

*Nota de Investigación/Research Note*

Nivel de contaminación de sedimentos afectados por el vertido del *Prestige*  
y sus efectos sobre el desarrollo embrionario del erizo de mar

Level of contamination in sediments affected by the *Prestige* oil spill  
and impact on the embryo development of the sea urchin

N Fernández<sup>1\*</sup>, A Cesar<sup>1,2</sup>, M González<sup>3</sup>, TA DelValls<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Polígono Río de San Pedro s/n 11510, Puerto Real Cádiz, España. \* E-mail: nuria.fernandez@uca.es

<sup>2</sup> Laboratorio de Ecotoxicología, Universidad Santa Cecilia, Santos, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Submarinas (CIS, S.L), Santiago de Compostela, España.

### Resumen

Transcurridos 18 meses desde el desastre provocado por el accidente del buque petrolero *Prestige*, se evaluó el estado de polución del sedimento de varios puntos de la costa gallega afectados en diferente grado por el vertido. Para ello se integraron datos de concentración de metales e hidrocarburos totales en sedimento, con datos de toxicidad de dichos sedimentos sobre embriones de erizo de mar, obtenidos mediante bioensayos realizados con un extracto acuoso del sedimento (lixiviado) conteniendo la fase soluble del fuel. Los resultados de los análisis químicos muestran que en algunos puntos se concentran niveles significativamente elevados de hidrocarburos y metales y además en algunos de estos casos pueden pasar a la columna de agua quedando disponibles para los organismos planctónicos, como demuestran los resultados de los bioensayos realizados con las fases larvianas de una especie local de erizo de mar (*Paracentrotus lividus*).

*Palabras clave:* Fuel-oil, sedimento, bioensayo, erizo de mar, ecotoxicología.

### Abstract

The level of contamination in sediments from several sites on the coast of Galicia (Spain) diversely affected by the *Prestige* oil spill was evaluated 18 months after the accident. Data of metal and total hydrocarbon concentrations in sediments were integrated with data on the toxicity of these sediments on sea urchin embryos, obtained through bioassays using an aqueous sediment extract (elutriate) containing the soluble phase of fuel. The results of the chemical analyses show that significantly high levels of hydrocarbons and metals accumulate at some localities. Moreover, in some of these cases, they can enter the water column and become available to planktonic organisms, as shown by the results of the bioassays using the larval phases of a local species of sea urchin (*Paracentrotus lividus*).

*Key words:* fuel oil, sediment, bioassay, sea urchin, ecotoxicology.

### Introducción

El sedimento es uno de los compartimentos ambientales más importantes para el estudio y seguimiento de la calidad ambiental de los ecosistemas litorales, ya que en él se acumulan la mayor parte de los contaminantes que entran en el medio marino (Ingersoll 1995), llegando a alcanzar concentraciones muy superiores a las de la columna de agua. Este proceso de acumulación es especialmente relevante en el caso de contaminación por petróleo o sus derivados, en los que la mayor parte de los constituyentes son compuestos muy hidrófobos y con una fuerte tendencia a adherirse al material particulado y depositarse en el fondo. Por ello, se escogió este compartimento para hacer un estudio comparativo del estado de varias zonas afectadas en distinto grado por el vertido del *Prestige*, tanto desde el punto de vista fisicoquímico, midiendo el nivel de

### Introduction

Sediment is one of the most important environmental compartments for studying and monitoring the quality of coastal ecosystems, since most of the pollutants released into the marine environment accumulate there (Ingersoll 1995). Concentrations in sediment can be much higher than in the water column. This process of accumulation is particularly relevant in the case of contamination by petroleum or its derivatives, in which most of the components are very hydrophobic compounds, with a strong tendency to adhere to particulate matter and deposit on the bottom. We have therefore chosen this compartment for a comparative study of the condition of several zones affected to a different degree by the *Prestige* oil spill, both from a physicochemical viewpoint, measuring the level of pollutants and other associated parameters, and from a

contaminantes y otros parámetros asociados, como desde el punto de vista toxicológico, mediante el uso de uno de los bioensayos más frecuentemente utilizados en la evaluación de la calidad ambiental de ecosistemas litorales (Kobayashi 1991, USEPA 1998, Carr *et al.* 1996, Beiras *et al.* 2001), que es el bioensayo de embriogénesis del erizo de mar. Se trata de un ensayo en fase líquida utilizando un lixiviado del sedimento, que nos da información sobre la toxicidad de la fracción hidrosoluble del fuel-oil, que es la más susceptible de afectar a la variedad de organismos que viven en la columna de agua o se alimentan de ella.

## Material y métodos

### *Toma de muestras*

Las muestras fueron tomadas en mayo de 2004. Se eligieron ocho estaciones (A, B, C, D, E, F, G, H) en puntos afectados en diferente grado por el vertido, situados en las desembocaduras de las rías de Vigo y Pontevedra (NO de la Península Ibérica). Se recogieron muestras de sedimento submareal utilizando una draga Van Veen. Las muestras destinadas a los análisis fisicoquímicos fueron trasladadas al laboratorio y mantenidas en frío hasta el momento de los análisis, que se realizaron en las semanas subsiguientes a la toma de muestras. Las muestras destinadas a los ensayos de toxicidad fueron trasladadas al laboratorio, enviadas a la Universidad de Cádiz en frío (4°C) y conservadas a esta temperatura hasta la realización de los ensayos de toxicidad, una semana después de la toma de muestras.

### *Análisis fisicoquímicos*

Se realizó el análisis granulométrico mediante tamizado en húmedo siguiendo la norma NLT 104/91 (2001). El contenido en materia orgánica se estimó por ignición de sedimento seco a 450°C durante 6 h, una vez eliminados los carbonatos mediante un ataque ácido (Buchanan 1984).

Tanto contaminantes orgánicos como inorgánicos fueron analizados en la fracción fina del sedimento (<63 µm). El contenido total de Zn, Cd, Pb, Cu, Ni y Co se determinó por voltamperometría de redisolución anódica, previa digestión con ácido nítrico siguiendo el protocolo descrito por Loring y Rantala (1992).

Los PCBs fueron extraídos con una mezcla de hexano-acetona (1:1) y analizados mediante cromatografía de gases (GC/ECD) siguiendo el protocolo descrito por la Agencia Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 1996). Los hidrocarburos totales fueron extraídos con hexano y analizados mediante espectrometría de rayos infrarrojos (FTIR) en longitud de onda 2930 (USEPA 1978).

Se utilizaron materiales de referencia Panreac calidad AA para Zn, Cd, Pb, Cu, Ni, Hg, y Scharlau calidad ICP para Co, y material de referencia Dr. Ehrenstorfer 20030300 para PCBs. Todos los resultados estuvieron entre 90% y 110% de los certificados.

toxicological viewpoint, using the sea urchin embryogenesis bioassay, one of the most frequently employed in the evaluation of the environmental quality of coastal ecosystems (Kobayashi 1991, USEPA 1998, Carr *et al.* 1996, Beiras *et al.* 2001). It consists of a liquid-phase analysis using a sediment elutriate that provides information on the toxicity of the soluble water fraction of the fuel, which is the most likely to affect the variety of organisms inhabiting the water column or feeding in it.

## Material and methods

### *Sampling*

The samples were collected in May 2004 at eight stations (A, B, C, D, E, F, G, H) affected, to a different degree, by the *Prestige* oil spill, located along the mouths of the Vigo and Pontevedra rias (NW Iberian Peninsula). Subtidal sediment samples were taken using a Van Veen grab. The samples destined for the physicochemical assessments were transported to the laboratory and refrigerated until analysis in the following weeks. The samples destined for the toxicity tests were taken to the laboratory, transported cold (4°C) to the University of Cádiz and kept at this temperature until being analyzed within one week of collection.

### *Physicochemical analysis*

The granulometric analysis was conducted by wet sieving following the NLT 104/91 (2001) norm. Organic matter content was estimated by dry sediment combustion at 450°C for 6 h, after eliminating the carbonates by acid attack (Buchanan 1984).

Both organic and inorganic pollutants were analyzed in the fine sediment fraction (<63 µm). The total content of Zn, Cd, Pb, Cu, Ni and Co was determined by anodic dissolution voltamperometry, after digestion with nitric acid following the protocol described by Loring and Rantala (1992).

The polychlorinated biphenyls (PCBs) were extracted using a mixture of hexane-acetone (1:1) and analyzed by gas chromatography (GC/ECD), according to the US Environmental Protection Agency (USEPA 1996). Total hydrocarbons were extracted with hexane and analyzed by infrared spectrometry (FTIR) at 2930 wavelength (USEPA 1978).

The following reference materials were used: Panreac (AA grade) for Zn, Cd, Pb, Cu, Ni and Hg; Scharlau (ICP grade) for Co; and Dr. Ehrenstorfer 20030300 for PCBs. All results were between 90% and 110% of the certified values.

### *Sea urchin embryo bioassay*

Elutriates were obtained for each sample, mixing problem sediment with control seawater at a ratio of 1:4 (v:v) and stirring through rotation for 30 min (modification of USEPA 1998). Following a 12-h decantation period, the supernatant (elutriate) was removed and salinity, pH and dissolved oxygen

### Bioensayo con embriones de erizo de mar

Se obtuvieron lixiviados para cada muestra, mezclando sedimento problema y agua de mar control en proporción 1:4 (v:v) y agitando la mezcla por rotación durante 30 min (modificación de USEPA 1998). Tras un periodo de decantación de 12 h se retiró el sobrenadante (lixiviado) y se midieron salinidad, pH y oxígeno disuelto. La prueba se desarrolló con este lixiviado y con diluciones del mismo al 25% y al 10%. Se utilizaron recipientes de incubación de polipropileno de 20 mL y se hicieron cuatro réplicas por tratamiento. Como control negativo se utilizó agua de mar filtrada.

Los bioensayos fueron realizados con la especie local de erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Los organismos fueron recogidos por un buceador en el Cabo Trafalgar (costa Atlántica de Cádiz) y trasladados en frío al laboratorio el mismo día del bioensayo. Para la fecundación se utilizaron gametos de una sola pareja siguiendo la metodología descrita por Fernández y Beiras (2001). Los organismos se incubaron a 20°C durante 48 h. La respuesta observada fue el éxito en el desarrollo embrionario, contabilizado como el porcentaje de larvas pluteus normales al final del periodo de incubación. En cada réplica se contabilizó la respuesta sobre 100 individuos.

### Análisis estadístico de los datos

Se estudió la normalidad de los datos aplicando un test de Kolmogorov-Smirnov. La relación entre contaminantes fue determinada mediante correlaciones de Pearson.

La diferencia en la toxicidad de las estaciones se determinó por ANOVA de un factor y test de Tukey, previa normalización de los datos. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico SPSS 11.5 para Windows.

## Resultados

### Análisis fisicoquímicos

La tabla 1 muestra los resultados de los análisis fisicoquímicos. Las estaciones muestreadas son, en general, arenosas y fango-arenosas, variando su porcentaje de finos de 2.12% en H a 70.17% en G. Todas las estaciones mostraron un porcentaje de materia orgánica por debajo del 5%.

En lo que se refiere a los metales, las estaciones A, B, D y G mostraron en general las concentraciones más altas, pudiendo considerarse contaminadas por Cu según las guías de calidad de sedimento elaboradas por DelValls y Chapman (1998) y Riba *et al.* (2003), quienes proponen una guía máxima de calidad para el Cu <98 y <45 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Con respecto a los contaminantes orgánicos, aunque no existen guías de calidad de sedimento para la costa Atlántica, estas cuatro estaciones (A, B, D, G) mostraron un nivel de hidrocarburos totales entre 1,000 y 10,000 veces superior al del resto de las estaciones. No se detectó contaminación por PCBs en ninguna de las estaciones estudiadas.

were measured. The test was conducted using this elutriate and dilutions (25% and 10%) of it; 20-mL polypropylene incubation vials were used and four replicates were made per treatment. Filtered seawater was used as negative control.

The bioassay was carried out using a local species of sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). The organisms were collected by a diver at Cape Trafalgar (Atlantic coast of Cádiz), and transported cold to the laboratory on the same day of the bioassay. Gametes from a single pair were used for fertilization, following the procedure described by Fernández and Beiras (2001). The organisms were incubated at 20°C for 48 h. The response observed was the success in embryonic development, recorded as the percentage of normal pluteus larvae at the end of the incubation period. More than 100 individuals were counted in each replicate.

### Statistical analysis of the data

The normality of the data was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Pearson correlations were used to analyze the relationship among pollutants.

A one-way ANOVA and Tukey's test were applied to determine the difference in the toxicity of the sampling stations, after normalization of the data. All analyses were made using the SPSS 11.5 statistical program for Windows.

## Results

### Physicochemical analysis

The results of the physicochemical analysis are given in table 1. In general, the sediment of the sampling stations consisted of sand and silty-sand, the fine fraction varying from 2.12% at H to 70.17% at G. The amount of organic matter at all stations was below 5%.

Stations A, B, D and G generally had the highest metal concentrations, and can be considered contaminated by Cu according to the sediment quality guidelines derived by DelValls and Chapman (1998) and Riba *et al.* (2003), who proposed maximum Cu values of <98 and <45 mg kg<sup>-1</sup>, respectively.

With regard to organic pollutants, though there are no sediment quality guidelines for the Atlantic coast, these four stations (A, B, D, G) had total hydrocarbon levels 1,000 to 10,000 times higher than the other stations. Contamination by PCBs was not detected at any of the stations studied.

The statistical analysis of the data showed a correlation ( $P < 0.01$ ) among the fine fraction and organic matter contents and the Cu, Pb and Zn concentrations in sediment (table 2). The Kolmogorov-Smirnov test results indicated that all these variables complied with the hypothesis of normality, so parameteric correlations were done (Pearson correlations).

### Sea urchin embryo bioassay

The results of the toxicity tests with sediment elutriates showed a high toxicity at stations B and D (see fig. 1). In

**Tabla 1.** Análisis fisicoquímicos de los sedimentos de las estaciones estudiadas (F = finos, MO = materia orgánica). Las concentraciones de metales pesados, PCBs e hidrocarburos vienen expresadas en mg kg<sup>-1</sup> peso seco. Aparecen en negrita los valores que superan las guías máximas de calidad para sedimentos de la costa Atlántica (Cu: <98 mg kg<sup>-1</sup> y <53 mg kg<sup>-1</sup>) basadas en estudios previos (DelValls y Chapman 1998, Riba *et al.* 2003).

**Table 1.** Physicochemical analysis of the sediments collected at stations A–H (F = fine fraction, MO = organic matter). The concentrations of heavy metals, PCBs and hydrocarbons are expressed in mg kg<sup>-1</sup> dry weight. The values indicated in bold exceed the sediment quality guidelines (Cu: <98 and <53 mg kg<sup>-1</sup>) for the Atlantic coast reported in previous studies (DelValls and Chapman 1998, Riba *et al.* 2003)

Muestra	% F	% MO	Zn	Cd	Pb	Cu	Ni	Co	PCBs	HCtot
A	45.6	3.79	85.3	n.d.	23.4	<b>251.0</b>	1.04	n.d.	n.d.	190
B	59.9	4.61	107.0	n.d.	27.5	<b>160.0</b>	11.7	n.d.	n.d.	137
C	12.9	2.42	55.5	n.d.	14.0	20.8	3.44	2.04	n.d.	n.d.
D	60.9	3.56	101.0	n.d.	30.5	<b>70.9</b>	16.2	n.d.	n.d.	260
E	11.3	0.37	14.0	n.d.	4.1	16.2	4.60	0.29	n.d.	n.d.
F	3.2	0.60	14.7	0.16	2.7	12.8	1.71	0.65	n.d.	n.d.
G	70.2	3.58	114.0	n.d.	29.3	<b>149.0</b>	4.44	n.d.	n.d.	1.30
H	2.12	2.10	76.2	n.d.	26.3	18.5	11.8	0.53	n.d.	n.d.

n.d., por debajo del límite de detección: Cd y Co <0.01 mg kg<sup>-1</sup> PS; PCBs < 0.1 µg kg<sup>-1</sup> PS; HCtot < 0.01 mg kg<sup>-1</sup> PS.

El análisis estadístico de los datos muestra una correlación ( $P < 0.01$ ) entre el contenido en finos, contenido en materia orgánica y concentración en sedimento de Cu, Pb y Zn (tabla 2). Los resultados del test de Kolmogorov-Smirnov indican que todas estas variables cumplen la hipótesis de normalidad por lo que se realizaron correlaciones paramétricas (correlaciones de Pearson).

#### Bioensayos con embriones de erizo de mar

Los resultados de los tests de toxicidad con lixiviados del sedimento muestran una elevada toxicidad en las estaciones B y D (ver fig. 1). En ambos casos el éxito en la embriogénesis de *P. lividus* es completamente nulo si bien desaparece la toxicidad al diluirse el lixiviado. El resto de las estaciones no mostraron toxicidad. La tabla 3 recoge los resultados de los ANOVAs correspondientes mostrando las diferencias entre estaciones para cada uno de los tres tratamientos (lixiviado, lixiviado diluido al 25% y lixiviado diluido al 10%).

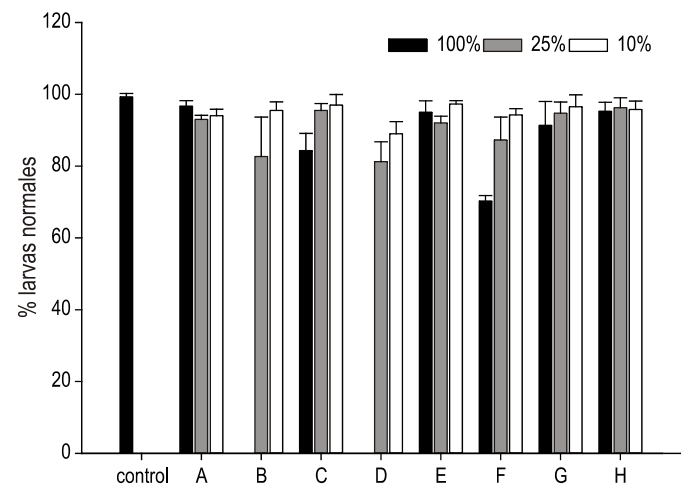
#### Discusión

En cuatro de las estaciones muestreadas (A, B, D y G) se observaron niveles de hidrocarburos muy superiores al del resto de las estaciones y, además, niveles de Cu por encima de las guías de calidad de sedimento existentes para la costa Atlántica española. Es importante destacar que si bien la concentración de hidrocarburos observada en estos puntos es probablemente causada por el vertido (se observaron restos de “chapopote” en las muestras), el nivel de Cu medido no debe ser asociado a la misma fuente, ya que la bibliografía reporta una concentración de Cu en el fuel oil del *Prestige* de 3.4 mg kg<sup>-1</sup> (Prego y Cobelo-García 2004), muy por debajo de los niveles de Cu medidos en dichas estaciones.

both cases the success of embryogenesis in *P. lividus* was null, although toxicity disappeared with dilution of the elutriate. The other stations did not show toxicity. The results of the corresponding ANOVAs are given in table 3, showing the differences among stations for each of the three treatments (elutriate, elutriate diluted to 25% and elutriate diluted to 10%).

#### Discussion

Four of the stations sampled (A, B, D and G) had much higher levels of hydrocarbons than the other stations, as well as



**Figura 1.** Éxito en la embriogénesis de *Paracentrotus lividus* expuestos (48 h, 20°C) a lixiviados (100%) y lixiviados diluidos (25% y 10%) de sedimentos afectados por el vertido del *Prestige*.

**Figure 1.** Success of embryogenesis in *Paracentrotus lividus* embryos exposed (48 h, 20°C) to undiluted (100%) and diluted (25% and 10%) elutriates of sediments affected by the *Prestige* oil spill.

**Tabla 2.** Correlaciones de Pearson entre parámetros fisicoquímicos (F = finos, MO = materia orgánica). Sólo aparecen las correlaciones significativas ( $P < 0.01^{**}$ ,  $P < 0.05^{*}$ ). Se muestran el valor de la correlación (Pearson), la significación bilateral (Sig.) y el número de datos (N).  
**Table 2.** Pearson correlations between physicochemical parameters (F = fine sediment, MO = organic matter). Only the significant correlations ( $P < 0.01^{**}$ ,  $P < 0.05^{*}$ ) are shown. The correlation value (Pearson), bilateral significance (Sig.) and number of data (N) are given.

		% F	% MO	Zn	Cu	Pb
% F	Pearson	–	.838 (**)	.838 (**)	.729 (*)	.737 (*)
	Sig.		.009	.009	.040	.037
	N		8	8	8	8
% MO	Pearson	.838 (**)	–	.940 (**)	.768 (*)	.875 (**)
	Sig.	.009		.001	.026	.004
	N	8		8	8	8
Zn (ppm)	Pearson	.838 (**)	.940 (**)	–	.650	.973 (**)
	Sig.	.009	.001		.081	.000
	N	8	8		8	8

\*\* La relación es significativa al nivel 0.01. \* La relación es significativa al nivel 0.05.

Dos de las cuatro estaciones en las que se observaron niveles elevados de hidrocarburos y Cu (B y D) resultaron, además, muy tóxicas para el desarrollo embrionario del erizo de mar. Los parámetros pH, salinidad, temperatura y oxígeno disuelto de los lixiviados de estas estaciones estuvieron dentro de los niveles óptimos para el desarrollo de la prueba de toxicidad ( $7.6 < \text{pH} < 8.3$ ;  $29.4 < \text{salinidad} < 32.8$ ; temperatura =  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $6.6 \text{ mg L}^{-1} < \text{oxígeno} < 7.7 \text{ mg L}^{-1}$ ). Por tanto, la toxicidad detectada en el lixiviado de los puntos B y D podría en principio atribuirse a la contaminación por hidrocarburos y otros contaminantes como el Cu.

Sin embargo, las concentraciones de estos contaminantes en las estaciones A y G también superan estos niveles, no estando asociadas a efectos biológicos. Esta diferencia de toxicidad entre estas cuatro estaciones, todas ellas con concentraciones altas de hidrocarburos totales, podría ser explicada por una diferencia en la biodisponibilidad de los contaminantes. Concretamente, cabría sospechar que la fracción más tóxica de los hidrocarburos de las estaciones B y D se transfiriera a la columna de agua, mientras que la de las estaciones A y G lo hace de forma menos efectiva, o no lo hace. Esto sería particularmente válido para los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), si aceptamos que este grupo de contaminantes es el principal responsable de la toxicidad del fuel-oil sobre los organismos marinos (Pelletier *et al.* 1997). La biodisponibilidad de estos compuestos aromáticos depende enormemente de sus propiedades fisicoquímicas, del tipo y condición del organismo, y de las características del sedimento contaminado. Los PAHs son compuestos muy poco solubles en agua y con una fuerte tendencia a adsorberse a la superficie de las partículas, lo que favorece su retención en los sedimentos. Los de menor peso molecular (3–4 anillos) son más solubles y presentan una mayor toxicidad aguda. Por el contrario, los de mayor peso molecular y menor solubilidad, no suelen presentar toxicidad aguda, aunque sí efectos subletales tras exposiciones crónicas (Kennish 1997). En cuanto a las características del sedimento,

Cu levels above the sediment quality guidelines for the Spanish Atlantic coast. It is important to note that although the concentration of hydrocarbons found at these sites was probably caused by the oil spill (traces of tar [*chapopote*] were observed in the samples), the Cu level measured cannot be associated with the same source, since a Cu concentration of  $3.4 \text{ mg kg}^{-1}$  was reported for the *Prestige* fuel oil (Prego and Cobelo-García 2004), much lower than the levels of this metal recorded at those stations.

Two of the four stations that had high levels of hydrocarbons and Cu (B and D) were also very toxic for the embryonic development of the sea urchin. The pH, salinity, temperature and dissolved oxygen parameters of the elutriates from these stations were within the optimum levels for the development of the toxicity test ( $7.6 < \text{pH} < 8.3$ ;  $29.4 < \text{salinity} < 32.8$ ; temperatura =  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $6.6 \text{ mg L}^{-1} < \text{oxygen} < 7.7 \text{ mg L}^{-1}$ ). Thus, the toxicity detected in the elutriates from stations B and D could be attributed to contamination by hydrocarbons and other pollutants like Cu.

Nevertheless, the concentrations of these contaminants at stations A and G also exceeded these levels and were not related to biological effects. This difference in toxicity among the four stations, all having high concentrations of total hydrocarbons, may be explained by a difference in the bioavailability of the pollutants. Specifically, it would be possible to assume that the most toxic fraction of the hydrocarbons at stations B and D transfers to the water column, whereas at stations A and G it either does it less effectively or not at all. This would be particularly valid for the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), if we accept that this group of pollutants is primarily responsible for the toxicity of fuel oil to marine organisms (Pelletier *et al.* 1997). The bioavailability of these aromatic compounds largely depends on their physicochemical properties, the type and condition of the organisms, and the characteristics of the contaminated sediment. Most PAH compounds are not very soluble in water and have a strong

**Tabla 3.** Se muestran las diferencias significativas de toxicidad ( $P < 0.01$ ) entre el control y las estaciones para los bioensayos con lixiviado no diluido, diluido al 25% y al 10%.

**Table 3.** Significant differences in toxicity ( $P < 0.01$ ) among the control and sampling stations for the bioassays using elutriates (undiluted, diluted to 25% and diluted to 10%).

Tratamiento	Estación	Respuesta media <sup>a</sup> (N = 4)	Significancia ( $P < 0.01$ )	
Elutriado	Control	A	96.67	0.346
		B	00.00	0.000**
		C	84.25	0.000**
		D	00.00	0.000**
		E	95.00	0.058
		F	93.67	0.021
		G	91.33	0.008**
		H	95.25	0.067
Elutriado 25%	Control	A	93.00	0.018
		B	82.67	0.000**
		C	95.50	0.178
		D	81.25	0.000**
		E	96.75	0.018
		F	87.25	0.000**
		G	94.75	0.122
		H	96.25	0.389
Elutriado 10%	Control	A	94.00	0.015
		B	95.50	0.089
		C	97.00	0.683
		D	89.00	0.000**
		E	97.25	0.436
		F	94.25	0.019
		G	96.50	0.350
		H	95.75	0.129

<sup>a</sup> Para el análisis estadístico se utilizó la respuesta normalizada como se indica en el texto. Aquí se muestran % de respuesta para facilitar la interpretación.

\*\* La diferencia es significativa ( $P < 0.01$ ).

un alto contenido en carbono orgánico disminuye la biodisponibilidad de los compuestos hidrófobos (Knezovich *et al.* 1987). También es importante la distribución granulométrica del mismo ya que los PAHs de alto peso molecular (con menor toxicidad aguda), están generalmente asociados a las partículas más finas (Baumard *et al.* 1998). Por lo tanto, contaminantes provenientes de la misma fuente pueden tener diferente toxicidad en función del lugar geográfico donde se hayan depositado. Por otro lado, una vez que están en el medio marino, los compuestos orgánicos sufren procesos de degradación (principalmente por fotólisis y por acción bacteriana) y de volatilización. A medida que el fuel-oil envejece, los compuestos más volátiles van desapareciendo y el vertido se va enriqueciendo en compuestos de alto peso molecular, menos solubles y por tanto, de baja toxicidad aguda para organismos

tendency to adsorb to particles, which favours their retention in sediments. The lower molecular weight PAHs (3–4 rings) are more soluble and exhibit greater toxicity, whereas those of higher molecular weight and less solubility do not generally exhibit acute toxicity, though they do have sublethal effects after chronic exposures (Kennish 1997). Regarding the characteristics of the sediment, a high content of organic carbon reduces the bioavailability of the hydrophobic compounds (Knezovich *et al.* 1987). The granulometric distribution is also important since the high molecular weight PAHs (less acutely toxic) are generally associated with the finer particles (Baumard *et al.* 1998). Hence, pollutants from the same source can exhibit different toxicity depending on the geographic location where they were deposited. On the other hand, once in the marine environment, organic compounds undergo volatilization and degradation processes (primarily by photolysis and bacterial action). As the fuel oil ages, the most volatile compounds begin to disappear and the spill becomes enriched in compounds of high molecular weight and less solubility, and therefore less acutely toxic to organisms that inhabit the water column. The speed at which these processes occur depends on the local conditions. In this study, the four sampling stations that showed significant contamination are located in geographically different areas (two in Pontevedra Ria and two in Vigo Ria), with varying exposure and climatological conditions and different sediment characteristics. This could explain the difference in the content of these compounds 18 months after the oil spill and, consequently, the different toxicity.

Our results concur with those reported by Mariño-Balsa *et al.* (2003). These authors conducted bioassays using sediment elutriates and detected high toxicity in areas strongly affected by the *Prestige* oil spill, while at other sites where tar balls were found, inhibition of the response was not observed.

The results obtained in this work indicate that this bioassay using elutriates is valid to evaluate the toxicity of sediments affected by the *Prestige* oil spill; however, the difficulty of establishing a clear cause/effect relationship between the biological response and the level of hydrocarbons is evident. It is therefore important to emphasize yet again that a complete evaluation of the effects of the spill will require, owing to the characteristics of these pollutants and to the large area and diversity of habitats affected, an integrated short- and long-term assessment including the analysis of pollutants, toxicity tests using gross sediment and elutriates (such as in this study), biomarkers and *in situ* alteration studies (Carballeira 2003).

### Acknowledgements

This study was funded by the Spanish Ministry of Education and Science (VEM2002-20563/INTER). Augusto Cesar and Nuria Fernández acknowledge receipt of postdoctoral fellowships from the Brazilian Ministry of Education (CAPES/MEC-2558/03-3) and the Spanish Ministry of Education and Science, respectively.

English translation by Christine Harris.

que viven en la columna de agua. La rapidez con la que estos procesos tienen lugar depende de las condiciones locales. En nuestro estudio, las cuatro estaciones con valores significativos de contaminación están situadas en áreas geográficas diferentes (dos en la Ría de Pontevedra y dos en la Ría de Vigo), con condiciones climatológicas y de exposición variadas y sedimentos de distintas características, lo cual podría explicar la diferencia en el contenido de estos compuestos un año y medio después del vertido, y consecuentemente la diferente toxicidad.

Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Mariño Balsa *et al.* (2003), quienes encontraron que bioensayos realizados con lixiviados de sedimento detectaban alta toxicidad en zonas fuertemente afectadas por el vertido del *Prestige*, mientras que en otras con presencia evidente de “chapopote” no se observaba inhibición de la respuesta.

Los resultados de este trabajo indican que este bioensayo con lixiviados es válido para evaluar la toxicidad de sedimentos afectados por el vertido del *Prestige*. Sin embargo también pone en evidencia la dificultad de establecer una relación clara causa-efecto entre la respuesta biológica y el nivel de hidrocarburos, por lo que es necesario remarcar una vez más que una evaluación completa de los efectos del vertido exigiría, debido a la peculiaridad de estos contaminantes y a la gran superficie y diversidad de hábitat afectados, una evaluación integrada que incluya análisis de contaminantes, ensayos de toxicidad con sedimento bruto y con lixiviados (como el presentado en este trabajo), biomarcadores, y estudios de alteración *in situ*, tanto a corto como a largo plazo (Carballeira 2003).

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó dentro del proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (antiguo MCYT) VEM2002-20563/INTER. Augusto Cesar y Nuria Fernández agradecen, respectivamente, al Ministerio de Educación Brasileño (CAPES/MEC-2558/03-3) y al Español de Educación y Ciencia por sus estancias post-doctorales.

## Referencias

- Baumard P, Budzinski H, Michon Q, Garrigues P, Burgeot T, Bellocq J. 1998. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47: 77–90.
- Beiras R, Vázquez E, Bellas J, Lorenzo IJ, Fernández N, Macho G, Mariño JC, Casas L. 2001. Sea-urchin embryo bioassay for *in situ* evaluation of the biological quality of coastal seawater. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52: 29–32.
- Buchanan JB. 1984. Sediment analysis. In: Holme NA, McIntyre AD (eds.), *Methods for the Study of Marine Benthos*. Blackwell, Cambridge, pp. 41–65.
- Carballeira A. 2003. Consideraciones para el diseño de un programa de monitorización de los efectos biológicos del vertido del *Prestige*. *Cienc. Mar.* 29: 123–139.
- Carr RS, Chapman DC, Presley BJ, Biedenbach JM, Robertson L, Boothe P, Kilada R, Wade T, Montagna P. 1996. Sediment pore-water toxicity assessment studies in the vicinity of offshore oil and gas production platforms in the Gulf of Mexico. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 2618–2628.
- DelValls TA, Chapman P. 1998. Site-specific sediment quality values for the Gulf of Cádiz (Spain) and San Francisco Bay (USA), using the sediment quality triad and multivariate analysis. *Cienc. Mar.* 24: 313–336.
- Fernández N, Beiras R. 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10(5): 263–271.
- Ingersoll CG. 1995. Sediment test. In: Rand GM (ed.), *Fundamentals in Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, USA, pp. 231–255.
- Kennish M. 1997. *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. CRC Press, Boca Raton.
- Knezovich JP, Harrison FR, Wilhelm RG. 1987. The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: A review. *Water, Air, Soil Pollut.* 32(1–2): 233–275.
- Kobayashi N. 1991. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in Tabane Bay, Wakayama Prefecture, Japan, 1970–1987. *Mar. Pollut. Bull.* 23: 709–713.
- Loring DH, Rantala RTT. 1992. Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth Sci. Rev.* 32: 235–283.
- Mariño-Balsa JC, Pérez P, Estévez-Blanco P, Saco-Álvarez L., Fernández E, Beiras R. 2003. Evaluación de la toxicidad de sedimento y agua de mar contaminados por el vertido de fuel del *Prestige*, mediante el uso de bioensayos con las almejas *Venerupis pullastra*, *Tappes decussatus* y *Venerupis rhomboideus* y la microalga *Skeletonema costatum*. *Cienc. Mar.* 29: 115–122.
- NLT 104/91. 2001. Granulometría de suelos por tamizado. Orden 5 de febrero de 1991 (Boja 15/2/91).
- Pelletier MC, Burgess RM, Ho KT, Kuhn A, McKinney RA, Ryba SA. 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2190–2199.
- Prego R, Cobelo-García A. 2004. Cadmium, copper and lead contamination of the seawater column on the *Prestige* shipwreck (NE Atlantic Ocean). *Anal. Chim. Acta* 524: 23–26.
- Riba I, Zitko V, Forja JM, DelValls TA. 2003. Deriving sediment quality guidelines in the Guadalquivir Estuary associated with the Aznalcóllar mining spill: A comparison of different approaches. *Cienc. Mar.* 29: 261–274.
- USEPA. 1978. Petroleum hydrocarbons, total recoverable. Storet No. 45501. EPA-418.1. Washington DC.
- USEPA. 1996. Polychlorinated biphenyls (PCBs) by gas chromatography. EPA-8082. Test methods for evaluating solid waste physical/chemical (SW-846). Washington DC.
- USEPA. 1998. Evaluation of dredged material proposed for discharge in waters on the US-testing manual. EPA-823-B-98-004, Washington DC.

*Recibo en abril de 2005;  
aceptado en enero de 2006.*