

Nota de Investigación/Research Note

Ejercicio interlaboratorio de bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros en España. II. Ensayo de inhibición de la bioluminiscencia para la evaluación rápida de la toxicidad de sedimentos

Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment

MC Casado-Martínez^{1*}, T Campisi², A Díaz³, R Lo Re⁴, R Obispo⁵, JF Postma⁶,
I Riba⁷, AC Sneekes⁸, JL Buceta⁵, TA DelValls¹

¹ Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España. *E-mail: mcarmen.casado@uca.es

² Centro Ricerche e Servizi Ambientali Fenice, via C. Menotti 48 I, 48023 Marina di Ravenna (RA), Italy

³ GAIKER Centro Tecnológico, Parque Tecnológico, Edificio 202, 48170 Zamudio, España

⁴ Thetis Spa - Castello 2737/F, 30122 Venice, Italy

⁵ CEDEX Centro de Estudios de Puertos y Costas, Antonio López 81, 28026 Madrid, España

⁶ Aquasense Laboratories, PO Box 95125, 1090 Amsterdam, The Netherlands

⁷ Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz

⁸ TNO-B&O, Water System Quality, PO Box 57, NL-1780 AB Den Helder, The Netherlands

Resumen

El presente trabajo resume el ejercicio interlaboratorio realizado para evaluar la variabilidad del ensayo Microtox[®] sobre fase sólida. El ejercicio se dividió en dos fases consecutivas, cada una de ellas desarrollada sobre seis muestras de sedimento de puertos españoles. La Fase I incluyó seis laboratorios y se obtuvieron resultados para el protocolo SPT (*Solid Phase Test*). La Fase II incluyó siete laboratorios y, además de obtenerse resultados del protocolo SPT, tres de ellos utilizaron también el protocolo para la fase sólida BSPT (*Basic Solid Phase Test*). Si bien se han identificado factores que pueden tener un cierto efecto sobre los resultados, y por lo tanto en la clasificación de las muestras, los coeficientes de variación obtenidos pueden considerarse entre los valores normales para ensayos biológicos. Si esto se tiene en cuenta para el análisis de los resultados, especialmente para los de la Fase I, la variabilidad baja considerablemente. El protocolo BSPT obtuvo resultados más consistentes que el protocolo SPT aun contando sólo con los resultados de un número reducido de laboratorios. La mayor simplicidad del ensayo pudo ser la causa de esta menor variabilidad.

Palabras clave: Microtox[®], material de dragado, *Vibrio fischeri*, variabilidad interlaboratorio.

Abstract

The Microtox[®] bioassay was tested in an interlaboratory study to evaluate the variability when using solid-phase samples. The exercise consisted of two consecutive phases each one carried out with six sediment samples from Spanish ports. Phase I included six laboratories that reported results for the solid-phase test (SPT) protocol, while Phase II included seven laboratories for the SPT protocol and three laboratories for the basic solid-phase test (BSPT) protocol. Even though some interfering factors were identified that could affect the results and sample classification, the coefficients of variation (CV) can be considered in the range for biological tests. When these factors are considered for further assessments, interlaboratory variability is significantly reduced. The BSPT showed lower CV values than the SPT despite the small number of participating laboratories. This better performance may be explained either by the simplicity of the methodology.

Key words: Microtox[®], round robin test, dredged material, *Vibrio fischeri*.

Introducción

El ensayo de bioluminiscencia utiliza un cultivo estandarizado de una bacteria marina, *Vibrio fischeri* NRRL B-11177

Introduction

The bioluminescent bacterial test uses a standardized culture of a selected strain of a marine bacterium, *Vibrio fischeri*

(previamente conocida como *Photobacterium phosphoreum*), cuya emisión de luz puede medirse. La luz es emitida como resultado de un ciclo metabólico unido a la respiración celular y, por lo tanto, una interrupción de la respiración celular normal tiene como consecuencia una disminución inmediata de la emisión de luz. Este ensayo se desarrolló inicialmente para evaluar la toxicidad aguda de muestras de agua y aguas residuales así como para extractos (Bulich 1979). Posteriormente este protocolo inicial fue utilizado para la evaluación de la toxicidad de sedimentos mediante la exposición de las bacterias a los lixiviados, al agua intersticial o a extractos con disolventes orgánicos. Aunque este protocolo de ensayo fue ampliamente utilizado para caracterizar sedimentos (Demuth *et al.* 1993, Carr *et al.* 1996), más recientemente se ha adaptado como ensayo sobre la fase sólida. De esta manera, este nuevo protocolo incorpora el contacto directo de las bacterias con las partículas de sedimento, así como con el agua intersticial (Microbics 1992).

El ensayo sobre la fase sólida, denominado Microtox® Solid Phase Test (SPT) fue desarrollado por AZUR Environmental (Carlsbad, CA, USA) y se ha usado durante los últimos años en distintos estudios para evaluar toxicidad aguda (Stronkhorst 2003, Riba *et al.* 2004). El protocolo SPT mide la emisión de luz de las bacterias después de su incubación en contacto directo con una mezcla de sedimento y disolvente, y tras haber sido recuperadas mediante la filtración de la mezcla en estudio. El principal factor de confusión identificado para la interpretación de los resultados está relacionado con la granulometría del sedimento, ya que se ha encontrado un efecto directo del contenido en finos de la muestra sobre la toxicidad registrada (Benton *et al.* 1995, Ringwood *et al.* 1997). El más reciente de los protocolos desarrollados por el proveedor del aparato (AZUR 1998a) para muestras sólidas y de sedimento es el Basic Solid Phase Test (BSPT). Este protocolo, más simple y rápido que el SPT, suprime la filtración y mide la emisión de luz cuando la bacteria está aún en contacto con el sedimento, por lo que la emisión de luz no se ve afectada por las bajas tasas de recuperación de las bacterias durante ese paso adicional. El BSPT se ha usado recientemente en distintos estudios (Mowart and Bundy 2001, Abbondanzi *et al.* 2004, Campisi *et al.* 2005) y su uso para la evaluación inicial de toxicidad parece igualmente recomendable.

Material y métodos

Fase I

La Fase I del ejercicio para el ensayo Microtox® SPT se desarrolló sobre seis muestras de sedimento de puertos españoles distribuidas por la Universidad de Cádiz (Casado-Martínez *et al.* 2006) y según el procedimiento operacional estándar (AZUR 1998b). Los parámetros y las condiciones para el desarrollo del ensayo se incluyen en la tabla 1. Cualquier variación al protocolo inicial se incluyó en el informe final de resultados enviado por cada laboratorio participante. Los resultados del

NRRL B-11177 (formerlly referred to as *Photobacterium phosphoreum*). Light is emitted as a result of a metabolic pathway linked to the cellular respiration, so disruption of normal cellular respiration produces a rapid decrease in light emission. This assay was developed initially for measuring acute toxicity of natural and waste waters and extracted samples (Bulich 1979), and the basic test has been applied to assess sediment toxicity by exposing bacteria to elutriates, extracted pore water and organic solvent extracts. Although this approach has been widely used for sediment characterization (Demuth *et al.* 1993, Carr *et al.* 1996), more recently it was adapted as a solid-phase test, incorporating the direct contact of bacteria with the whole sediment, its particles as well as pore water (Microbics 1992).

The direct-contact assay developed by AZUR Environmental (Carlsbad, CA, USA) is referred to as the Microtox® solid-phase test (SPT) and over the past few years it has been used to screen for sediment acute toxicity in different surveys (Stronkhorst 2003, Riba *et al.* 2004). The SPT measures the light emission of the bacteria that are recovered by filtration after incubation in direct contact with a slurry of whole sediment and diluent medium. The principal factor affecting the results is the sediment granulometry (Benton *et al.* 1995, Ringwood *et al.* 1997). The basic solid-phase test (BSPT), a new Microtox® test for solid samples, was developed by the manufacturer (AZUR 1998a). This protocol, simpler and faster than the SPT, avoids the filtration step and light emission is measured when the bacteria are still in contact with the sediment sample; hence, the light emission measured is not affected by the low recoveries due to the filtration step. The BSPT has recently been used in different studies (Mowart and Bundy 2001, Abbondanzi *et al.* 2004, Campisi *et al.* 2005) and it seems recommendable for sediment toxicity screening.

Material and methods

Phase I

The Microtox® SPT was performed on sediment samples from Spanish ports distributed by the coordinator laboratory (Casado-Martínez *et al.* 2006). Participating laboratories were asked to perform the test following their own protocol or the protocol described in the literature (AZUR 1998b) sent with the samples (table 1). Participants determined the sample toxicity and were asked to report the results as an IC50 (mg L⁻¹) value, equivalent to the calculated test concentration that inhibits 50% of luminescence relative to controls. The IC50 value was derived using the software supplied with the Microtox® Model 500 Analyzer. In addition, each laboratory reported the wet-weight to dry-weight correction and any change to the initial protocol.

Phase II

A second series of sediment samples was distributed in 2004 by the coordinator laboratory (Casado-Martínez *et al.*

Tabla 1. Parámetros y condiciones a seguir para el desarrollo del SPT con la bacteria marina *Vibrio fischeri*.Table 1. Test parameters and conditions to develop the solid-phase test (SPT) using the marine bacteria *Vibrio fischeri*.

Facilities and equipment	Photometer (Microtox® Model 500 Analyzer) reading light output at 490 ± 100 nm; incubator for single cuvette at $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$; controlled-temperature room or incubator at $15 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Reconstitution solution	Pure, nontoxic water
Control/dilution water	Diluent purchased from the same commercial supplier or 3.5% NaCl solution
Test temperature	$15 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Sample pH, salinity and color/turbidity	No adjustment or correction
Aeration	None required
Subsamples for moisture content	Three replicates of 5 ± 0.2 g dried at $100 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 24 h
Primary dilution	7.00 ± 0.05 g whole, homogenized sediment in 35 mL dilution water in a beaker, mixed for 10 min on a magnetic stirrer, at a rate such that the vortex depth is half the height of the liquid level
Test concentrations	Maximum test concentrations normally $197,000 \text{ mg L}^{-1}$ (19.7%, wet wt:vol) on wet-weight basis with two-fold dilutions, for a total of 12 test concentrations in disposable polystyrene tubes; four control solutions; left for 10 min to equilibrate to the test temperature
Test species	<i>Vibrio fischeri</i> strain NRRL B-11177, reconstituted by swirling vial three to four times, and mixed ten times with 0.5 mL pipette and held at $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$ for 30 min
Inoculum	20 μL into each test concentration, mixed three times with 1.5 mL pipette.
Incubation	20 min at test temperature, filter columns inserted into top of SPT tubes above surface of test concentrations
Filtrate transfer	500 μL into disposable glass cuvettes at test temperature
Observations	Light levels of all test filtrates and controls measured
Endpoint	IC ₅₀ (mg L^{-1}), calculated by software; normalized for moisture content of sediment
Reference toxicant	Performed within one month of each test, using suitable positive control sediment and the procedures and conditions for measuring the toxicity of test sediment

ejercicio se recibieron en forma de un valor IC₅₀ (mg L^{-1}), equivalente a la concentración que inhibe el 50% de la luminiscencia con relación a los controles. Para el cálculo de este valor se utilizó el programa informático suministrado con el aparato (Microtox® modelo 500). Cada uno de los laboratorios incluyó también con el informe de resultados los cálculos para la expresión respecto al porcentaje de peso seco de los sedimentos.

Fase II

En 2004, el laboratorio coordinador distribuyó una segunda serie de muestras (Casado-Martínez *et al.* 2006) sobre la que se desarrolló el SPT de acuerdo con el procedimiento operacional estándar. Tres de los laboratorios realizaron el ensayo siguiendo el protocolo BSPT sobre las mismas muestras. El BSPT se desarrolló de acuerdo con el protocolo operacional estándar proporcionado por la casa comercial (AZUR 1998a). Los parámetros y las condiciones para su desarrollo se incluyen en la tabla 2. Aunque se registraron los valores a los 5, 15 y 30 min de incubación sólo se han incluido los resultados de IC₅₀ a los 30 min.

En la tabla 3 se incluyen los laboratorios participantes en cada una de las dos fases y las fechas en las que se desarrolló el

2006). The SPT bioassay was developed according to standard protocol as in Phase I. Three of the laboratories (laboratories 2, 3 and 7) tested the set of samples following the BSPT protocol (AZUR 1998a). Parameters and conditions for the assay and differences between the SPT and BSPT are included in table 2. Although light emission is measured after 5, 15 and 30 min of incubation, only the IC₅₀ results at 30 min were reported. The software supplied with the Microtox® Model 500 Analyzer was used to derive this value.

Data analysis

Interlaboratory precision was estimated by the coefficient of variation (CV) calculated for each sample by dividing the standard deviation (SD) by the mean of the laboratories (X):

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

This value was used to study interlaboratory precision because it is a very descriptive measure and highly comparable with CVs used in analytical chemistry (USEPA 1994). Nevertheless, it should not be the only approach to evaluate test precision, since CVs may reach very high values when testing

Tabla 2. Parámetros y condiciones a seguir para el desarrollo del BSPT con la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Las diferencias con el SPT se marcan con un asterisco.

Table 2. Test parameters and conditions to develop the basic solid-phase test (BSPT) using the marine bacteria *Vibrio fischeri*. Differences between SPT and BSPT are marked with an asterisk.

Facilities and equipment	Photometer (Microtox® Model 500 Analyzer) reading light output at 490 ± 100 nm; incubator for single cuvette at $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$
Reconstitution solution	Pure, nontoxic water
Control/dilution water	Diluent purchased from the same commercial supplier or 3.5% NaCl solution
Test temperature	$15 \pm 0.5^\circ\text{C}$
Sample pH, salinity and color/turbidity	No adjustment or correction
Aeration	None required
Subsamples for moisture content	Three replicates of 5 ± 0.2 g dried at $100 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for 24 h
Primary dilution	7.00 ± 0.05 g whole, homogenized sediment in 35 mL dilution water in a beaker, mixed for 10 min on a magnetic stirrer, at a rate such that the vortex depth is half the height of the liquid level
Test concentrations*	Maximum test concentrations normally $99,000 \text{ mg L}^{-1}$ on wet-weight basis with two-fold dilutions, for a total of 12 test concentrations; two control solutions; left for 10 min to equilibrate to the test temperature
Test species	<i>Vibrio fischeri</i> strain NRRL B-11177, reconstituted by swirling vial three to four times, and mixed ten times with 0.5 mL pipette and held at $5.5 \pm 1^\circ\text{C}$
Inoculum*	10 μL into each test concentration, mixed three times with 1.5 mL pipette
Incubation*	500 μL into disposable glass cuvettes at test temperature
Observations	Light levels of all test concentrations and controls measured
Endpoint	IC50 (mg L^{-1}), calculated by software; normalized for moisture content of sediment
Reference toxicant	Performed within one month of each test, using suitable positive control sediment and the procedures and conditions for measuring the toxicity of test sediment

ensayo. Los laboratorios se identificaron con un número asignado según el orden de realización del ensayo y por lo tanto los números asignados en la Fase II no corresponden al asignado en la Fase I. La Fase I se completó en un plazo de un mes en todos los laboratorios excepto en los laboratorios 6 y 7, donde el ensayo fue realizado posteriormente. La Fase II del ejercicio se completó en menos de 30 días.

Análisis de los datos

Para el estudio de la reproducibilidad interlaboratorio se calcularon los coeficientes de variación (CV) para cada una de las muestras dividiendo la desviación estándar (SD) por la media de los laboratorios (X),

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

Se utilizó este valor para esta estimación de la variabilidad ya que ofrece una medida muy descriptiva y altamente comparable con los CV utilizados en las técnicas para análisis químicos (USEPA 1994). En cualquier caso el CV no debería ser el único método para evaluar la precisión de un ensayo ya que los CVs pueden ser muy altos cuando se estudian muestras

extremely toxic or nontoxic samples. In these cases the CV can be higher than 100% but the results can be within an acceptable range. The upper and lower warning limits ($\text{UWL} = \text{X} + 2 \cdot \text{SD}$ and $\text{LWL} = \text{X} - 2 \cdot \text{SD}$, respectively) were calculated for each sample to avoid subjectivity in the rejection of outliers.

Results

Table 3 summarizes the phase and storage time of the samples before testing at each participating laboratory. A code number was given to each laboratory according to the test date they reported, thus the codes for Phase I are not equivalent to those assigned during Phase II. The results reported by each laboratory for Phases I and II were not compared since it was not the purpose of the exercise. Phase I was completed in one month by all the laboratories except for 6 and 7, which reported results two months later. Phase II was completed successfully in less than one month.

The results of the exercise are summarized in figure 1. The IC50 value of 1000 mg L^{-1} dry weight (Environment Canada 2002) for the SPT was included as reference value to classify the samples according to toxicity results. All samples tested in Phase I (fig. 1a) showed IC50s failing this guideline except for sample A, considered not toxic by all the laboratories even

muy tóxicas o con una toxicidad muy baja. En estos casos el CV puede ser superior al 100% pero las respuestas pueden estar dentro de un rango aceptable. Se calcularon también los valores máximos y mínimos ($UWL = X + 2 \cdot SD$ y $LWL = X - 2 \cdot SD$, respectivamente) para las muestras analizadas para evitar la subjetividad a la hora de descartar los resultados anómalos.

Resultados

La tabla 3 resume la fase y el tiempo de almacenamiento de las muestras previamente al desarrollo del ensayo para cada laboratorio participante. Un código numérico se ha asignado a cada laboratorio de acuerdo a la fecha de ensayo, es decir, los códigos asignados a los laboratorios en la Fase I no tienen por qué corresponder a los asignados en la Fase II. Los resultados enviados por cada laboratorio para ambas fases no se han comparado entre sí ya que quedaba fuera de los objetivos de este estudio. La Fase I se completó en un mes por todos los laboratorios excepto los laboratorios 6 y 7, que enviaron resultados de ensayos realizados tras más de 8 semanas de almacenamiento de los sedimentos. Los resultados para ambas fases del estudio se resumen en la figura 1. Como valor de referencia para la clasificación de las muestras como tóxicas o no tóxicas (principal objetivo en este tipo de ensayos) se utilizó un IC₅₀ de 1000 mg L⁻¹ expresados en peso seco de sedimento para el SPT (Environment Canada 2002). Todas las muestras de la Fase I (fig. 1a) dieron resultados por debajo de este valor excepto la muestra A, la cual fue clasificada como no tóxica por todos los laboratorios aunque con valores de IC₅₀ muy variables. Cada una de las otras cinco muestras fue clasificada como no tóxica por al menos uno de los laboratorios: la muestra E por el laboratorio 4, las muestras B, C y F por el

if the IC₅₀ values are different. The rest of the samples were classified as not toxic by at least one laboratory: laboratory 4 classified sample E as not toxic; laboratory 6, samples B, C and F; and laboratory 7, sample D. Samples tested during Phase II (fig. 1b) were classified more homogeneously except for samples D and E: sample D was considered not toxic by all

Tabla 3. Laboratorios participantes en cada fase del estudio y días después de la recogida de las muestras en que se realizó el ensayo.
Table 3. Laboratories participating in each study phase and days after sediment sampling when tests were performed.

	Laboratory	Days after sediment sampling	Test
Phase I	1	14 days	SPT Phase I
	2	29 days	SPT Phase I
	3	30 days	SPT Phase I
	4	35 days	SPT Phase I
	5	45 days	SPT Phase I
	6	100 days	SPT Phase I
	7	–	SPT Phase I
Phase II	1	3 days	SPT Phase II
	2	8 days	SPT Phase II and BSPT
	3	8 days	SPT Phase II and BSPT
	4	11 days	SPT Phase II
	5	16 days	SPT Phase II
	6	18 days	SPT Phase II
	7	29 days	SPT Phase II and BSPT

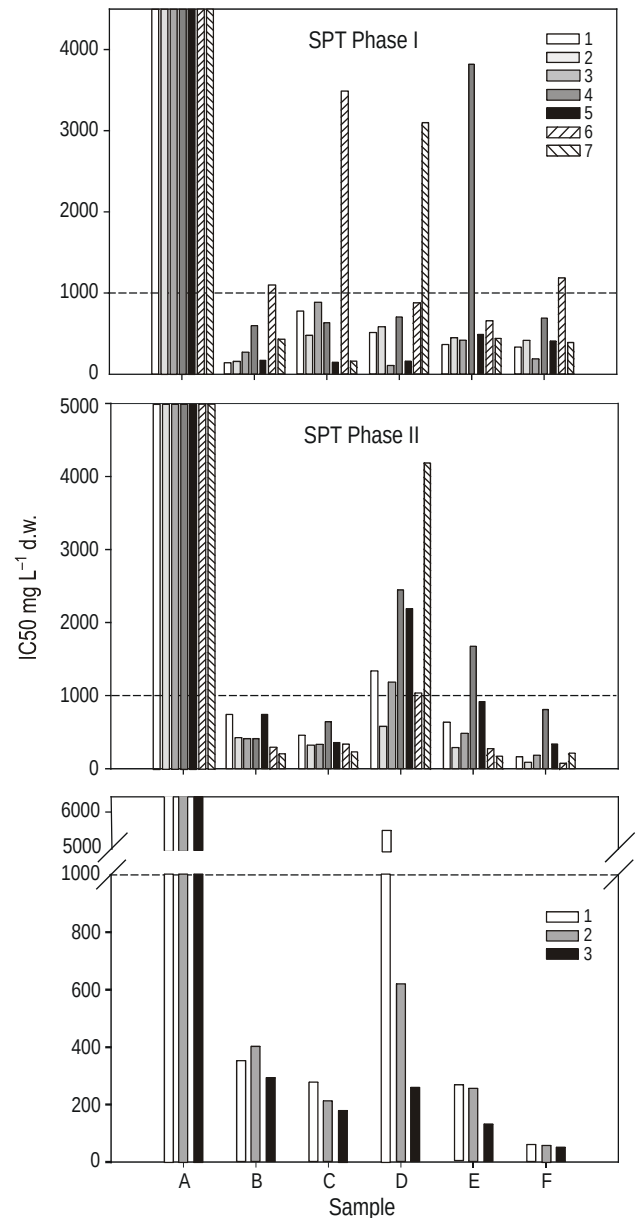


Figura 1. Resultados del bioensayo con *Vibrio fischeri* durante el ejercicio de comparación interlaboratorio. (a) SPT Fase I, (b) SPT Fase II y (c) BSPT Fase II. El valor de 1000 mg L⁻¹ en peso seco canadiense está incluido como valor de toxicidad de referencia.

Figure 1. Results of the *Vibrio fischeri* bioassays during the interlaboratory comparison. (a) Microtox® solid-phase test (SPT) Phase I, (b) SPT Phase II and (c) basic solid-phase test (BSPT) Phase II. The Canadian benchmark of 1000 mg L⁻¹ dry weight is included as the reference toxicity value.

laboratorio 6, y la muestra D por el laboratorio 7. Las muestras ensayadas durante la Fase II (fig. 1b) resultaron clasificadas de manera muy similar, a excepción de las muestras D y E que fueron clasificadas como no tóxica y tóxica, respectivamente, por todos los laboratorios menos uno en cada caso. El protocolo BSPT (fig. 1c) mostró resultados similares en todos los laboratorios participantes excepto para la muestra D que mostró una toxicidad muy distinta en uno de los laboratorios. Dado que no se encontró ningún otro factor de confusión durante el ensayo es posible que esta diferencia fuese debida a la homogeneización y/o muestreo de los sedimentos a la hora de hacer el reparto.

En las tablas 4, 5 y 6 se presentan los resultados de cada laboratorio y el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación, y los valores máximos y mínimos de aceptación de los resultados calculados para cada muestra. Para la Fase I estos valores se calcularon para dos series de datos: una incluyendo los resultados de todos los laboratorios y otra sin incluir aquellos laboratorios que hicieron el ensayo fuera de los límites de tiempo (es decir, excluyendo los resultados de los laboratorios 6 y 7) y excluyendo los datos fuera de los rangos de aceptabilidad (UWL y LWL). Debido al bajo número de casos (laboratorios) los rangos de aceptabilidad de los resultados eran muy amplios, pero en total tres datos se encontraron fuera de ellos: dos datos correspondientes a ensayos realizados después del periodo de conservación de los sedimentos (cuatro

the laboratories except for 2, while sample E failed the toxicity guideline in all cases except for laboratory 4, which reported a higher value. The BSPT results (fig. 1c) were similar for all the laboratories except in the case of sample D, which had different toxicity values.

The IC50 values reported by each laboratory and the X, SD, CV, UWL and LWL are presented in tables 4, 5 and 6. Statistics were performed for two different data sets: one including the results of all the laboratories and the other including only the results of the laboratories that tested the samples in the four weeks after the sampling (i.e., excluding laboratories 6 and 7) and excluding the outliers. The few laboratories involved in the exercise produced very wide UWL and LWL. Nevertheless, three values failed the UWL and were rejected: two obtained after the four-week period and one reported by laboratory 4. The CV varied between 64% and 134%, with a mean CV of 103% when all the laboratories were included. When only the test results of the laboratories that performed the test in the four weeks following the sampling were included in the calculation, the CV ranged from 45% to 75%, with a mean CV of 53%.

The Phase II results classified sample A' as not toxic. Sample C' had a mean IC50 value near 1000 mg L⁻¹ dry weight and the other samples, 500 mg L⁻¹ dry weight or lower. Only one value, reported by laboratory 4, was rejected. The CV ranged

Tabla 4. Valores estadísticos calculados para cada muestra (A–F) de la Fase I del estudio. X', SD', CV', UWL' y LWL' se han calculado para los laboratorios que cumplieron los límites establecidos para el tiempo de conservación de las muestras.
Table 4. Statistical values calculated for each sample (A–F) in Phase I of the study. The mean (X'), standard deviation (SD'), coefficient of variation (CV'), upper warning limit (UWL') and lower warning limit (LWL') were calculated for those laboratories that complied with the limits established for the storage period of the samples.

	A	B	C	D	E	F
Laboratory 1	29026	131.6	774.5	506.6	357.81	330.97
Laboratory 2	34766	147.67	476.89	571.66	442.34	408.42
Laboratory 3	4531	263	880	99	418	184
Laboratory 4	41543	596.7	630	703	3806*	693
Laboratory 5	4748	165	143	158	487	404
Laboratory 6*	11810	1090	3470	870	650	1180
Laboratory 7*	82580	429.96	170.92	3102.7	436.99	390.59
X	29857.71	403.42	935.04	858.71	942.59	513.00
SD	27503.42	347.69	1152.46	1027.49	1265.92	330.77
CV	92.11	86.18	123.25	119.66	134.30	64.48
UWL	84864.55	1098.79	3239.96	2913.69	3474.43	1174.54
LWL	-25149.12	-291.95	-1369.88	-1196.27	-1589.25	-148.55
X'	22922.80	260.79	580.88	407.65	426.29	404.08
SD'	17268.50	194.62	288.07	265.29	53.86	185.25
CV'	75.33	74.62	49.59	65.08	12.63	45.85
UWL'	57459.79	650.03	1157.01	938.23	534.00	774.58
LWL'	-11614.19	-128.44	4.75	-122.92	318.57	33.57

* Values not included in the calculation of the statistical parameters.

Tabla 5. Valores estadísticos calculados para cada muestra (A–F) de la Fase II del estudio. Resultados para el SPT.
Table 5. Statistical values calculated for each sample (A–F) of the solid-phase test in Phase II of the study.

	A	B	C	D	E	F
Laboratory 1	74500	750	450	1330	630	160
Laboratory 2	20255	421	317	573	289	78
Laboratory 3	72533.8	407.93	330.32	1176.03	479.57	177.1
Laboratory 4	Not toxic	414.6	647.8	2446	1677	811.5*
Laboratory 5	242603	748	360.4	2190.4	916.7	343.1
Laboratory 6	9146	283	330	1028	261	68
Laboratory 7	7174.75	209.56	235.4	4185.67	172.43	221.57
X	71035.43	462.01	381.56	1847.01	632.24	101.50
SD	89372.05	211.09	133.44	1221.84	526.44	174.63
CV%	125.81	45.69	34.97	66.15	83.26	58.13
UWL	249779.53	884.19	648.44	4290.69	1685.12	781.47
LWL	–107708.67	39.83	114.68	–596.67	–420.64	–250.25

* Value not included in the calculation of the statistical parameters.

Tabla 6. Valores estadísticos calculados para cada una de las muestras (A–F) de la Fase II del estudio para el BSPT.
Table 6. Statistical values calculated for each sample (A–F) of the basic solid-phase test in Phase II of the study.

	A	B	C	D	E	F
Laboratory 1	31158	349.43	278.64	5872	268.58	60.27
Laboratory 2	Not toxic	402	217	623	258	63
Laboratory 3	12462	294	179	258	131	48.78
X	21810	348.47	224.88	2251	219.19	57.35
SD	13220.07	54.01	50.29	3141.18	76.56	7.55
CV	60.61	15.50	22.36	139.55	34.93	13.16
UWL	48250.14	456.49	325.45	8533.37	372.31	72.44
LWL	–4630.14	240.46	124.31	–4031.37	66.07	42.26

semanas) y un dato proporcionado por el laboratorio 4. Estos datos, que en todos los casos correspondieron a una toxicidad menor a la estimada por el resto de los laboratorios, fueron eliminados de los cálculos posteriores. Cuando se incluyen todos los laboratorios, los CV iban de 64% a 134% con un promedio de 103%. Cuando se excluyen los laboratorios que hicieron sus ensayos a destiempo estos valores se encuentran entre 45% y 75% con un promedio de 53%.

En la Fase II la muestra A' fue clasificada claramente como no tóxica pero igual que en la Fase I con valores de IC50 muy distintos. La muestra C' dió valores alrededor de 1000 mg L⁻¹ y las otras muestras resultaron con valores de 500 mg L⁻¹ o menores. Sólo un valor, proveniente del laboratorio 4, estuvo fuera de los UWL y LWL, y fue excluido del resto de los cálculos. Los CV variaron entre 34% para la muestra C' y hasta 125% para la muestra A', con un promedio de 69% (57% si se excluye la muestra A'). Los resultados para el protocolo BSPT fueron más homogéneos aunque el CV para la muestra D fue muy elevado (139%). Para la muestra A, al igual que con el

from 34% for sample C to 125% for sample A, with a mean CV of 69% (58% excluding sample A). The BSPT results classified the samples more homogeneously even though the CV for sample D was very high (139%). For sample A, as for the SPT, results were very variable although the CV was lower than using the SPT (60%). The rest of the samples reported CVs between 13% and 22%.

Discussion

Sample A, which was classified in category I according to the chemical characterization (Casado-Martínez *et al.* 2006) and thus suitable for open water disposal after a normal authorization process, was also considered not toxic according to the Microtox® bioassay and causes the high interlaboratory variability. This sample reported the highest CV, probably related to the sediment particle size. The sediment grain size is an important confounding factor when interpreting Microtox® test results. Even though research has focused on the effects when

SPT, los resultados fueron muy variables aunque el valor de CV disminuye hasta 60%. Para el resto de muestras el CV varió entre 13% y 22%.

Discusión

Al comparar los resultados de la caracterización química de los sedimentos (Casado-Martínez *et al.* 2006) con los resultados del ensayo de toxicidad para la muestra A, que había sido clasificada en la categoría I y por tanto podría ser considerada apta para su vertido al mar tras una autorización normal, ésta también se clasifica claramente como no tóxica y esto causa la variabilidad de los valores obtenidos, pero con un alto CV. Como se ha mencionado anteriormente, la distribución del tamaño de los sedimentos se ha identificado como un importante factor de confusión a la hora de interpretar los resultados de este ensayo. El interés general se ha centrado en identificar la medida del efecto de la presencia de sedimentos finos en la toxicidad, habiéndose propuesto distintas correcciones (Ringwood *et al.* 1997, Stronkhorst 2003) aunque no parecen recomendables para la gestión de dragados en puertos españoles (DeValls *et al.* 2003). En el caso de muestras con porcentajes de arenas elevados, el efecto del tamaño de grano incrementa directamente la variabilidad del ensayo ya que existen dificultades para resuspender efectivamente el sedimento. Esta dificultad resulta especialmente decisiva a la hora de coger la alícuota de la suspensión inicial con lo que las concentraciones teóricas no se corresponden con las concentraciones reales a las que las muestras están expuestas y, por lo tanto, el dato de IC₅₀ no es representativo de la toxicidad real de la muestra. En este sentido la agencia ambiental canadiense, que utiliza un valor absoluto para la clasificación de la toxicidad de los sedimentos, reconoce la problemática para la clasificación de las muestras arenosas y, si el sedimento en cuestión contiene un porcentaje de finos (igual o menos a 0.063 mm) mayor que 20% recomienda el uso de un sedimento control negativo de toxicidad con el cual comparar los resultados del sedimento problema (Environment Canada 2002); no obstante, la variabilidad entre los replicados continúa siendo un factor importante que debe tenerse en cuenta si los resultados van a ser utilizados para la autorización de permisos y la vigilancia ambiental. Otro factor a tener en cuenta pero que puede ser fácilmente minimizado es el tiempo de almacenamiento de los sedimentos. Las guías disponibles para la realización de ensayos de toxicidad en el laboratorio ya incluyen tiempos máximos dentro de los cuales deben realizarse los ensayos de toxicidad para que los resultados sean representativos ya que durante el periodo de conservación de los sedimentos las especies químicas pueden variar en cantidad o en su forma disponible (GIPME 2000). Aunque el efecto de este factor puede ser más o menos evidente según la importancia de otros factores de confusión, se ha podido identificar cierta tendencia a generar valores superiores de IC₅₀ y por lo tanto a subestimar la toxicidad de los sedimentos. Aunque este factor puede no tener mayor importancia cuando se estudian muestras no

testing fine-grained sediments and different corrections have been proposed (Ringwood *et al.* 1997, Stronkhorst 2003), they do not seem useful for dredged material characterization in Spain (DeValls *et al.* 2003). When testing sediment samples with a high percentage of sand a high variability in the results is expected because it is difficult to make the sediment suspension for the primary dilution. This is especially important since the theoretical test concentrations can be very different from the actual concentration to which the bacteria are exposed and the IC₅₀ value would not be representative of sediment toxicity. The Canadian agency uses an absolute value for sediment classification and recognizes the differences when testing these kinds of samples. It recommends the use of a sediment with similar characteristics as a negative toxicity control to which results must be compared (Environment Canada 2002) when the percentage of fine sediments (≤ 0.063 mm) is lower than 20%. Nevertheless, the variability is not solved in this way and it is still an important factor to consider if the results are used for regulatory or environmental monitoring purposes.

Another confounding factor to consider is the sediment storage period, though this can be easily avoided. Since sediment chemical species can change in quantity and availability during the storage period (GIPME 2000), protocols for sediment toxicity already include maximum storage guidelines in order to obtain representative results. In this study the influence of time storage was evident for those laboratories that reported results later in time with unrandom tendencies in higher IC₅₀ values. Although this factor may not be of special interest when testing noncontaminated samples, it seems that it can have a great influence on the classification of organic contaminated sediments, such as samples B and D that also reported the highest CVs.

The CVs for Phase II were similar to those found in Phase I but sample classification seems more homogeneous in Phase II. The reduction of the sample storage period or the greater experience acquired by the laboratories between both phases could have reduced this variability. The BSPT results seem to be of special interest with the lowest CVs, possibly because of the small number of interfering factors. The BSPT methodology avoids the filtration step, so there is no effect on the luminescence due to poor recoveries of the bacteria. Even though this protocol does not include the possibility of performing the assay on two replicates simultaneously, such as the SPT, the percentage of inhibition is calculated comparing the light emission after incubation in contact with the sample to the initial light emission from the same test dilution before the addition of the sediment. Since the SPT uses two control blanks to calculate the percentage of inhibition, the BSPT avoids the variability related to the volume of bacterial suspension added to each test dilution. According to our results and the confounding factors for their interpretation, Microtox® seems suitable to be used as a screening tool for dredged material toxicity characterization in Spain. It would be desirable to establish interim pass-fail criteria such as those

contaminadas, sí puede afectar decisivamente cuando se trata de sedimentos con contaminación de tipo orgánico, como es el caso de los sedimentos B y D que presentan una mayor variabilidad.

Los coeficientes de variación calculados en la Fase II del ejercicio son semejantes a los encontrados durante la Fase I, pero los resultados al clasificar las muestras parecen más homogéneos. Es posible que esto se deba a que el segundo ensayo se realizó en todos los laboratorios dentro del primer mes después de la recogida de los sedimentos, aunque también es de esperar una mayor experiencia de los laboratorios ya para la Fase II. De especial interés son los resultados para el protocolo BSPT en el que se obtuvieron CVs más bajos. El BSPT tiene dos ventajas importantes respecto al SPT que pueden contribuir en la reducción de la variabilidad interlaboratorio. La primera de ellas es la supresión de la filtración de la muestra, que evita el efecto en la disminución de la luminiscencia debido a la pobre recuperación de las bacterias del sedimento. Aunque el BSPT no incluye la posibilidad de incorporar un duplicado de la muestra como en el SPT, el porcentaje de inhibición de la luminiscencia se calcula para cada concentración analizada respecto al valor de emisión de las bacterias medido para cada concentración previamente a la adición de las concentraciones del sedimento problema y no respecto al valor de cuatro blancos como sucede con el SPT. De este modo se evita la variabilidad introducida por el volumen de reactivo (bacterias) adicionado a cada concentración, el cual puede ser muy distinto dependiendo de la experiencia del operador de la pipeta. La baja variabilidad interlaboratorio registrada para el protocolo BSPT también puede deberse a la mayor experiencia de los laboratorios con el ensayo aunque no todos habían utilizado este nuevo protocolo de forma rutinaria.

Según los resultados de este ejercicio, y teniendo en cuenta los factores de confusión en la interpretación de los resultados, el ensayo Microtox® parece adecuado como herramienta para la caracterización inicial de la toxicidad de materiales de dragado en España. En este sentido se recomienda el establecimiento de un valor guía como los utilizados en Holanda o Canadá de alrededor de 1000 mg L⁻¹ expresados en peso seco de sedimento. La comparación entre el antiguo SPT y el nuevo protocolo BSPT parece apuntar a este último como el más recomendable no sólo por resultados previos con muestras de sedimentos (Campisi *et al.* 2005), sino también porque su diseño es más simple y económico en términos de tiempo y esfuerzo, y dada su menor variabilidad interlaboratorio, pudiera también ser más recomendable para efectos regulatorios. La disminución en los CV con el protocolo BSPT puede ser debida a una mayor experiencia en el desarrollo del ensayo o bien a la menor variabilidad en la metodología. En cualquier caso, la variabilidad sigue siendo elevada para muestras con alto porcentaje de arenas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Antonio de Bellerín de Instrumentación Analítica y a Joep Appels de MicroLan la subvención de

established in the Netherlands or Canada for biological testing. The comparison of the SPT and BSPT results seems to indicate that the latter test is more convenient for regulatory purposes not only because of previous results (Campisi *et al.* 2005), but also because it is simpler, faster and more cost-effective than the SPT, with lower interlaboratory variability.

Acknowledgements

The authors thank Antonio de Bellerín (Instrumentación Analítica) and Joep Appels (MicroLan) for the 50% discount in all material and reactants used in this study. This study was conducted under a joint research project between CEDEX and the University of Cádiz. The Spanish Ministry of Science and Technology (REN2002_01699/TECNO) supported part of the work. The first author was supported by a grant (FPI) from the Spanish Ministry of Education and Science. We express our gratitude to A. Luque for the useful comments on the final manuscript.

50% en todos los materiales y reactivos necesarios para este estudio que se realizó como parte de un proyecto de investigación conjunto entre el CEDEX y la Universidad de Cádiz. Parte del trabajo fue subvencionado por el Programa Nacional del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (REN2002_01699/TECNO). MC Casado-Martínez agradece la financiación del Ministerio Español de Educación y Ciencia en el programa de becas de Formación de Personal Investigador (FPI). Nuestro agradecimiento a A. Luque por sus comentarios durante la preparación del manuscrito final.

Referencias

- Abbondanzi F, Calace N, Campisi T, Iacondini A, Leoni M, Petronio BM, Pietroletti M. 2004. An integrated study to evaluate the paper mill sludge utilisation for metal-contaminated soil remediation. In: Magar VS, Kelley ME (eds.), *In situ* and On-site Bioremediation – 2003. Proc. Seventh International *In situ* and On-site Bioremediation Symp. (Orlando, FL, June 2003). Battelle Press, Columbus, OH, paper L-05.
- AZUR. 1998a. Basic Solid-Phase Test (Basic SPT). AZUR Environmental, Carlsbad, CA, 16 pp.
- AZUR. 1998b. Solid-Phase Test (SPT). AZUR Environmental, Carlsbad, CA, 19 pp.
- Benton MJ, Matt ML, Knight SS, Coopers CM, Benson WH. 1995. Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 411–414.
- Bulich, A.A. 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In: Marking LL, Kimerle RA (eds.), *Aquatic Toxicology*. SPT 667. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PS, pp. 98–106.
- Carr R, Long S, Edward R, Windom HL, Chapman DC, Thursby G, Sloane GM, Wolfe DA. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1218–1231.
- Campisi T, Abbondanzi F, Casado-Martínez C, DelValls TA, Guerra R, Iacondini A. 2005. Effect of sediment turbidity and color on light output measurement for Microtox® Basic Solid-Phase Test. *Chemosphere* 60: 9–15.

- Casado-Martínez MC, Buceta JL, Forja JM, DelValls TA. 2006. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. I. Exercise description and sediment quality. *Cienc. Mar.* (this issue).
- DelValls TA, Casado-Martínez MC, Riba I, Martín-Díaz ML, Forja JM, García-Luque E, Gómez-Parra A. (2003). Investigación conjunta sobre la viabilidad de utilizar ensayos ecotoxicológicos para la evaluación de la calidad ambiental del material de dragado. Reporte Técnico para CEDEX, Noviembre de 2003. Puerto Real, Cádiz.
- Demuth S, Casillas E, Douglas AW, McCain BB. 1993. Toxicity of saline and organic solvent extracts of sediment of Boston Harbour, Massachusetts, and the Hudson River-Raritan Bay estuary, New York, using the Microtox[®] bioassay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 377–386.
- Environment Canada. 2002. Biological test method: Reference method for determining the toxicity of sediment using luminescent bacteria in a solid-phase test. Environmental Protection Service, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/42, April 2002.
- GIPME, Global Investigation of Pollution in the Marine Environment. 2000. Guidance on Assessment of Sediment Quality. International Maritime Organization, London.
- Microbics Corporation. 1992. Microtox[®] Manual. A toxicity testing handbook. Carlsbad, CA.
- Mowart FS, Bundy KJ. 2001. Correlation of field-measured toxicity with chemical concentration and pollutant availability. *Environ. Int.* 27: 479–489.
- Riba I, Casado-Martínez MC, Forja JM, DelValls TA. 2004. Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 271–282.
- Ringwood AH, DeLorenzo ME, Ross PE, Holland AF. 1997. Interpretation of Microtox solid phase toxicity test: The effects of sediment compositions. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 1135–1140.
- Stronkhorst J. 2003. Ecotoxicological effects of Dutch harbour sediments. The development of an effects-based assessment framework to regulate the disposal of dredged material in coastal waters of the Netherlands. PhD thesis, Vrije Universiteit.
- USEPA. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. United States Environmental Protection Agency, EPA/600/R-94/025.

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