien por ser excavadores o por alimentarse directamente del sedimento. En este tipo de evaluaciones se determinan los distintos organismos, hasta el nivel taxonómico más bajo posible, que han sido recogidos en las distintas estaciones del lugar de estudio. Una vez realizada la identificación taxonómica se emplean una serie

using group-average sorting. The results are displayed in a dendrogram. The species mainly responsible for the dissimilarity among sampling stations were determined using the SIMPER computer program (Clarke, 1993). Significance of differences among stations was tested using the ANOSIM randomization/permutation test (Clarke and Green, 1988). The ordination analyses were carried out by means of non-metric multi-dimensional scaling (MDS), based on the similarity matrix among stations.

3. Abundance-biomass plots (ABC) were produced for each station, following the procedures of Warwick (1986). The tripartite classification of Warwick (1986) and Warwick *et al.* (1987) was used and the results of each station-collection graph were classified as: (a) unstressed, if the biomass curve was above the abundance curve for at least the first three species plotted; (b) highly stressed, if the abundance curve was above the biomass curve for at least the first three species plotted; or (c) moderately stressed, if the curves crossed for the first three species. To quantify the alteration, the SEP (Shannon-Wiener evenness proportion) and DAP (difference between abundance and biomass areas by percent) indices were used, following McManus and Pauly (1990).

RESULTS

Laboratory testing

Interstitial water toxicity test:
Bacteria and rotifers

Figure 1 presents the interstitial water toxicity data obtained from the two assays of the three stations. DelValls *et al.* (1997)

de métodos univariantes, gráficos distribucionales y multivariantes. En este estudio se han seleccionado tres tipos distintos de análisis:

1. Análisis univariante. Este análisis se basa en la utilización de parámetros descriptivos y el estudio de la abundancia de cada especie en cada una de las estaciones consideradas. Los índices descriptivos utilizados son la riqueza específica de Margalef (R), la diversidad de Shannon-Wiener (H') y la equitatividad de Pielou (J). La dominancia se ha calculado como complemento de la equitatividad ($1 - J$).
2. Análisis multivariante. Para realizar este análisis, los datos de abundancia se transformaron mediante la raíz cuadrada para posteriormente conseguir la matriz de similitud usando el índice de Bray-Curtis. El dendrograma se realizó mediante el método aglomerativo usando la agrupación media de las distintas estaciones. Mediante el programa SIMPER (Clarke, 1993), se obtuvieron las especies responsables de la agrupación de las distintas estaciones en el dendrograma. El nivel de significación de las diferencias entre las estaciones se elaboró mediante el test de randomización ANOSIM (Clarke y Green 1988). Por último, se realizó un análisis MDS (*non-metric multi-dimensional scaling*), basándose en la matriz de similitud entre estaciones.
3. Curvas de abundancia y biomasa (ABC) para cada una de las estaciones según el método de Warwick (1986). Para distinguir los resultados obtenidos en estas gráficas se utilizó la clasificación tripartita descrita en Warwick (1986) y Warwick *et al.* (1987): (a) sin estrés, si la curva de biomasa está por encima de la de abundancia al menos en las tres primeras especies representadas;

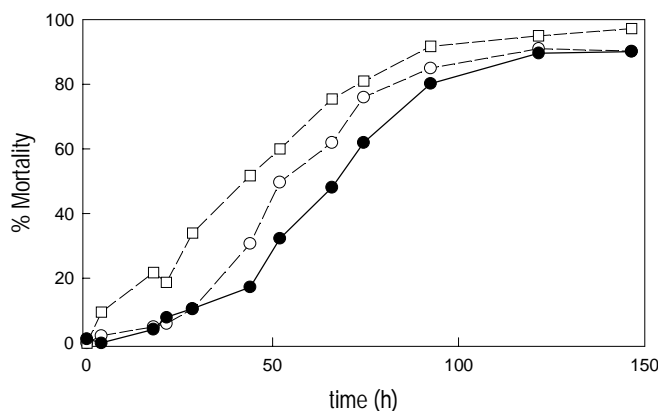


Figure 1. Summarized results of the interstitial water toxicity testing. The graph represents the results from the *Brachionus plicatilis* test. NC (●) represents the negative control. UCS (○) and CS (◻) represent the uncontaminated and contaminated stations, respectively. The bacteria assay did not show any positive toxicity result for any station.

Figura 1. Resumen de los resultados obtenidos en los tests de agua intersticial. El gráfico representa los datos del test de *Brachionus plicatilis*. NC (●) representa el control negativo. UCS (○) y CS (◻) son las estaciones no contaminada y contaminada, respectivamente. El ensayo con las bacterias no mostró ningún efecto para ninguna de las estaciones analizadas.

pointed out that this test underestimates the real toxicity and recommended using a battery of tests. Since the complete life cycle of the rotifer was tested during the assay, the response obtained was highly significant. They were more sensitive to environmental complex mixtures of heavy metals than the Microtox test (fig. 1), especially to the chromium concentrations in interstitial waters (DelValls *et al.*, 1997). These results indicate the reliability of the test for future environmental sediment quality studies when solution phases of the sediment are used (extracts and interstitial waters).

Whole sediment toxicity test:
Benthic invertebrates

Figure 2 summarizes the whole sediment toxicity data obtained from the two assays of the three stations. These data show that clams exposed to sediments from contaminated stations showed slower burial rates than those exposed to noncontaminated stations. Similar

(b) altamente estresado, si la curva de abundancia se encuentra arriba de la de biomasa, al menos en las tres primeras especies; (c) moderadamente estresado, si las curvas de la biomasa y de abundancia se cruzan en las tres primeras especies. Para cuantificar estas modificaciones, se calcularon los índices SEP (proporción entre equitatividad y Shannon-Wiener) y DAP (porcentaje de la diferencia entre el área descrito por la curva de abundancia y aquella descrita por la de biomasa), siguiendo la metodología descrita por McManus y Pauly (1990).

RESULTADOS

Experimentos en el laboratorio

Test de toxicidad sobre agua intersticial:
Bacterias y rotíferos

La figura 1 representa los resultados obtenidos en las tres estaciones estudiadas y

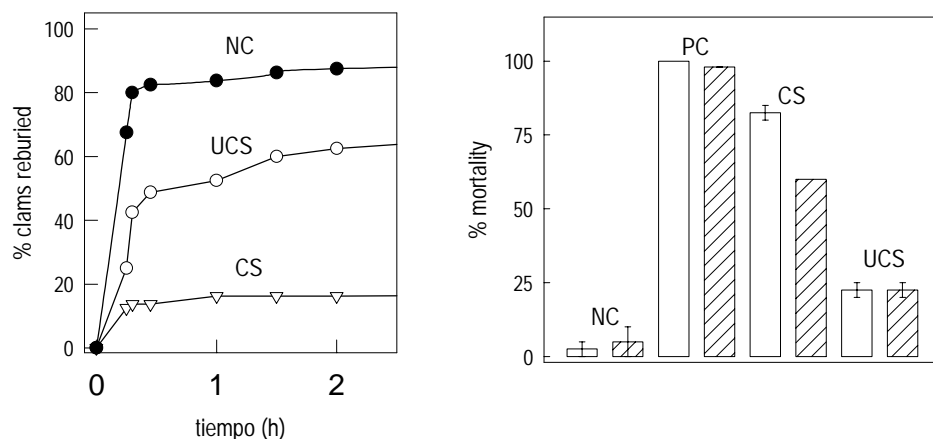


Figure 2. Summarized results of the whole sediment toxicity testing. The graph with lines and symbols shows the percent reburial of *Ruditapes philippinarum* after 48 hours and the histogram shows the seasonality (empty bars = summer, filled bars = winter) in the percent mortality of *Microdeutopus gryllotalpa* after 10 days. NC and PC are negative and positive toxicity controls, respectively. UCS and CS represent the uncontaminated and contaminated stations, respectively.

Figura 2. Resumen de los resultados obtenidos en los tests del sedimento. El gráfico con símbolos y líneas muestra el porcentaje de enterramiento presentado por *Ruditapes philippinarum* después de 48 horas y el histograma presenta la variación espacial (barras claras = verano, barras oscuras = invierno) del porcentaje de mortalidad de *Microdeutopus gryllotalpa* después de 10 días. NC y PC son el control negativo y positivo, respectivamente. UCS y CS son las estaciones no contaminada y contaminada, respectivamente.

trends in toxicity parameters are observed when mortality is evaluated as the end point for the amphipod during 10 days of exposure. The amphipods exposed to the contaminated station showed mortalities similar to the positive control, with mortality in the noncontaminated station close to that measured in the negative control.

Elutriate sediment toxicity data:
Fish and Mollusca

In figure 3, various elutriate toxicity data are outlined, comparing the three stations and both assays (larvae of molluscs and fish). This figure also shows some diseases found during toxicity testing with juveniles of the fish *S. aurata* at the three stations, using the gills as

con los dos métodos usados para evaluar la toxicidad del agua intersticial. Recientemente, DelValls *et al.* (1997) señalaron que el test realizado con la bacteria *P. phosphoreum* subestimaba la toxicidad real del agua intersticial; por ello, estos autores sugirieron la utilización de una batería de distintos tests. Con el ensayo realizado sobre el rotífero, se obtuvieron unos resultados muy significativos debido fundamentalmente a la inclusión del ciclo biológico completo del animal. Además, este test también fue mucho más sensible a la hora de discriminar entre distintas mezclas de metales pesados (fig. 1), sobre todo cuando éstas contenían cromo en el agua intersticial (DelValls *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos hacen de este test un método altamente fiable para futuras evaluaciones de la toxicidad asociada con

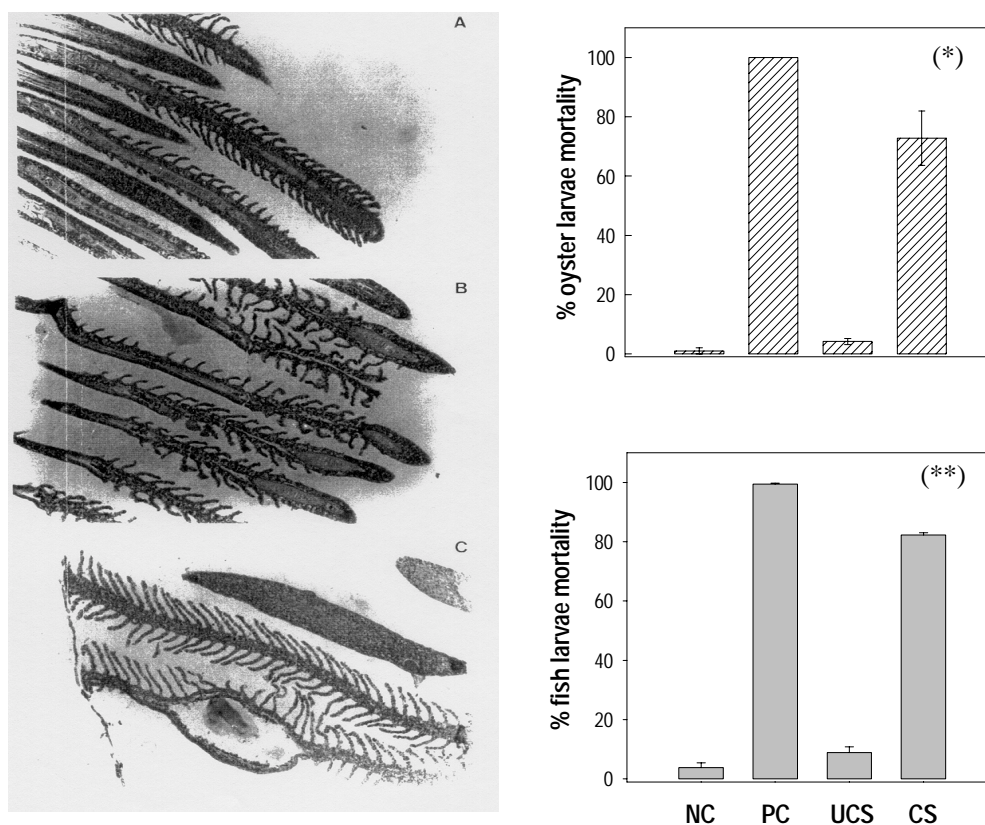


Figure 3. Summarized results of the elutriate sediment toxicity testing. Histological sections show the diseases measured for gills of juveniles of the fish *Sparus aurata* at stations A, B and C, which represent negative control, low contaminated station and contaminated station, respectively. The histogram (*) shows the percent mortality of *Crassostrea angulata* after 48 hours and the histogram (**) shows the percent mortality of *S. aurata* larvae after 72 hours. In the histograms, NC and PC are negative and positive controls of toxicity. UCS and CS represent the uncontaminated and contaminated stations, respectively.

Figura 3. Resumen de los resultados obtenidos en los tests de toxicidad sobre extracto acuoso de sedimento. Los cortes histológicos muestran las enfermedades o anomalías de las branquias de juveniles de *Sparus aurata* en tres estaciones A, B y C, que representan el control negativo, la estación con moderada contaminación y la estación más contaminada, respectivamente. El histograma (*) muestra el porcentaje de mortalidad de *Crassostrea angulata* después de 48 horas y el histograma (**) representa el porcentaje de mortalidad de las larvas de *S. aurata* después de 72 horas. En los histogramas, NC y PC son el control negativo y el positivo, respectivamente. UCS y CS son las estaciones no contaminada y contaminada, respectivamente.

representative tissue (for other tissues see DelValls *et al.*, 1998c).

Field testing

The results of the different ANOVAs and the Scheffe multiple comparison tests ($P < 0.05$) for each univariate measurement of the stations studied are shown in figure 4. In order to perform this analysis and integrate the data, we assumed that clean sites typically have a high number of species, taxonomic groups, high diversity value and that the species are equally represented. We also assumed that Crustacea and Mollusca are more sensitive to pollution than Polychaeta and Oligochaeta. This analysis showed the Barbate River stations to be more stressed than the stations in the Bay of Cádiz, since the former generally had lower values for the number of species, richness, diversity and evenness indices. It is important to note that the strong salinity gradient that affects this area could explain these differences (Cordon *et al.*, 1986). In fact, the Barbate River is strongly influenced by continuous changes in salinity associated with the tidal regime, and the extreme narrowness of the estuarine channel (not more than 3 m wide) (for more details see DelValls *et al.*, 1998d).

The results from clustering the stations using species abundance and biomass data were virtually identical (fig. 5). These analyses showed a clear difference between the stations in the Barbate River and those in the Bay of Cádiz; the CB5 station was the most similar to those of the Barbate River. The MDS configuration for abundance and biomass data confirmed the data of the cluster analyses. Pairwise comparisons derived from the ANOSIM test on the species abundance data showed that the sites were significantly different from each other.

In terms of abundance, the principal contributions to the dissimilarity among the

extractos acuosos de los sedimentos (incluida el agua intersticial).

Test de toxicidad del sedimento bruto:
Invertebrados bentónicos

La figura 2 resume los datos obtenidos en los dos ensayos realizados en las estaciones estudiadas. Estos datos muestran como las almejas expuestas a los sedimentos de la estación contaminada presentaban tasas de enterramiento más lentas que aquellas que se midieron en la estación no contaminada. Una tendencia similar se observa para el parámetro de toxicidad cuando la mortalidad de anfípodos se mide durante un tiempo de exposición de 10 días. Las mortalidades fueron mayores en la estación contaminada y similares al control positivo de toxicidad, siendo la mortalidad medida en la estación no contaminada cercana a aquella establecida en el control negativo de toxicidad.


Tests de toxicidad sobre extracto acuoso de sedimento: Peces y moluscos

La figura 3 representa los resultados obtenidos en los dos ensayos realizados (larvas de moluscos y de peces) comparando las tres estaciones. Esta figura también muestra algunas alteraciones observadas en las branquias, como tejido representativo, de los juveniles *S. aurata* expuestos a los sedimentos contaminados (para otros tejidos ver DelValls *et al.*, 1998c).

Estudio en el campo

La figura 4 muestra los resultados de las diferentes ANOVAs y tests de múltiple comparación de Scheffe ($P < 0.05$) para cada una de las medidas univariantes realizadas en las estaciones. Para integrar estos datos, se consideró que en los sitios limpios y sin estrés hay un alto

DECREASED ALTERATION



	M.S.	BR1	BR2	CB5	CB4	CB1	CB3
S	4.29	<u>3.8</u>	<u>3.8</u>	<u>4.1</u>	<u>10.6</u>	<u>18.2</u>	<u>14.9</u>
A	20.20	<u>CB5</u>	<u>CB4</u>	<u>CB1</u>	<u>CB3</u>	<u>BR2</u>	<u>BR1</u>
		<u>13</u>	<u>51</u>	<u>249</u>	<u>429</u>	<u>342</u>	<u>2.</u>
R	1.47	<u>BR1</u>	<u>BR2</u>	<u>CB5</u>	<u>CB3</u>	<u>CB4</u>	<u>CB1</u>
		<u>0.32</u>	<u>0.34</u>	<u>0.83</u>	<u>1.66</u>	<u>1.74</u>	<u>2.19</u>
H'	1.54	<u>BR1</u>	<u>BR2</u>	<u>CB5</u>	<u>CB3</u>	<u>CB4</u>	<u>CB1</u>
		<u>0.35</u>	<u>0.83</u>	<u>1.64</u>	<u>1.92</u>	<u>2.38</u>	<u>2.76</u>
J	0.21	<u>BR1</u>	<u>BR2</u>	<u>CB3</u>	<u>CB1</u>	<u>CB4</u>	<u>CB5</u>
		<u>0.18</u>	<u>0.44</u>	<u>0.49</u>	<u>0.66</u>	<u>0.71</u>	<u>0.78</u>
%P	10.4	<u>CB3</u>	<u>CB5</u>	<u>CB4</u>	<u>BR2</u>	<u>CB1</u>	<u>BR1</u>
		<u>92</u>	<u>84</u>	<u>54</u>	<u>52</u>	<u>39</u>	<u>6</u>
%O	34.93	<u>BR1</u>	<u>BR2</u>	<u>CB5</u>	<u>CB4</u>	<u>CB3</u>	<u>CB1</u>
		<u>84</u>	<u>82</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
%M	17.74	<u>BR1</u>	<u>BR2</u>	<u>CB3</u>	<u>CB5</u>	<u>CB4</u>	<u>CB1</u>
		<u>0.04</u>	<u>0.07</u>	<u>3.42</u>	<u>5.85</u>	<u>11.6</u>	<u>33.7</u>
%C	20.94	<u>BR1</u>	<u>BR2</u>	<u>CB3</u>	<u>CB5</u>	<u>CB4</u>	<u>CB1</u>
		<u>0.1</u>	<u>0.4</u>	<u>1.6</u>	<u>6.9</u>	<u>12</u>	<u>27</u>

Figure 4. Summary of the ANOVA results for each univariate measure (mean values) in order of decreasing alteration. Treatments not underlined by the same line are significantly different at $P < 0.05$ (Scheffe's F tests). M.S., mean squares; S, number of species; A, abundance; R, species richness; H' , Shannon diversity; J, evenness; %P, percentage of Polychaeta; %O, percentage of Oligochaeta; %M, percentage of Mollusca; %C, percentage of Crustacea; BR1 and BR2, Barbate River stations; CB1 to CB5, stations from the Bay of Cádiz.

Figura 4. Resumen de los resultados de la ANOVA para cada una de las variables univariantes (valores medios) en las estaciones estudiadas ordenadas de mayor a menor alteración. Las estaciones no subrayadas por la misma línea son significativamente diferentes, $P < 0.05$ (F , Scheefe test). M.S., medias; S, número de especies; A, abundancia; R, riqueza específica; H' , diversidad de Shannon; J, equitatividad; %P, porcentaje de poliquetos; %O, porcentaje de oligoquetos; %M, porcentaje de moluscos; %C, porcentaje de crustáceos; BR1 y BR2, estaciones del Río Barbate; CB1 a CB5, estaciones de la Bahía de Cádiz.

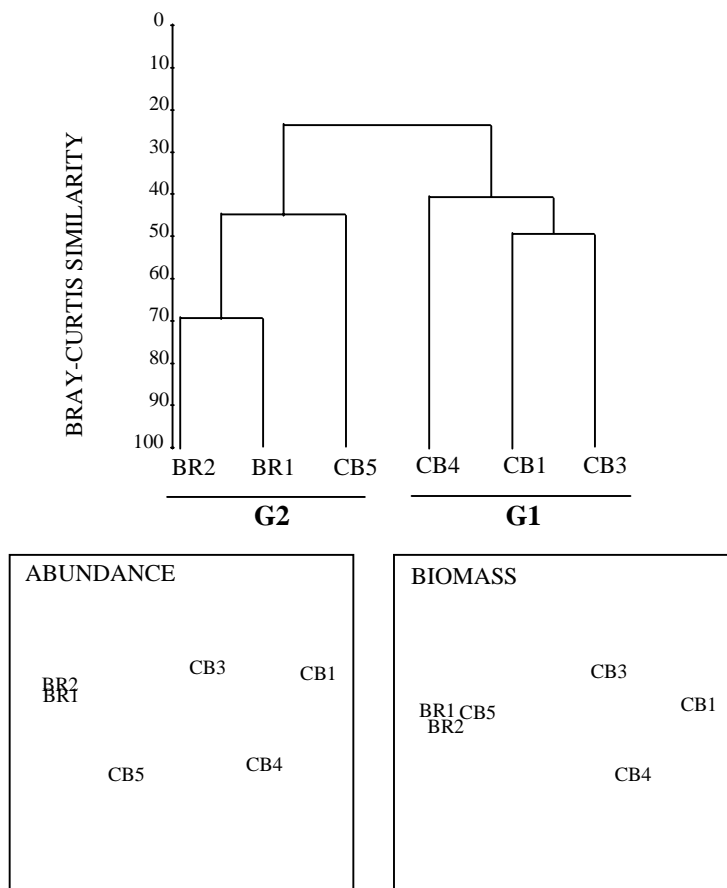


Figure 5. Dendrogram showing classification of six sampling stations and a two-dimensional non-metric multi-dimensional scaling (MDS) plot of the stations, based on a similarity matrix of species abundance and biomass using the Bray-Curtis index. BR1 and BR2, Barbate River stations; CB1 to CB5, stations from the Bay of Cádiz.

Figura 5. Dendrograma y configuración bidimensional del MDS basados en la matriz de similitud de la abundancia y la biomasa de las especies usando el índice de Bray-Curtis. BR1 y BR2, estaciones del Río Barbate; CB1 a CB5, estaciones de la Bahía de Cádiz.

stations come from species that are abundant in the Bay of Cádiz and absent from the Barbate River.

The ABC curves (fig. 6) showed results contrary to the chemical analyses (DelValls *et al.*, 1998b). Thus, the uncontaminated station, which showed low levels for most of the 14 heavy metals analyzed, presented the “grossly

número de grupos taxonómicos, de especies, alto valor de la diversidad y las especies se encuentran equitativamente repartidas. Además, se ha considerado que los crustáceos y moluscos son los grupos taxonómicos más sensibles a la polución, mientras que los poliquetos y los oligoquetos son muy tolerantes. Las estaciones del Río Barbate resultaron estar más

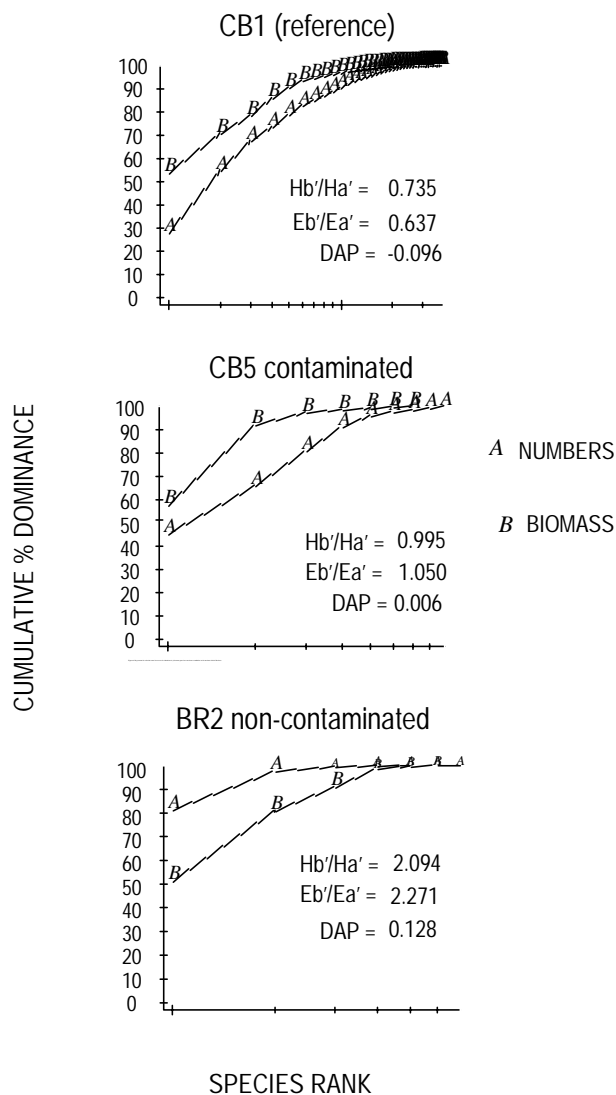


Figure 6. ABC plots for the station used as reference (CB1), and another two considered contaminated (CB5) and uncontaminated (BR2) from DelValls *et al.* (1998b). The results contradict, because the uncontaminated station shows low-stress conditions and the contaminated station does not. The reference station shows unaltered conditions.

Figura 6. Curvas de abundancia y biomasa de la estación usada como referencia (CB1), y las estaciones consideradas como contaminada (CB5) y no contaminada (BR2) tomadas de DelValls *et al.* (1998b). Estas gráficas muestran un resultado contrario a los análisis químicos porque la estación no contaminada presenta una curva de “bajo estrés” y la contaminada de “no estrés”. La estación de referencia muestra condiciones de no estrés.

disturbed" configuration, with the abundance curve above the biomass curve (Warwick, 1986). On the other hand, the contaminated station, characterized by the high level of chemicals associated with industrial activities, e.g., chromium, showed the "undisturbed condition" with the biomass curve above the numbers curve. Thus, this analysis more clearly outlines the natural stress or disturbance, such as organic enrichment or salinity, than contributions from inorganic chemicals.

DISCUSSION

Laboratory testing

Our experience with single-species toxicity tests has proven their utility in ecological assessment, since all the tests made were successful in measuring toxicity in the sediment samples collected from the littoral area of the Gulf of Cádiz. However, it also demonstrated that no single test can be relied upon for detecting impact (Cairns, 1983). Every single test used responded in a unique way that emphasized the intrinsic sensitivity of the fate of the individual chemical or classes of chemicals in the samples. Thus, the seven-day life-cycle test with *B. plicatilis* is more discriminatory between different sources of toxicity than the Microtox test, which is only capable of determining toxicity in the interstitial water extracted from sediments collected near urban point discharges.

The results obtained here also show the importance of the end point selected, which should be made based on ecological relevance and the variability of the responses. Even though survival, superficial alteration and hematocrit of the juvenile *S. aurata* do not indicate differences related to the sediments tested, histological damage in the gills proves to be a useful tool for determining toxic effects with the chemicals bound in sediments. This leaves

estresadas que aquellas de la Bahía de Cádiz, ya que presentaron un menor número de especies, menor riqueza, diversidad y equitatividad. Es importante reseñar que el fuerte gradiente de salinidad al que está sometido el Río Barbate puede ser el causante de estas diferencias (Cordon *et al.*, 1986). De hecho, este río tiene unos cambios muy bruscos de salinidad asociados con el régimen de la marea y también influenciado por ser un estuario muy estrecho (no más de 3 m de ancho) (para más detalles ver DelValls *et al.*, 1998d).

El dendrograma obtenido con los datos de abundancia de las especies es virtualmente idéntico al conseguido con los datos de biomasa (fig. 5). Estos análisis diferenciaron claramente las estaciones del Río Barbate de las de la Bahía de Cádiz, siendo la estación CB5 la más parecida a las del río. La configuración del MDS resultante confirmó los datos obtenidos en estos dendrogramas (fig. 6). El test ANOSIM realizado sobre la matriz de similitud de las abundancias de especies mostró que todas las estaciones son significativamente diferentes unas de otras.

En términos de abundancia, las principales contribuciones a la disimilaridad entre estaciones la realizaron especies que son abundantes en la Bahía de Cádiz y no estuvieron presentes en el Río Barbate.

Las curvas de abundancia y biomasa (fig. 6) muestran un resultado contrario al obtenido en los análisis químicos (DelValls *et al.*, 1998b). La estación no contaminada, la cual tiene unos niveles muy bajos de los 14 metales pesados analizados, presenta la configuración de "altamente estresado", en donde la curva de la abundancia de las especies se encuentra por encima de la de la biomasa (Warwick, 1986). Por el contrario, la estación contaminada, caracterizada por los altos niveles de sustancias químicas asociadas con actividades industriales, como es el cromo, presenta la configuración de "sin estrés", con la curva de

the problem of interpreting the ecological relevance of such an effect. As Moriarty (1983) pointed out, detecting changes at the sub-organismic level (molecular, cellular, etc.) may have little significance for the health and survival of the entire animal.

Therefore, the results highlight the necessity and importance of the battery-of-tests approach for toxicity assessment. Although these tests are invaluable for screening and providing useful information for hazard assessments, they are not representative of typical environmental exposures (i.e., low concentrations over extended periods), nor do they account for potential sublethal responses (e.g., growth and reproduction) elicited by such exposures. Furthermore, dissatisfaction is increasing with the realization that extrapolation from laboratory findings to real-world situations is often impractical (Giddings, 1986). The use of a battery of toxicity tests is very valuable when linking sediment chemistry data by multivariate analyses to derive sediment quantitative guidelines. Moreover, a battery of tests is an essential component of a more comprehensive technique, such as integrative assessments (DeIValis and Chapman, in press), which is the only method with the capacity to describe actual pollution phenomena in an ecosystem. In this sense, we recommend the use of indigenous species more than standardized, nonindigenous species in toxicity testing for marine pollution assessment, referred to as the sediment quality triad.

Field testing

Studying fauna communities of polluted sites in the field (observational field studies) is a suitable approach, in which artificial end points, such as diversity indices and the index of biological integrity (Karr, 1993), have been used, under the assumption that healthy communities will have a high biodiversity (Krebs,

la biomasa por encima de la de abundancia. Este análisis refleja más el estrés natural que puede producir un enriquecimiento en materia orgánica o el fuerte gradiente de salinidad comentado anteriormente que la contaminación por sustancias químicas inorgánicas.

DISCUSIÓN

Experimentos en el laboratorio

Los tests de toxicidad con una única especie han demostrado ser de gran utilidad en la evaluación ambiental, ya que todos y cada uno de los tests realizados en este estudio midieron la toxicidad asociada con las muestras de sedimento recogidas en la Bahía de Cádiz. Sin embargo, también se ha demostrado que este tipo de test no es suficiente para realizar un análisis completo del impacto producido por la contaminación (Cairns, 1983). Cada uno de los tests realizados responde de una manera única que depende de la sensibilidad del organismo a la sustancia química o mezcla de sustancias en el sedimento. De esta forma, el test del ciclo de vida de *B. plicatilis* es mucho más sensible y discriminatorio para diferentes fuentes de contaminación que el test de Microtox, que sólo detecta el efecto tóxico producido por el agua intersticial extraído de sedimentos recogidos cerca de vertidos urbanos.

Los resultados analizados también muestran la importancia de la variable seleccionada en cada test, cuya elección debería hacerse basándose en su importancia ecológica y en la variabilidad en las respuestas a distintos tóxicos. Así por ejemplo, aunque la supervivencia, morfología externa y los hematocritos de los juveniles de *S. aurata* no indicaron ninguna diferencia entre los distintos sedimentos analizados, el estudio de la histología de las branquias demostró ser de gran utilidad para evaluar la toxicidad de dichos sedimentos. Esto nos conduce al problema de la interpretación

1994). Reductions in species diversity, retrogression to opportunistic species and shifts to smaller-sized species are well-documented responses of a community to stress (Forbes and Forbes, 1993). A fall in diversity usually indicates significant pollutant-induced changes, but predation, competition, spatial heterogeneity and successional changes may also influence diversity indices. Likewise, the artificial end points are so strongly influenced by methodological choices that they mask the variability and distribution of organisms within the community, thus creating the illusion of homogeneity where none actually exists (Matthews *et al.*, 1996). Furthermore, some authors (Suter, 1993) state that reducing a community to a single number and placing it on a linear scale between "healthy" and "unhealthy" is ecologically unrealistic. Even pristine ecosystems are subjected to frequent disturbances that can catastrophically alter local biodiversity. Consequently, there is a general agreement among some authors that diversity indices do not reliably reflect pollutant disturbances over time or space (see Ford, 1989; Depledge and Hopkin, 1995; Wildhaber and Schmitt, 1998).

The use of field testing has also been considered inadequate because of the lack of reference sites, mixtures of different pollutants and natural variability of the ecosystem. Indeed, a certain level of stress has been shown to increase the variability of biological attributes at many levels of organization (Forbes *et al.*, 1995), although an increase in the level of stress can cause death, thereby eliminating variation (Forbes and Depledge, 1996).

Moreover, the interpretation of results of these kinds of studies and the establishment of cause-and-effect relationships are very complicated. Modern statistical techniques, such as CANOCO (Ter Braak, 1988) or BIOENV (Clarke and Ainsworth, 1993), have allowed the relationship between environmental variables (including contaminant levels) and

ecológica del efecto medido, ya que como indica Moriarty (1983), el hecho de detectar un efecto a nivel molecular o celular puede tener poco significado a la hora de tener en cuenta la supervivencia del animal.

Por tanto, los resultados ponen de manifiesto la necesidad y la importancia de realizar una batería de tests para la evaluación de la toxicidad. Aunque estos tests son prácticamente la única herramienta para la determinación y evaluación de la toxicidad de las nuevas sustancias químicas, no son representativos de las condiciones existentes en el medio ambiente (i.e., baja concentraciones de tóxicos durante largos periodos) y no tienen en cuenta, en su mayoría, las respuestas o posibles respuestas subletales (e.g., crecimiento y reproducción) producidas por este tipo de exposiciones. Además, existe una insatisfacción creciente debido a la imposibilidad de extrapolar los resultados obtenidos en este tipo de test a la realidad (Giddings, 1986). El uso de una batería de tests de toxicidad no es sólo más útil para relacionarla mediante análisis multivariante a los datos obtenidos en el análisis químico, sino que además es un componente esencial para aplicar los métodos integrados de evaluación de calidad ambiental como el *sediment quality triad* (SQT) (DelValls y Chapman, en prensa), siendo éste el único método con capacidad de reflejar la polución ocurrida realmente en el ecosistema. En este sentido, es recomendable el uso de especies indígenas frente a las estandarizadas para los tests de toxicidad.

Estudio *in situ*

Los estudios utilizando comunidades biológicas de áreas sometidas a algún tipo de contaminación (estudios de observación) son muy comunes. En ellos, las variables analizadas son la diversidad o el índice de integridad biológica (Karr, 1993) y se realizan tras asumir que las

community structure to be investigated and greatly aided the interpretation of complex community data sets. However, the identification of a single causative agent, even with these statistical methods, is complex and empirical and may be completely casual. In fact, the benthic components of the littoral area of the Gulf of Cádiz showed more potential to casualty (natural versus anthropogenic effects) than other components (DeIValis *et al.*, 1998d).

Environmental toxicology is, therefore, caught between *Scylla* and *Charybdis*. On the one hand, purely toxic effects obtained from the standardized tests cannot be extrapolated to the community. On the other hand, a natural community is too complex to be reduced to an index and too unique to provide an unequivocal standard for comparison. Despite these problems, we believe that the comparison of functional measurements of a benthic community (chemical [nutrients, organic and inorganic carbon, and contaminants] fluxes across the sediment-water interface) versus structural measurements, such as benthic community structure, could improve and also standardize this axis in the integrative methods, such as the sediment quality triad (DeIValis *et al.*, 1998a; Forja *et al.*, 1998).

Both methods are valuable in ecotoxicological evaluations, but present serious disadvantages when a global study of environmental quality is required. Ultimately, judgements on environmental quality, assuming the persistence of habitat, can only be determined by the responses or condition of multiple (but never single or a large number of) measurements conducted as part of integrative assessments. The uncertainty and high variability inherent in both ecosystems and methods of measurement require a range of values and a burden-of-evidence approach. This information is necessary to separate responses to anthropogenic disturbance from natural variability (i.e., distinguishing signal from noise). In summary,

comunidades con “buena salud” tienen una alta diversidad (Krebs, 1994). Una reducción en la diversidad, abundancia de especies oportunistas y de pequeño tamaño es una respuesta típica de la comunidad sometida a algún tipo de estrés (Forbes y Forbes, 1993). Si bien un descenso en la diversidad puede indicar un cambio producido por algún tipo de contaminación, la depredación, competitividad entre las especies, heterogeneidad espacial y cambios estacionales pueden también inducir este tipo de cambio. De la misma forma, estas variables están fuertemente influenciadas por la metodología utilizada que puede enmascarar la distribución y variabilidad de las especies dentro de la comunidad, creando una sensación de homogeneidad que realmente no existe (Matthews *et al.*, 1996). Por último y según algunos autores (Suter, 1993), el reducir la comunidad a un único número para caracterizarla dentro de una escala lineal entre el estado “saludable” y “contaminado o estresado” no es real desde el punto de vista ecológico. Incluso, los ecosistemas más puros están sujetos a frecuentes disturbios naturales que pueden alterar drásticamente o ligeramente la diversidad local. Por ello, actualmente existe una aceptación general a la hora de considerar que los índices de diversidad, por sí solos, no reflejan efectos en la polución a lo largo del tiempo o del espacio (ver Ford, 1989; Depledge y Hopkin, 1995; Wildhaber y Schmitt, 1998).

El estudio de la comunidad *in situ* se ha considerado también inadecuado debido a la imposibilidad de encontrar sitios o estaciones que sirvan como referencia o control y que estén exentos de algún tipo de estrés, natural o artificial, y de la variabilidad típica de los ecosistemas. Si el estrés no es muy pronunciado, la variabilidad biológica de la comunidad aumenta en distintos niveles de organización (Forbes *et al.*, 1995); sin embargo, si el nivel de estrés crece, éste puede causar la muerte de las especies poco tolerantes y, por tanto, eliminar

the methods described should be carried out under the precept of integrative and not fragmented science.

ACKNOWLEDGEMENTS

Ángel DelValls thanks the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Spain) for their support of the study in the Gulf of Cádiz (project AMB94-0291).

REFERENCES

- ASTM (1991). Standard Guide for Collection, Storage, Characterization and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing. Publ. E 1391-90. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Burks, S.L. and Wilhm, J.L. (1977). Bioassays with natural assemblage of benthic macroinvertebrates. In: F.L. Mayer and J.L. Hamelink (eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. ASTM, Philadelphia, pp. 127-136.
- Cairns, J. Jr. (1980). Beyond single species toxicity testing. *Mar. Environ. Res.*, 3: 157-159.
- Cairns, J. Jr. (1983). Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia*, 100: 45-57.
- Cairns, J. Jr, Kuhn, D.L. and Plafkin, J.L. (1979). Protozoa colonization of artificial substrates. In: R.L. Wetzel (ed.), *Methods and Measurement of Periphyton Communities: A Review*. ASTM, Philadelphia.
- Chapman, P.M. (1991). Environmental quality criteria: What type should we be developing? *Environ. Sci. Technol.*, 25: 1353-1359.
- Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.*, 18: 117-143.
- Clarke, K.R. and Green, R.H. (1988). Statistical design and analysis for a "biological effects" study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 47-56.
- Clarke, K.R. and Ainsworth, M. (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 92: 205-219.
- la variación producida en el ecosistema (Forbes y Depledge, 1996).
- Otra razón es la interpretación de los resultados obtenidos con este tipo de estudios, en los cuales el establecimiento de las relaciones causas/efectos son muy difíciles. Algunos paquetes estadísticos, como el CANOCO (Ter Braak, 1988) o el BIOENV (Clarke y Ainsworth, 1993), permiten estudiar las posibles relaciones entre las variables ambientales medidas (incluyendo niveles de contaminación) y la estructura de la comunidad, lo que ayuda mucho a la hora de interpretar los resultados. Sin embargo, incluso utilizando estos análisis, la identificación de la causa que origina el efecto producido en la comunidad es complejo y empírico y puede resultar totalmente casual. De hecho, el bentos del litoral de la Bahía de Cádiz parece responder más al estrés natural que a la contaminación detectada por los análisis químicos (DelValls *et al.*, 1998d).
- La ecotoxicología se encuentra, por tanto, entre *Scylla* y *Charybdis*. Por una parte, los datos obtenidos de los tests estandarizados realizados en el laboratorio no pueden ser extrapolados a la comunidad natural. Por el otro lado, las comunidades naturales son demasiado complejas para ser reducidas a un simple número o índice y ofrecer un patrón único de comparación. Debido a estos problemas, nosotros creemos que la comparación de medidas funcionales de la comunidad bentónica (flujos de nutrientes, carbon orgánico e inorgánico, y contaminantes a través de la interfase agua-sedimento) frente a medidas estructurales bentónicas puede mejorar y también estandarizar el componente de alteración *in situ* durante el proceso de integración del método SQT (DelValls *et al.*, 1998a; Forja *et al.*, 1998).
- Concluyendo, ambos métodos son útiles a la hora de realizar evaluaciones ecotoxicológicas pero presentan serias desventajas cuando es

- Cordon, R., Cabrera, F. y Arramburi, P. (1986). Concentraciones de metales pesados en agua, sedimentos y tres especies de animales (*Crassostrea angulata*, *Dicentrarchus labrax* y *Mugil auratus*) de los estuarios de los ríos Barbate y Guadalquivir. III. Seminario de Química Marina, Cádiz, España, pp. 65–71.
- Depledge, M.H. and Hopkin, S.P. (1995). Methods to assess effects on brackish, estuarine, and near-coastal water organisms. In: R.A. Linthurst, P. Bourdeau and R.G. Tardiff (eds.), *Methods to Assess the Effects of Chemicals on Ecosystems*. SCOPE, John Wiley, pp. 125–149.
- 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. and Chapman, P.M. *Advances in ecotoxicology: the use of integrative assessments (the sediment quality triad) to evaluate environmental quality*. *Okeanologiya* (in press).
- DelValls, T.A., Lubián, L.M., González-delValle, M. and Forja, J.M. (1996). Evaluating decline parameters of rotifer *Brachionus plicatilis* populations as an interstitial water toxicity test. *Hydrobiologia*, 341: 159–167.
- DelValls, T.A., Lubián, L.M., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (1997). Comparative ecotoxicity of interstitial waters using Microtox® and the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(11): 2323–2332.
- DelValls, T.A., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (1998a). An integrative assessment of sediment quality in littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(6): 1073–1084.
- DelValls, T.A., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (1998b). The use of multivariate analysis to link sediment contamination and toxicity data to establish sediment quality guidelines: an example in the Gulf of Cádiz (Spain). *Ciencias Marinas*, 24(2): 127–154.
- DelValls, T.A., Blasco, J., Sarasquete, M.C., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (1998c). Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish *Sparus aurata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41: 157–167.
- necesario un estudio de calidad medioambiental global. Finalmente, la determinación de la calidad ambiental, asumiendo la persistencia en la estabilidad del hábitat, sólo puede ser determinada por las respuestas o las condiciones de múltiples medidas (nunca individual o gran número de ellas) diseñadas como parte de una evaluación integrada. La incertidumbre y la alta variabilidad inherentes tanto a los ecosistemas como a los métodos de medida necesitan de un amplio abanico de valores estrecha y claramente relacionados con los daños ambientales. Esta información es necesaria para discriminar entre el efecto antropogénico de aquel debido a causas naturales (i.e., diferenciar la señal de medida de la de fondo). En conclusión, los métodos descritos deben ser utilizados desde un punto de vista de ciencia integrada y nunca fragmentada.

AGRADECIMIENTOS

Ángel DelValls agradece a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) de España por la financiación del proyecto AMB94-0291 realizado en la Bahía de Cádiz.

Traducido al español por los autores.

-
- DelValls, T.A., Conradi, M., García-Adiego, E., Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (1998d). Analysis of macrobenthic community structure in relation to different environmental sources of contamination in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz (SW Spain). *Hydrobiologia*, 358: 59–70.
- DeZwart, D. and Slooff, W. (1983) The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. *Aquat. Toxicol.*, 4: 129–138.
- Forbes, V.E. and Forbes, T.L. (1993). *Ecotoxicology in Theory and Practice: A Critique of Current Approaches*. Chapman and Hall, London, 247 pp.

- Forbes, V.E. and Depledge, M.H. (1996). Environmental stress and the distribution of traits within populations. In: D.J. Baird, L. Maltby, P.W. Greig-Smith and P.E.T. Douben (eds.), *Ecotoxicology: Ecological Dimensions*. Chapman and Hall, London (in press).
- Forbes, V.E., Moller, V. and Depledge, M.H. (1995). Intrapopulation variability in sublethal response to heavy metal stress in sexual and asexual gastropod populations. *Funct. Ecol.*, 9: 477–484.
- Ford, J. (1989). The effects of chemical stress on aquatic species composition and community structure. In: S.A. Levin, M.A. Harwell, J.R. Kelly and K.D. Kimball (eds.), *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag, New York, pp. 99–144.
- Forja, J.M., Ortega, T., DelValls, T.A. and Gómez-Parra, A. (1998). Influencia de la actividad antropogénica sobre los flujos bentónicos de carbono inorgánico en la Península Ibérica. *Proc. IX Seminario de Química Marina*, 16–19 de abril de 1998, Aveiro, Portugal, pp. 49–51.
- Genoni, G.P. (1997). Towards a conceptual synthesis in ecotoxicology. *Oikos*, 80: 96–106.
- Giddings, J.M. (1986). Protecting aquatic resources: An ecologist's perspective. In: T.M. Poston and R. Purdy (eds.), *Aquatic Toxicology Environmental Fate*. ASTM STP 921. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 97–106.
- Karr, J.R. (1993). Defining and assessing ecological integrity: Beyond water quality. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1521–1531.
- Krebs, C.J. (1994). *Ecology*. 4th ed. Harper Collins College Publishers, New York, 782 pp.
- Matthews, R.A., Landis, W.G. and Matthews, G.B. (1996). The community conditioning hypothesis and its application to environmental toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(4): 597–603.
- McManus, J.W. and Pauly, D. (1990). Measuring ecological stress: Variations on a theme by R.M. Warwick. *Mar. Biol.*, 106: 305–308.
- Moriarty, F. (1983). *Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press, London, 248 pp.
- Suter, G.W., II (1993). A critique of ecosystem health concepts and indexes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1533–1539.
- Ter Braak, C.J.F. (1988). CANOCO: A FORTRAN program for canonical community ordination by [partial] [detrended] [deleted] correspondence analysis, principle components analysis and redundancy analysis (version 2.1). Rep. LWA-88-02, Agricultural Mathematics Group, Wageningen.
- Vitkus, T., Gaffney, P.E. and Lewis, E.P. (1985). Bioassay system for industrial chemical effects on the water treatment process: PCB interactions. *J. Water Pollut. Cont. Fed.*, 57: 935–941.
- Warwick, R.M. (1986). A new method for detecting pollution effects on marine macrobenthic communities. *Mar. Biol.*, 92: 557–562.
- Warwick, R.M., Pearson, T.H. and Ruswahyuni, A. (1987). Detection of pollution effects on marine macrobenthos: Further evaluation of the species abundance/biomass method. *Mar. Biol.*, 95: 193–200.
- Wildhaber, M.L. and Schmitt, C.J. (1998). Indices of benthic community tolerance in contaminated Great Lakes sediments: Relations with sediment contaminant concentrations, sediment toxicity, and the sediment quality triad. *Environ. Monitor. Assess.*, 49: 23–49.
- Zapp, J.A. Jr (1980). Historical considerations of interspecies relationships in toxicity assessment. In: J.G. Parrish and A.C. Hendricks (eds.), *Aquatic Toxicology*. ASTM, Philadelphia, pp. 2–10.