

Are coastal resources of NW Portugal fingerprinting hydrocarbons
released from the *Prestige* accident?

¿Están los recursos costeros del NO de Portugal mostrando las huellas específicas
de los hidrocarburos derramados por el *Prestige*?

Ana Maria Ferreira*
Cristina Micaelo
Carlos Vale

IPIMAR / Instituto de Investigação Agrária e das Pescas
Av. Brasília, 14449-006 Lisboa
Portugal

* E-mail: amfer@ipimar.pt

Recibida en enero de 2003; aceptada en febrero de 2003

Abstract

Seventy-one samples of mussels, sardine, hake, blue whiting and pouting from the NW Portuguese coast, collected between 18 November 2002 and 6 January 2003, were analyzed for total hydrocarbons, individual n-alkanes and major isoprenoids, pristane and phytane. Hydrocarbons (expressed on chrysene equivalents) registered in whole soft tissues of mussels were below $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$, with a few exceptions (maximum $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$). Relatively low levels and sporadic enhanced values were also found in fish fillet samples. In spite of this, analyses of individual n-alkanes and major isoprenoids showed that 10–61% of the samples (according to the species) exhibited these compounds in the proportions of the *Prestige* fuel signature. Similar diagnostic ratios in biological samples and *Prestige* fuel and n-alkane composition corroborate the fingerprint hypothesis in coastal resources from NW Portugal.

Key words: hydrocarbons, mussels, fishes, *Prestige*, Portugal.

Resumen

Se analizaron los hidrocarburos totales, n-alcenos individuales e isoprenoides mayores, pristano y fitano, en 71 muestras de mejillones, sardina, merluza, bacaladilla y faneca de la costa NO de Portugal, recolectadas entre el 18 de noviembre de 2002 y el 6 de enero de 2003. Las concentraciones de hidrocarburos (expresadas en equivalentes de criseno) registradas en los tejidos blandos de los mejillones fueron menores a $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$, salvo algunas excepciones (máx. $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$). En las muestras de filetes de pescado también se encontraron niveles bajos e incrementos esporádicos de hidrocarburos. A pesar de ello, los análisis de n-alcenos individuales e isoprenoides mayores mostraron que entre el 10 y el 61% de las muestras (dependiendo de la especie) tuvieron estos compuestos en las mismas proporciones que la huella específica del fuel del *Prestige*. Las razones diagnósticas similares en muestras biológicas y en el fuel del *Prestige* y la composición de n-alcenos corroboran la hipótesis de la huella específica dejada por este accidente en los recursos de la costa NO de Portugal.

Palabras clave: hidrocarburos, mejillones, peces, *Prestige*, Portugal.

Introduction

When petroleum products are accidentally discharged into the sea and chemical oil fingerprinting is searched in the ecosystem, selected groups of compounds are usually analyzed: (i) individual saturated hydrocarbons including n-alkanes ($\text{C}_{10}\text{--C}_{40}$) and selected isoprenoids pristane and phytane; (ii) polycyclic aromatic hydrocarbons, specifically alkylated homologues, and (iii) biomarker compounds (Faksness *et al.*, 2002). Among several organisms, mussels are commonly used to monitor the levels of hydrocarbons and other contaminants in coastal environments (Granby and Spliid, 1995). In spite of

Introducción

Cuando se busca la huella química de productos petroleros accidentalmente vertidos en los ecosistemas marinos, usualmente se analizan ciertos grupos de compuestos entre los que se encuentran: (i) hidrocarburos saturados individuales que incluyen a los n-alcenos ($\text{C}_{10}\text{--C}_{40}$) y a ciertos isoprenoides como pristano y fitano; (ii) hidrocarburos aromáticos policíclicos, específicamente homólogos alquilados y (iii) compuestos biomarcadores (Faksness *et al.*, 2002). Entre diversos organismos, los mejillones son comúnmente utilizados para monitorear los niveles de hidrocarburos y otros

fish mobility, residues in their tissues provide general information of contaminant dispersion through the food chain in the coastal zone (Parga-Lozano *et al.*, 2002). In addition, assessment of fish residues is important in terms of human consumption.

This paper is the first attempt to assess the impact of the *Prestige* oil spills on coastal resources from the NW Portuguese coast. This preliminary study reports concentrations of hydrocarbons (chrysene equivalents), individual n-alkanes, major isoprenoids and fingerprint diagnostic indices in mussels, sardine, hake, blue whiting and pouting.

Material and methods

From 18 November 2002 to 6 January 2003, a few days after fuel-oil was discharged by the *Prestige*, the mussel *Mytilus galloprovincialis*, sardine *Sardine pilchards*, hake *Merluccius merluccius*, blue whiting *Micromesistius poutassou* and pouting *Trisopterus luscus* were repetitively captured on the NW Portuguese coast. Mussels ($n = 29$) were collected from intertidal areas of Caminha, Praia de Âncora, Viana and Aveiro, and sardines (11), blue whiting (13), pouting (10) and hake (8) were obtained from the commercial fleet operating on the NW Portuguese coast and from a campaign of the research vessel *Noruega*. All the organisms were measured, weighed and dissected in the laboratory. Composite samples of whole soft tissues of 25 mussels and of 3–5 muscles of each fish species were prepared for each sampling period and station. Hydrocarbons were analyzed in composite samples using two different analytical methodologies. Approximately 10 g of biological samples were extracted in soxhlets with hexane during 6 h. The extracts were cleaned up with florisil and the fluorescence intensity measured at 360 nm with excitation at 310 nm. Values were expressed in chrysene equivalents, a crude estimation of total hydrocarbon. In order to analyze the individual resolved n-alkanes and major isoprenoids, 10 g of the samples were soxhlet extracted with hexane/dichloromethane (4:1); the extracted clean-up was performed in a column filled with 8 g silica and 8 g alumina (pre-treated). The analyses were done by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID). A calibration curve with chrysene standard was used to calculate the hydrocarbons. For resolved n-alkanes, a standard containing a homologous series from C_{12} to C_{36} and pristane was used. All results are expressed in wet weight.

Results and discussion

Hydrocarbons, expressed as chrysene equivalent

The time evolution of hydrocarbon concentrations, expressed as chrysene equivalent, in whole soft tissues of mussels, and in muscle of sardine, hake, blue whiting and pouting is presented in figure 1. Most of the mussel composite samples showed levels below $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ and peak concentrations occurred occasionally (maximum $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$). These

contaminantes en ambientes costeros (Granby y Spliid, 1995). A pesar de la movilidad de los peces, los residuos en sus tejidos pueden aportar información general sobre la dispersión de contaminantes a lo largo de la cadena alimenticia de la zona costera (Parga-Lozano *et al.*, 2002). Además, el análisis de estos residuos en los peces es importante debido a su eventual consumo por el hombre.

Este artículo constituye el primer intento por evaluar el impacto del derrame de petróleo del *Prestige* sobre los recursos de la costa NO de Portugal. Este estudio preliminar reporta las concentraciones de hidrocarburos (equivalentes al criseno), n-alcenos individuales, isoprenoides mayores e índices diagnósticos de sus huellas específicas en mejillones, sardina, merluza, bacaladilla y faneca.

Material y métodos

Del 18 de noviembre de 2002 al 6 de enero de 2003, pocos días después del derrame de fuel por el buque tanque *Prestige*, se capturaron, en repetidas ocasiones, mejillones *Mytilus galloprovincialis*, sardina *Sardine pilchards*, merluza *Merluccius merluccius*, bacaladilla *Micromesistius poutassou* y faneca *Trisopterus luscus* en las costas del NO de Portugal. Los mejillones ($n = 29$) fueron recolectados en las zonas intermareales de Caminha, Praia de Âncora, Viana y Aveiro, mientras que sardinas (11), bacaladilla (13), faneca (10) y merluza (8) fueron obtenidos de la flota comercial que pesca en el NO de Portugal, y de una campaña del buque oceanográfico *Noruega*. Todos los organismos recolectados se midieron y pesaron, además de llevar a cabo su disección en el laboratorio. Para cada periodo y estación de muestreo, se prepararon muestras compuestas de los tejidos blandos completos de 25 mejillones y de 3 a 5 músculos de cada una de las especies de pescado. Los hidrocarburos fueron analizados en las muestras compuestas usando dos metodologías analíticas distintas. Alrededor de 10 g de las muestras biológicas, fueron sujetas a extracción en soxhlets con hexano durante 6 horas. Los extractos fueron limpiados con florisil y se les midió intensidad de fluorescencia a 360 nm, con excitación a 310 nm. Los valores obtenidos se expresaron como equivalentes de criseno, una estimación burda de los hidrocarburos totales. Para analizar los n-alcenos resueltos individuales y los isoprenoides mayores, 10 g de las muestras fueron sujetos a extracción en soxhlets con hexano/diclorometano (4:1), y el extracto se limpió en una columna llena con 8 g de sílica y 8 g de alúmina (pre-tratados). Los análisis se realizaron por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC/FID). Para estimar los hidrocarburos se utilizó una curva de calibración con criseno estándar. Para los n-alcenos resueltos se usó un estándar que contenía series homólogas de C_{12} a C_{36} y pristano. Todos los resultados han sido expresados en peso húmedo.

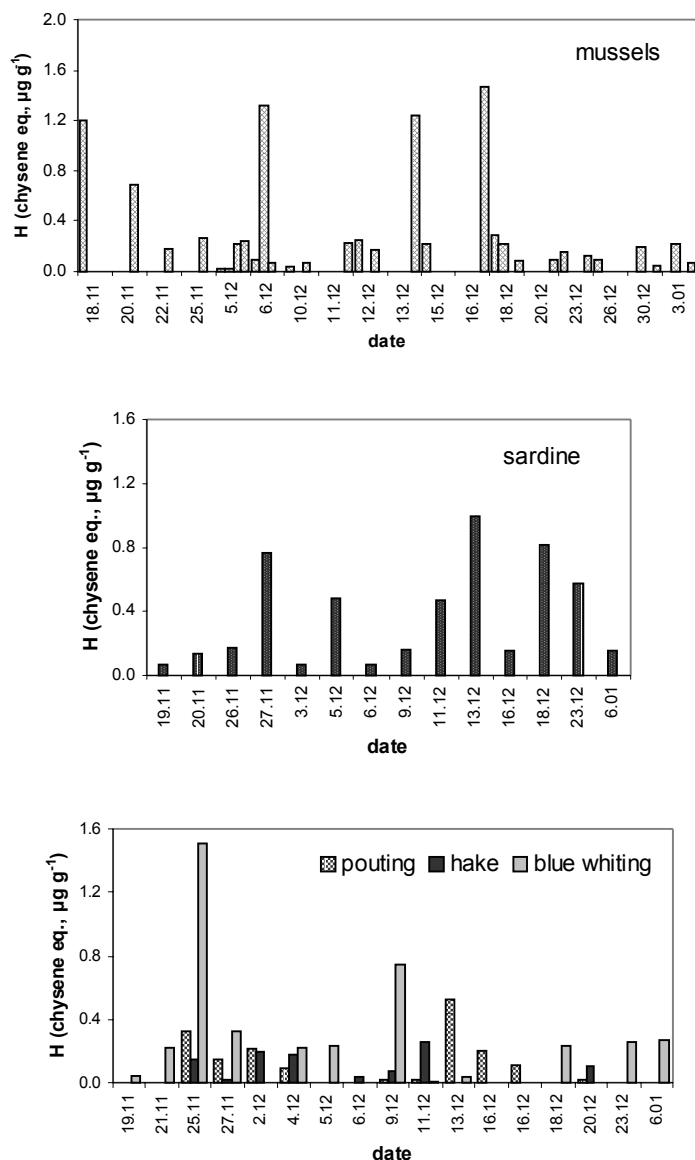


Figure 1. Hydrocarbon concentrations, expressed as chrysene equivalent, in composite samples of mussels (whole soft tissue), sardine, hake, blue whiting and pouting (fillets) from the NW Portuguese coast between 8 November 2002 and 6 January 2003.

Figura 1. Concentraciones de hidrocarburos, expresadas como criseno equivalente, en muestras compuestas de mejillones (tejido blando completo), sardina, merluza, bacaladilla y faneca (filetes) de la costa NO de Portugal entre el 8 de noviembre de 2002 y el 6 de enero de 2003.

levels are far below the concentration registered in mussels in 1994 ($12 \mu\text{g g}^{-1}$) after the near-shore oil spills by the vessel *Cercal* (IPIMAR, 1995). Hydrocarbon concentrations in the fish species analyzed showed a similar pattern: relatively uniform levels and sporadic peak values. Muscle of sardine presented broader concentration ranges than of hake and pouting, and only one composite sample of blue whiting showed a peak maximum. These values ranged in the same concentration intervals reported for the same species caught after the *Cercal* accident. Since the *Cercal* spill occurred close to the intertidal

Resultados y discusión

Hidrocarburos, expresados como equivalente en criseno

La evolución temporal de las concentraciones de hidrocarburos, expresadas como criseno equivalente, en los tejidos blandos completos de mejillones y en los músculos de sardina, merluza, bacaladilla y faneca se presentan en la figura 1. La mayoría de las muestras compuestas presentaron niveles por debajo de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ y, ocasionalmente, se presentaron concentraciones más elevadas, con un máximo de $1.6 \mu\text{g g}^{-1}$. Estos niveles se encuentran muy por debajo de la concentración registrada en mejillones, en 1994 ($12 \mu\text{g g}^{-1}$) después del derrame de petróleo cerca de la costa por el buque *Cercal* (IPIMAR, 1995). Las concentraciones de hidrocarburos en los pescados analizados mostraron un patrón similar: niveles relativamente uniformes y, sólo esporádicamente, valores más elevados. El músculo de sardina presentó un rango más amplio de concentración que el de merluza y faneca, y sólo una muestra compuesta de bacaladilla mostró una concentración muy elevada. Estos valores variaron dentro de los mismos intervalos de concentración reportados para estas mismas especies capturadas después del accidente del *Cercal*. Dado que el derrame del *Cercal* ocurrió cerca de la zona intermareal y la acumulación en peces fue menor, los niveles registrados en las especies analizadas después del accidente del *Prestige* fueron interpretados como de bajos a moderados.

n-Alkanos e isoprenoides

Los productos petroleros vertidos al mar por el accidente del *Prestige* están caracterizados químicamente por hidrocarburos saturados individuales que incluyen los n-alcános C_{12} - C_{35} y los isoprenoides pristano y fitano. Los C_{20} - C_{26} son muy abundantes, mientras que los C_{32} - C_{35} constituyen componentes menores (CEDRE, 2002). La suma de n-alcános (C_{14} - C_{36}) resueltos individuales, pristano y fitano en las muestras biológicas se presenta en la figura 2. En los mejillones se encontraron dos periodos de niveles más elevados (del 18 al 20 de noviembre y del 5 al 13 de diciembre de 2002) debido a la contabilización de la mayoría de los n-alcános resueltos. Los valores más elevados registrados en el primer periodo son el resultado de contribuciones mayores del grupo C_{30} - C_{36} (máx. 60% del total) que corresponde principalmente a aportes terrestres (Bouloubassi y Saliot, 1993). Estos valores reflejan probablemente descargas de aguas de tormenta. La contribución terrestre en el segundo periodo fue menor y los n-alcános presentes en el fuel del *Prestige* resultaron más evidentes. Los compuestos C_{15} , C_{17} y pristano, característicos de material planctónico (Zhou *et al.*, 1996), representan más del 80% en la mayoría de las muestras de sardina. El valor más alto se presentó el 19 de noviembre debido a los valores extremos de pristano (92% del total). La composición de los compuestos analizados fue relativamente uniforme salvo en cinco ocasiones, mostrando una composición de n-alcános

area and accumulation of hydrocarbons in fish was minor, levels registered in the species analyzed after the *Prestige* accident were interpreted as low to moderate.

n-Alkanes and isoprenoids

The petroleum products discharged into the sea by the *Prestige* accident are chemically characterized by individual saturated hydrocarbons, including the n-alkanes C_{12} – C_{35} and the isoprenoids pristane and phytane. The C_{20} – C_{26} are highly abundant and C_{32} – C_{35} minor components (CEDRE, 2002). The sum of individual resolved n-alkanes (C_{14} – C_{36}), pristane and phytane in the biological samples are presented in figure 2. In mussels, two periods of higher levels due to the count of the majority of resolved n-alkanes were found: 18–20 November and 5–13 December 2002. The higher values recorded in the first period resulted from larger contributions of the C_{30} – C_{36} group (maximum 60% of the total) that represents mainly terrestrial inputs (Bouloubassi and Saliot, 1993). These values probably reflect storm-water runoff. The terrestrial contribution in the second period was smaller and n-alkanes existing in the *Prestige* oil showed larger expression. The compounds C_{15} , C_{17} and pristane, which are characteristic of plankton material (Zhou *et al.*, 1996), account for more than 80% in most of the sardine samples. The highest amount was on 19 November due to extreme values of pristane (92% of the total). The composition of the compounds analyzed was relatively uniform except on five occasions, showing composition of n-alkanes comparable to the *Prestige* signature. The majority of the resolved n-alkanes were quantified in hake and blue whiting. Sixty percent of hake and seventy-five percent of blue whiting registered n-alkanes in the proportions of the *Prestige* signature, while the rest of the samples showed higher proportions of shorter-chain compounds. Higher values occurred in the same periods for the two species: 25–28 November and 4–6 December. Since only 40% of the pouting samples presented all individual n-alkanes, the distribution pattern was less defined.

Diagnostic ratios

The fingerprint of the oil spills in biological tissues was assessed by the quantification of all the individual n-alkanes and three diagnostic ratios (Faksness *et al.*, 2002): pristane/phytane (Pr/Pt), C_{17} /Pr and C_{18} /Pt. The ratios in the original fuel of the *Prestige* and the emulsion in seawater determined by CEDRE were 0.9, 2.1 and 1.7, respectively (CEDRE, 2002). The individual compounds present in the samples and the ranges of diagnostic ratios are presented in table 1. Ratios in the samples analyzed varied in broad intervals and the n-alkanes characteristic of *Prestige* fuel were often present. Snedaker *et al.* (1995) observed that some of these indices are more helpful in discriminating between petroleum-

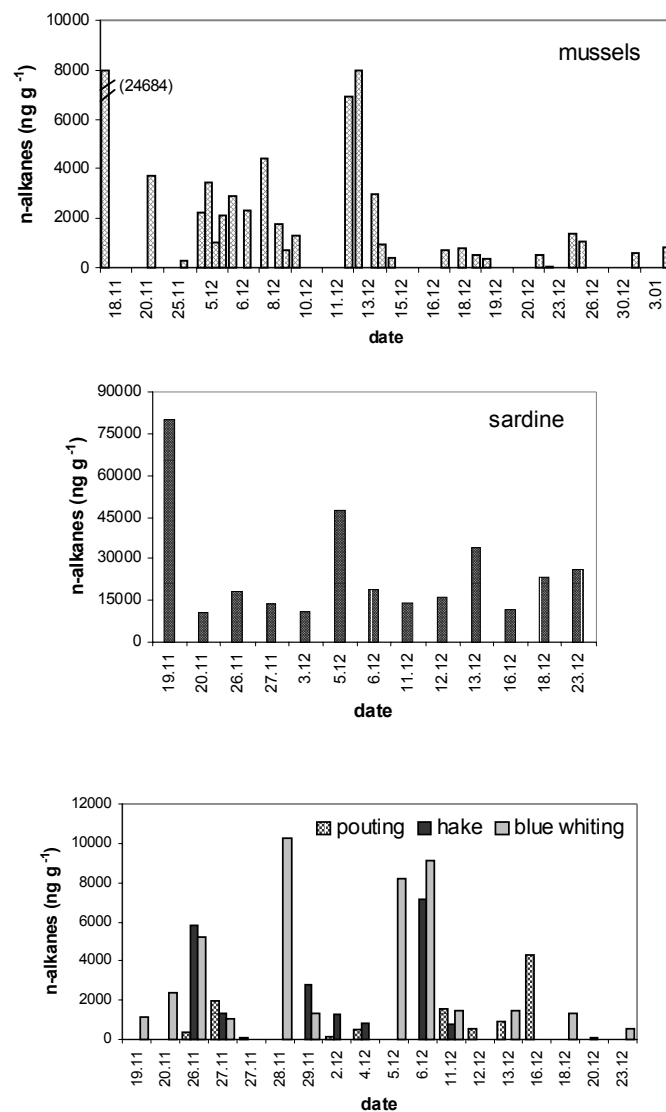


Figure 2. Sum of n-alkanes (C_{14} to C_{36}), pristane and phytane in composite samples of mussels (whole soft tissue), sardine, hake, blue whiting and pouting (fillets) from the NW Portuguese coast between 8 November and 23 December 2002.

Figura 2. Suma de n-alcenos, pristano y fitano en muestras compuestas de mejillones (tejido blando completo), sardina, merluza, bacaladilla y faneca (filetes) de la costa NO de Portugal entre el 8 de noviembre y el 23 de diciembre de 2003.

comparable a la huella específica del *Prestige*. La mayoría de los n-alcenos resueltos se cuantificaron en merluza y bacaladilla. Sesenta por ciento de la merluza y 75% de la bacaladilla analizados registraron las proporciones de n-alcenos de la huella específica del *Prestige*, mientras que el resto de las muestras tuvieron proporciones mayores de compuestos de cadena más corta. Los valores más altos ocurrieron en ambas especies durante los mismos periodos: del 25 al 28 de noviembre y del 4 al 6 de diciembre. Dado que sólo el 40% de las muestras de faneca presentaron todos los n-alcenos individuales, su patrón de distribución fue menos definido.

Table 1. Species, number of samples, individual n-alkanes, ranges of the diagnostic ratios pristane/phytane (Pr/Pt), C₁₇/pristane (C₁₇/Pr) and C₁₈/phytane (C₁₈/Pt), and fingerprint estimation.**Tabla 1.** Especie, número de muestras, n-alcenos individuales, rangos de las razones diagnósticas pristano/fitano (Pr/Pt), C₁₇/pristano (C₁₇/Pr) y C₁₈/fitano y estimación de la huella específica.

	Number of samples	n-Alkanes	Pr/Pt	C ₁₇ /Pr	C ₁₈ /Pt	Fingerprint
Floating fuel		C10–C35	0.9	2.1	1.8	
Mussel	17	C14–C35	0.6–2.9	0.3–2.0	0.1–2.2	yes
	12	incomplete	0.1–320	0.1–2.4	0.1–61	no
Blue whiting	8	C14–C35	0.9–2.8	1.3–1.9	0.9–2.7	yes
	5	incomplete	0.1–135	0.1–2.1	0.1–753	no
Hake	4	C14–C35	0.7–1.7	1.0–1.8	0.7–1.5	yes
	4	incomplete	0.1–50	0.1–1.8	0.1–24	no
Sardine	4	C14–C35	22–76	1.3–5.5	2.0–3.8	yes
	7	incomplete	30–6152	0.1–11	4.2–195	no
Pouting	1	C14–C35	1.2	1.0	1.5	yes
	9	incomplete	0.9–28	0.1–49	0.1–44	no

contaminated and non-contaminated sediments, than for biota. However, the presence of either even- or odd-numbered carbon, which is contrary to the general rule of odd-numbered carbon predominance in marine biotic systems, indicates the influence of petroleum contamination. When n-alkane composition and two of the three diagnostic ratios in the samples were comparable to the characteristics of the *Prestige* fuel, it was considered that biological material fingerprints the oil spills. Despite the lack of hydrocarbon “mousse” in the intertidal zone of the NW Portuguese coast, more than 50% of the mussels analyzed appear to fingerprint the presence of fuel. As a sessile filter-feeder, the mussel has to filter a large amount of water and thereby registered exposure to soluble and particle-associated compounds. The percentage of fingerprinted fish samples varied from 10% for pouting to 61% for blue whiting. This range may be attributed to various factors, such as food web, habitat (pelagic and demersal species), bioaccumulation capacities, etc.

In short, the levels of total hydrocarbon in several species from the NW Portuguese coast are low to moderate, although the analysis of n-alkanes and major isoprenoids revealed the presence of saturated hydrocarbons that, in general, are minor in marine biotic systems. The alteration in composition appears to fingerprint the *Prestige* accident.

Acknowledgements

Several colleagues contributed sampling and analytical assistance: F. Pombal, I. Santos, D. Luz, M. Caetano, P. Antunes, R. Granja, M. Martins, N. Fonseca, J. Raimundo, P. Pereira, J. Canário, P. Brito.

Razones diagnósticas

La huella específica de los derrames de petróleo en los tejidos biológicos se evaluó por medio de la cuantificación de todos los n-alcenos individuales y por tres razones diagnósticas (Faksness *et al.*, 2002): pristano/fitano (Pr/Pt), C₁₇/Pr y C₁₈/Pt. En el fuel original del *Prestige* y en la emulsión determinada por el CEDRE en el agua de mar, estas razones fueron 0.9, 2.1 y 1.7, respectivamente (CEDRE, 2002). En la tabla 1 se muestran los compuestos individuales presentes en las muestras y los rangos de las razones diagnósticas. Éstas variaron ampliamente en las muestras analizadas y, con frecuencia, los n-alcenos característicos del fuel del *Prestige* estuvieron presentes en ellas. Snedacker *et al.* (1995) observaron que algunos de estos índices son más útiles para discriminar entre sedimentos contaminados con petróleo y no contaminados, que para discriminar entre la biota. Sin embargo, la presencia de cadenas de carbón tanto pares como nones, contrariamente a la regla general de que en los sistemas bióticos marinos predominan las cadenas nones, evidencia contaminación por petróleo. Cuando la composición de n-alcenos y dos de las tres razones diagnosticadas en las muestras analizadas resultaron comparables a las características del fuel del *Prestige* se consideró que el material biológico mostraba la huella específica del derrame de petróleo. A pesar de la ausencia de una “nata” de hidrocarburo en la zona intermareal costera del NO de Portugal, más del 50% de los mejillones analizados parece presentar la huella de la presencia del fuel. Como filtroalimentadores sésiles, los mejillones tienen que filtrar grandes cantidades de agua, por lo que registraron la presencia de compuestos tanto solubles como asociados a partículas. El porcentaje de muestras de pescados que presentó las huellas específicas del fuel del

References

- Bouloubassi, I. and Saliot, A. (1993). Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). *Oceanologica Acta*, 16: 145–161.
- CEDRE (2002). Identification du fuel du *Prestige* selon les protocoles et recommandations du groupe de travail européen CEN BT/TF 120 oil identification. Rapport No. GC.02–15, 10 pp.
- Fakness, Liv-Guri, Weiss, H.M. and Daling, P.S. (2002). Revision of the Nordtest Methodology for oil spill identification. SINTEF Rep. No. STF66 A02028, 110 pp.
- Granby, K. and Spliid, N.H. (1995). Hydrocarbons and organochlorines in common mussels from the Kattegat and the Belts and their relation to condition indices. *Mar. Pollut. Bull.*, 30: 74–82.
- IPIMAR (1995). Impacte do derrame de crude pelo navio “*Cerca*”. *Relat. Cient. Téc., Inst. Port. Invest. Marít.*, 6, 63 pp.
- Parga-Lozano, C.H., Marrugo-González, A.J. and Fernández-Maestre, R. (2002). Hydrocarbon contamination in Cartagena Bay, Colombia. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 71–74.
- Snedaker, S.C., Glynn, P.W., Rumbold, D.G. and Corcoran, E.F. (1995). Distribution of n-alkanes in marine samples from southeast Florida. *Mar. Pollut. Bull.*, 30: 83–89.
- Zhou, S., Ackman, R.G. and Parsons, J. (1996). Very long-chain aliphatic hydrocarbons in lipids of mussels (*Mytilus edulis*) suspended in the water column near petroleum operations off Sable Island, Nova Scotia, Canada. *Mar. Biol.*, 126: 499–507.
- Prestige* varió del 10% para la faneca hasta 61% para la bacaladilla. Este intervalo puede ser atribuido a diversos factores, tales como la red alimenticia, el hábitat (especies pelágicas y demersales), la capacidad de bioacumulación, etc.
- En resumen, los niveles totales de hidrocarburos en varias especies de la costa NO de Portugal son de bajos a moderados, no obstante que los análisis de n-alcenos e isoprenoides mayores revelaron la presencia de hidrocarburos saturados que, por regla general, tienen una menor presencia en los sistemas bióticos marinos. La presente alteración de su composición parece ser la huella dejada por el accidente del *Prestige*.

Agradecimientos

Varios colegas asistieron durante el muestreo y los análisis: F. Pombal, I. Santos, D. Luz, R. Granja, M. Caetano, P. Antunes, M. Martins, N. Fonseca, J. Raimundo, P. Pereira, J. Canario y P. Brito.

Traducido al español por Manuel Gardea Ojeda.
