

## Assessing sediment quality in Spanish ports using a green alga bioassay

### Evaluación de la calidad del sedimento en puertos españoles mediante un bioensayo con algas verdes

C Morales-Caselles<sup>1,3\*</sup>, A Rico<sup>2</sup>, F Abbondanzi<sup>2</sup>, T Campisi<sup>2</sup>, A Iacondini<sup>2</sup>, I Riba<sup>1,3</sup>, A DelValls<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía CSIC, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain. \*E-mail: carmen.morales@uca.es

<sup>2</sup> Fenice S.p.A., Centro Servizi Ecologici Sede di Ravenna, Marina di Ravenna, Italy.

<sup>3</sup> Cátedra UNESCO/UNITWIN/WiCop. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Spain.

#### Abstract

Coastal zones are under environmental pressure due to human activities, and ports are the areas that probably present the highest levels of contaminants in their sediments. In the present study we have combined chemical data and biological effects to determine the sediment quality of six Spanish ports. Trace metals and organic contaminants have been analyzed, and an acute bioassay was carried out in sediment elutriate using the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*. The toxicological parameter employed was EC50, which was estimated after exposure to different concentrations of elutriates during 72 h. The development of this alga may be affected when there is a xenobiotic in the environment, and growth inhibition can be quantified and linked to the levels of contaminants in the sediment in order to determine its quality. The results showed that the metals (Cd, Cr, Hg, and Zn) and organic contaminants (PAHs and PCBs) bound to the sediments reduced the normal growth of the alga, but no alterations were detected due to the presence of Cu. The main disadvantage observed was the hormesis produced by the presence of high levels of organic material in the sediment that might hide the toxicity of xenobiotics.

*Key words:* bioassay, *Dunaliella tertiolecta*, microalga, toxicity.

#### Resumen

En la actualidad las áreas costeras están sometidas a una presión ambiental por parte de las actividades humanas y los puertos son las zonas que probablemente presentan los mayores niveles de contaminantes en sus sedimentos. En el presente estudio se han combinado datos químicos y efectos biológicos para determinar la calidad ambiental de los sedimentos de seis puertos españoles. Se llevó a cabo el análisis de metales traza y contaminantes orgánicos además de un ensayo de toxicidad con la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*. El parámetro toxicológico utilizado fue el EC50, calculado a partir de una exposición a distintas concentraciones de lixiviado de sedimento durante 72 h. El desarrollo de este alga verde puede verse afectado con la presencia ambiental de xenobióticos de forma que la inhibición del crecimiento de la población puede ser cuantificada y relacionada con los niveles de contaminantes en el sedimento con el fin de determinar su calidad. Los resultados demostraron que tanto la presencia de metales (Cd, Cr, Hg y Zn) como de contaminantes orgánicos (PAHs y PCBs) en el sedimento afectaron al crecimiento normal del alga mientras que no se detectaron alteraciones por la presencia de Cu. La principal desventaja observada fue el fenómeno de hormesis que ocurre con concentraciones elevadas de materia orgánica en el sedimento enmascarando la toxicidad de los xenobióticos.

*Palabras clave:* bioensayo, *Dunaliella tertiolecta*, microalga, toxicidad.

#### Introduction

Some port sediments contain a concentration of contaminants that if dredged and dumped into the sea could represent an environmental risk for the biota. In order to regulate the dredging process, the European Commission (Decision 2000/532/EC modified by Decision 2001/118EC) determined which materials should be considered dangerous in terms of the concentrations of chemical pollutants (Casado-Martínez *et al.* 2006). In Spain, a directive regulating the dumping of dredged port material is currently being reviewed, which contemplates

#### Introducción

Ciertos sedimentos de puertos tienen una concentración de contaminantes que, en caso de dragado y vertido libre al mar, podrían representar un riesgo ambiental para la biota. Con el fin de regular los procesos de dragado, la Comisión Europea (Decisión 2000/532/CE modificada por la Decisión 2001/118CE) determinó qué materiales pueden ser considerados peligrosos en función de las concentraciones de contaminantes químicos (Casado-Martínez *et al.* 2006). En España actualmente se está revisando una directiva que regule los procesos

both the physicochemical characterization and ecotoxicological evaluation of sediments.

Acute bioassays or tests have been designed to assess the potential toxicity of different types of contaminants. These tests are based on the response of live organisms to xenobiotics (Streb *et al.* 2002) and many of them use growth rate inhibition as the toxicological parameter. The effect of a chemical substance on an organism largely depends on abiotic factors, so bioassays conducted under controlled laboratory conditions can be standardized and adapted to characterize sediment toxicity. Moreover, these tests are inexpensive and relatively easy to perform. Algae are considered appropriate organisms for use in toxicity tests because of their sensitivity to environmental pollutants and their abundance in aquatic ecosystems (Millán de Kuhn *et al.* 2006). Growth inhibition studies have been conducted using microalgae exposed to sediments containing trace metals (Moreno-Garrido *et al.* 2003) and to Cu in water (e.g., Nikookar *et al.* 2005, Stauber *et al.* 2005, Levy *et al.* 2007). The response of microalgae to certain contaminants is often determined based on effective concentration (EC) curves from a series of dilutions, using as toxicological parameter EC50, the concentration producing maximum inhibition (Millán de Kuhn *et al.* 2006).

This study aims to determine the advantages and disadvantages of using the green microalga *Dunaliella tertiolecta* to characterize the environmental quality of dredged port sediments. This species grows in a wide range of salinity (3–50) (Ginzburg *et al.* 1990) and has been successfully employed in previous toxicity tests using different pollutants (Gaggi *et al.* 1995) and wastewater (Walsh and Alexander 1980, Walsh *et al.* 1980, Walsh and Merrill 1984, Sbrilli *et al.* 1990). It may thus prove to be a useful tool for monitoring the environmental quality of sediments.

## Material and methods

### Study areas

For this study we used 22 sediment samples from stations in six ports located in northern and southern Spain (fig. 1): B1, B2, B3, and B4 in Barcelona, a major maritime port; BI1, BI2, and BI3 in Bilbao, located near metal industries; PA1, PA2, and PA3 in Pasajes, a port characterized by the organic contamination of its sediments; H1, H2, H3, and H4 in Huelva, with high metal presence; C1, C2, C3, and C4 in Cartagena, influenced by strong mining activity over the past decades; and CA2, CA3, and CA4 in Cádiz, where there are no notable polluting sources. A sediment sample from Cádiz Bay (CA1) showing low contamination and absence of toxicity in a previous study with other organisms (Riba *et al.* 2003) was used as reference.

### Sampling and physicochemical analysis

Sediment samples were collected using a Van Veen grab with an effective sampling surface of 0.024 m<sup>2</sup>. Maximum

de disposición de los dragados de puertos que incluye tanto la caracterización fisicoquímica de los sedimentos como su evaluación ecotoxicológica.

Los bioensayos o pruebas de toxicidad se diseñaron para evaluar la toxicidad potencial de contaminantes de distinta naturaleza. Estas pruebas se basan en la respuesta de organismos vivos frente a xenobióticos (Streb *et al.* 2002) y muchas de ellas utilizan la inhibición de la tasa de crecimiento como parámetro toxicológico. El efecto de una sustancia química en un organismo depende en gran medida de factores abióticos, de forma que el desarrollo de ensayos de toxicidad bajo condiciones controladas de laboratorio permite estandarizar y adecuar la prueba para caracterizar la toxicidad de sedimentos. Además, estos ensayos son relativamente fáciles de realizar y de bajo costo. Las algas son organismos apropiados para realizar pruebas de toxicidad dada su sensibilidad a la contaminación ambiental y su abundancia en ecosistemas acuáticos (Millán de Kuhn *et al.* 2006). Se han realizado estudios de inhibición del crecimiento en microalgas expuestas a sedimentos con metales traza (Moreno-Garrido *et al.* 2003) y, en particular a Cu en el agua (e.g., Nikookar *et al.* 2005, Stauber *et al.* 2005, Levy *et al.* 2007). Para cuantificar la respuesta de las microalgas a determinados contaminantes a menudo se han empleado las curvas de concentración efectiva (EC) a partir de series de dilución, utilizando como parámetro toxicológico la EC50, o concentración de muestra que produce una inhibición del efecto máximo (Millán de Kuhn *et al.* 2006).

El presente estudio pretendió determinar las ventajas e inconvenientes del uso de la microalga verde *Dunaliella tertiolecta* para caracterizar la calidad ambiental de dragados de sedimentos portuarios. Esta especie crece en un amplio rango de salinidad (3–50) (Ginzburg *et al.* 1990) y su uso en ensayos de toxicidad ha tenido éxito en estudios previos realizados con distintos contaminantes (Gaggi *et al.* 1995) y aguas residuales (Walsh y Alexander 1980, Walsh *et al.* 1980, Walsh y Merrill 1984, Sbrilli *et al.* 1990) por lo que podría ser una herramienta útil para llevar a cabo gestión de calidad ambiental de sedimentos.

## Material y métodos

### Zonas de estudio

Para realizar este estudio se seleccionaron 22 muestras de sedimento de seis puertos localizados en el norte y sur de España (fig. 1): B1, B2, B3 y B4 en Barcelona, puerto de gran importancia para el transporte marítimo; BI1, BI2 y BI3 en Bilbao, localizado en las proximidades de industrias del metal; PA1, PA2, PA3 en Pasajes, puerto caracterizado por la contaminación orgánica de sus sedimentos; H1, H2, H3 y H4 en Huelva, donde destaca la presencia de metales; C1, C2, C3 y C4 en Cartagena, influenciado por fuerte actividad minera en las últimas décadas; y CA2, CA3 y CA4 en Cádiz, con ausencia de fuentes de contaminación destacables. Se utilizó como

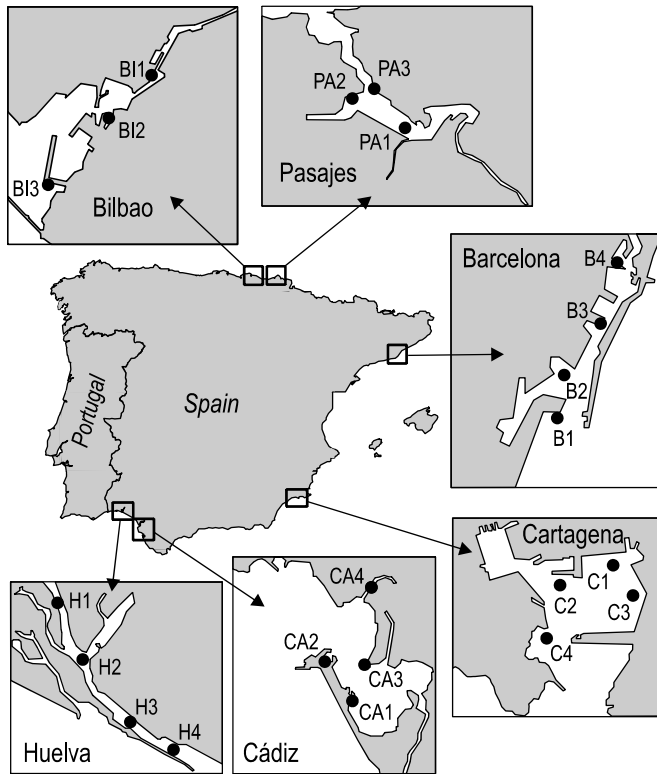


Figure 1. Map showing the Spanish ports and respective stations surveyed: Cádiz (CA#), Huelva (H#), Cartagena (C#), Barcelona (B#), Bilbao (BI#), and Pasajes (PA#) (Casado-Martínez 2006).

Figura 1. Mapa con los puertos de estudio y sus respectivas estaciones: Cádiz (CA#), Huelva (H#), Cartagena (C#), Barcelona (B#), Bilbao (BI#), y Pasajes (PA#) (Casado-Martínez 2006).

depth of grab penetration was estimated at 10 cm and all samples that were not at least 2/3 of the grab volume were discarded. The samples were transported in the dark in hermetically-sealed plastic containers, and stored at 4°C until further analysis within 14 days of collection. In the laboratory, part of the sediment was separated for the granulometric characterization and the rest was sieved through a 1-mm mesh. Aliquots were taken for the physicochemical characterization and the rest of the sieved sediment was stored for the toxicity tests. Sieving was done to eliminate possible interferences from shell debris, predators, residues in general, etc. Sediment grain size and organic carbon content were determined (Gaudette *et al.* 1974, El Rayis 1985). The chemical analyses were performed at the Spanish Public Works Research Centre, following its recommendations (CEDEX 1994). Trace metals were analyzed by atomic absorption spectrophotometry (Loring and Rantala 1992, Prego *et al.* 2006), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by gas chromatography-mass spectrometry (Soriano-Sanz *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2006), and polychlorinated biphenyls (PCBs) by gas chromatography with electron capture detector (USEPA SW-846 Method 827C78082) (USEPA 1994).

referencia sedimento de una zona de la bahía de Cádiz (CA1) que presentaba baja contaminación y ausencia de toxicidad en estudios previos con otros organismos (Riba *et al.* 2003).

#### *Toma de muestras y análisis fisicoquímicos*

Los sedimentos se recolectaron utilizando una draga Van Veen con una superficie efectiva de muestreo de 0.024 m<sup>2</sup>. La penetración máxima de la draga se estimó en 10 cm y se descartaron todas aquellas muestras que no alcanzaran un mínimo de 2/3 del volumen de la draga. El transporte de las muestras se realizó en contenedores de plástico herméticamente cerrados, y en oscuridad, los cuales fueron almacenados a 4°C antes de ser utilizados. El tiempo de conservación no excedió en ningún caso los 14 días. Una vez en el laboratorio, el sedimento fue tamizado (excepto una parte destinada a la caracterización granulométrica) a través de una malla de 1 mm de tamaño de poro; se tomaron alícuotas para llevar a cabo la caracterización fisicoquímica y el resto del sedimento tamizado fue almacenado para la realización de los ensayos de toxicidad. El proceso de tamizado fue realizado con el fin de eliminar posibles interferencias como restos de conchas, depredadores, residuos en general, etc. Se determinó la granulometría y el contenido de carbono orgánico en las muestras (Gaudette *et al.* 1974, El Rayis 1985). Los análisis químicos se llevaron a cabo en el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, siguiendo sus recomendaciones (CEDEX 1994); los metales traza fueron analizados por espectrofotometría de absorción atómica (Loring y Rantala 1992, Prego *et al.* 2006), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS; Soriano-Sanz *et al.* 2006, Fernández *et al.* 2006), y los bifenilos policlorados (PCBs) por cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones (USEPA SW-846 Method 827C78082) (USEPA 1994).

#### *Ensayo de toxicidad*

La prueba de toxicidad se llevó a cabo con el microalga marina *D. tertiolecta* y se basó en el estudio de la inhibición del crecimiento debida a la presencia de sustancias tóxicas en el lixiviado. Para realizar el bioensayo se siguió un protocolo similar a los ya estandarizados con otras especies de algas (Chiaudani y Vighi 1978; APHA-AWWA-WPCF 1980; Elnabarawy y Welter 1984; EPA 1988, 1991, 1994; ARPAT 1998) así como a los realizados por otros autores con *D. tertiolecta* para caracterizar aguas residuales y contaminantes de referencia (Walsh y Alexander 1980, Walsh *et al.* 1980, Walsh y Merrill 1984, Sbrilli *et al.* 1990, Gaggi *et al.* 1995). Para preparar el lixiviado de sedimento se tomaron 5 g de peso seco de muestra húmeda la cual se agitó con agua marina artificial (1:4) durante 1 h. Pasado ese tiempo la muestra se centrifugó durante 20 min a 3200 rpm y se realizaron seis diluciones (1:2) con el sobrenadante extraído. Estas diluciones de

### Toxicity test

The toxicity test consisted of studying growth inhibition of the marine microalga *D. tertiolecta* due to the presence of toxic substances in the elutriate. The bioassay protocol was similar to those already standardized for other algal species (Chiaudani and Vighi 1978; APHA-AWWA-WPCF 1980; Elnabarawy and Welter 1984; EPA 1988, 1991, 1994; ARPAT 1998) and to those applied by other authors to characterize wastewater and reference pollutants using *D. tertiolecta* (Walsh and Alexander 1980, Walsh *et al.* 1980, Walsh and Merrill 1984, Sbrilli *et al.* 1990, Gaggi *et al.* 1995). To prepare the sediment elutriate, 5 g dry weight of wet sample were taken and stirred in artificial seawater (1:4) for 1 h. The sample was then centrifuged during 20 min at 3200 rpm and six dilutions (1:2) were prepared with the supernatant extracted. These elutriate dilutions were the media used in the bioassay. Prior to conducting the toxicity tests we determined that exponential growth of the *Dunaliella* population occurred in the first 3–4 days (fig. 2), so the inoculum used for the algal exposure to the sediment elutriates was obtained during this period. Following the recommendations made in previous studies (Sbrilli *et al.* 1990, Gaggi *et al.* 1995), a known amount of exponential growth phase cells was added to each concentration and their respective replicas (four), and incubated in plates (6 × 4 wells) for 72 h after which the cell density was measured. This procedure was carried out under a laminar flow hood in sterile conditions. A temperature of around 20°C, constant light, and agitation of 90 rpm were maintained during the incubation period. Cells were counted under a microscope using a Bürker camera.

### Statistical analysis

Based on the results obtained, EC50 was calculated using the Probit Analysis Program, version 1.5. The results of the sediment physicochemical analysis and toxicity values were normalized to conduct a factor analysis. The objective was to

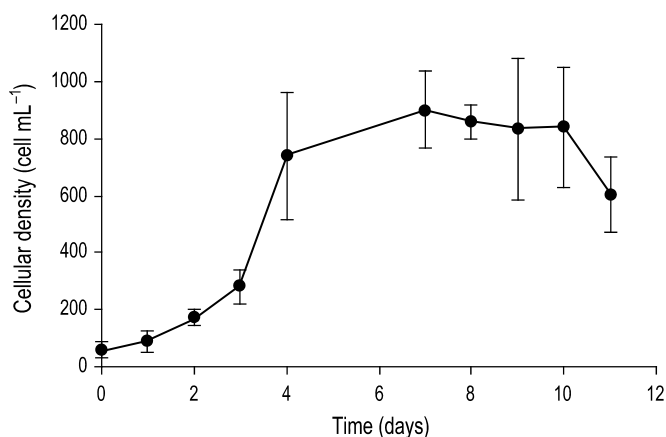


Figure 2. *Dunaliella tertiolecta* population growth curve.  
Figura 2. Curva de crecimiento de la población de *Dunaliella tertiolecta*.

lixiviado fueron los medios donde se desarrolló el bioensayo. Antes de realizar los ensayos de toxicidad se determinó que el crecimiento exponencial para la población del alga se daba en los primeros 3–4 días (fig. 2) por lo que se seleccionó este periodo para obtener el inóculo que sería utilizado en la exposición a los lixiviados de los sedimentos. Siguiendo las recomendaciones de estudios previos (Sbrilli *et al.* 1990, Gaggi *et al.* 1995) a cada concentración y sus respectivas réplicas (cuatro) se añadió una cantidad conocida de células de *Dunaliella* en fase exponencial de crecimiento, y se incubaron en placas de 6 × 4 pocillos durante 72 h tras las cuales se estimó la densidad celular. Estos procedimientos se desarrollaron bajo campana de flujo laminado en condiciones estériles. Durante el periodo de incubación se mantuvo una agitación a 90 rpm, luz continua y una temperatura en torno a 20°C. El recuento de las microalgas se realizó mediante observación al microscopio usando una cámara de Bürker.

### Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos se calculó EC50 mediante Probit-Analysis-Program, versión 1.5. Los resultados de los análisis físicoquímicos del sedimento y los valores de toxicidad fueron normalizados para realizar un análisis de factores. El objetivo era explicar de forma simple y gráfica las relaciones observadas entre un número inicial de variables utilizando un número menor de factores, mediante el método de componentes principales (PCA).

### Resultados

#### Análisis químicos

La estación CA1 seleccionada en el saco interno de la bahía de Cádiz presentó los niveles más bajos de metales y ausencia de contaminación orgánica (tabla 1). Por otro lado, las estaciones CA2, CA3 y CA4 presentaron un tamaño de grano variable (59–99%) y un mayor contenido en carbono orgánico (13.8–24.3%). El puerto de Huelva se encuentra en la Ría de Huelva, formada en el estuario de los ríos Tino y Odiel, y se caracteriza por una gran contaminación metálica debido a la proximidad de la Faja Pirítica Ibérica (Casado-Martínez 2006). Los sedimentos de las estaciones de Huelva (H#) presentaron altos niveles de contaminación por metales, especialmente de Cu (1.9–1938 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (20.9–2458 mg kg<sup>-1</sup>), Ni (0.8–34.6 mg kg<sup>-1</sup>) y el metaloide As (4.7–840 mg kg<sup>-1</sup>). Sin embargo, los puntos de muestreo de Cartagena (C#) presentaron una mayor concentración en metales (e.g., Cd: 6.8–98.5 mg kg<sup>-1</sup>, Hg: 21.6–136 mg kg<sup>-1</sup>, Pb: 487–1397 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: 901–8661 mg kg<sup>-1</sup>) ya que además de su intensa actividad marítima, el puerto se ha visto influenciado por las actividades industriales relacionadas con la minería desarrollada en la zona durante décadas. Por otra parte los puertos de Bilbao (BI#), Pasajes (PA#) y Barcelona (B#), en el norte de España, presentaron una

explain, simply and graphically, the relationships observed between an initial number of variables using a lower number of factors, by principal component analysis (PCA).

**Results**

*Chemical analysis*

Station CA1 in the inner part of Cádiz Bay presented the lowest levels of metals and no organic contamination (table 1), while stations CA2, CA3, and CA4 showed a variable grain size (59–99%) and greater organic carbon content (13.8–24.3%). The port of Huelva is located in the Huelva Ría, formed by the Tino and Odiel rivers, and is characterized by high levels of metal pollution due to the proximity of the Iberian Pyrite Belt (Casado-Martínez 2006). The sediments from the Huelva stations (H#) had high levels of metal pollution, especially of Cu (1.9–1938 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (20.9–2458 mg kg<sup>-1</sup>), Ni (0.8–34.6 mg kg<sup>-1</sup>), and the metalloid As (4.7–840 mg kg<sup>-1</sup>). Nevertheless, the Cartagena stations (C#) presented higher metal concentrations (e.g., Cd: 6.8–98.5 mg

importante concentración de contaminantes orgánicos en sus sedimentos (PCBs: 49.2–273, 22.1–256 y 240–740 µg kg<sup>-1</sup> en Barcelona, Bilbao y Pasajes; PAHs: 0.3–1.8, 0.6–66.7 y n.d–1.1 mg kg<sup>-1</sup> en Barcelona, Bilbao y Pasajes, respectivamente) debida a la actividad marítima y/o pesquera que en ellos se desarrolla.

*Prueba de toxicidad*

En la figura 3 se muestran los resultados de EC50 obtenidos en los ensayos de toxicidad con *Dunaliella*. Algunos de los tratamientos no mostraron toxicidad sino que se observó una inducción considerable del crecimiento de la población, en concreto CA1 y CA2 (Cádiz), B1 y B2 (Barcelona) y H3 (Huelva). Tampoco se observó toxicidad en las poblaciones de microalga expuestas a los sedimentos de CA3 (Cádiz), C4 (Cartagena) y H4 (Huelva). Por otra parte las muestras C2 (Cartagena), B4 (Barcelona), B11 (Bilbao), PA3 (Pasajes) y H1 (Huelva) mostraron los valores más bajos de EC50, es decir una mayor toxicidad.

Table 1. Percentage of sand (%S), fine grains (%FG), and organic carbon (%OC), and concentration of metals, metalloids, and PAHs (mg kg<sup>-1</sup> dry weight), and PCBs (µg kg<sup>-1</sup>) in the sediment from six ports: Cádiz (CA#), Huelva (H#), Cartagena (C#), Barcelona (B#), Bilbao (BI#), and Pasajes (PA#).

Tabla 1. Porcentaje de arena (%S), finos (%FG), carbono orgánico (%OC), y concentraciones de metales, metaloides y PAHs (mg kg<sup>-1</sup> peso seco) y PCBs (µg kg<sup>-1</sup>) en los sedimentos de seis puertos: Cádiz (CA#), Huelva (H#), Cartagena (C#), Barcelona (B#), Bilbao (BI#), y Pasajes (PA#).

Station	%S	%FG	%OC	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	PCBs	PAHs
CA1	99.8	0.0	1.1	3.4	0.9	0.1	7.0	0.1	0.1	2.3	21.3	n.d.	n.d.
CA2	40.4	59.5	13.8	30.8	1.3	14.9	203.0	2.0	20.1	86.9	378.0	145.0	n.d.
CA3	17.8	81.9	20.3	16.6	1.2	8.4	46.8	0.3	16.9	17.6	136.0	n.d.	n.d.
CA4	0.4	99.6	24.3	7.8	1.3	14.2	32.1	0.1	21.3	5.1	65.7	n.d.	n.d.
H1	9.7	90.2	20.3	840.0	4.4	32.9	1938.0	2.4	34.6	383.0	2458.0	2.0	n.d.
H2	9.6	90.2	10.6	531.0	2.5	24.1	1497.0	2.0	7.1	385.0	1857.0	2.3	n.d.
H3	56.0	44.0	6.3	273.0	1.3	8.1	772.0	1.2	129.0	218.0	1176.0	n.d.	n.d.
H4	19.7	0.0	1.0	4.7	n.d.	9.7	1.9	0.0	0.8	5.3	20.9	n.d.	n.d.
C1	38.2	57.8	10.5	101.0	98.5	66.6	666.0	136.0	29.0	1397.0	8661.0	123.0	0.9
C2	53.6	41.2	9.1	64.7	17.5	45.6	313.0	32.7	15.3	748.0	1885.0	468.0	1.0
C3	67.2	31.9	7.2	88.0	31.9	57.6	453.0	115.0	19.3	1397.0	3310.0	108.0	0.7
C4	50.0	49.1	9.9	62.6	6.8	29.5	171.0	21.6	19.3	487.0	901.0	119.0	1.2
B1	64.7	33.9	3.1	17.4	0.9	105.0	74.9	0.9	18.9	86.7	254.0	49.2	0.3
B2	57.9	36.6	4.6	21.2	1.5	104.0	160.0	1.1	29.1	103.5	424.0	138.0	0.4
B3	42.1	54.0	4.8	18.6	0.6	59.5	102.0	1.2	22.2	91.9	220.0	85.3	0.6
B4	39.9	58.7	17.6	29.0	2.9	93.9	601.0	4.1	32.3	455.0	1165.0	273.0	1.8
BI1	20.3	77.3	14.8	67.3	2.0	18.3	103.0	0.7	26.4	147.0	476.0	112.0	66.7
BI2	14.5	47.4	15.1	104.0	2.0	23.1	204.0	1.4	32.0	286.0	778.0	256.0	13.9
BI3	6.2	93.6	16.7	21.7	n.d.	3.5	23.0	0.2	15.7	40.7	122.0	22.1	0.6
PA1	28.9	70.3	14.4	39.1	0.7	26.7	158.0	1.1	33.5	294.0	1085.0	610.0	n.d.
PA2	5.1	91.2	18.5	28.9	0.7	23.4	167.0	1.3	28.5	246.0	763.0	740.0	1.1
PA3	38.5	59.7	19.8	23.8	n.d.	18.6	162.0	1.4	19.6	155.0	576.0	240.0	0.3

kg<sup>-1</sup>, Hg: 21.6–136 mg kg<sup>-1</sup>, Pb: 487–1397 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: 901–8661 mg kg<sup>-1</sup>) since, in addition to the intense maritime activity, this port has been impacted by the mining-related activities that for decades have been conducted in the area. On the other hand, the sediments from Barcelona (B#), Bilbao (BI#), and Pasajes (PA#) in northern Spain showed significant concentrations of organic pollutants (PCBs: 49.2–273, 22.1–256, and 240–740 µg kg<sup>-1</sup> in Barcelona, Bilbao, and Pasajes; PAHs: 0.3–1.8, 0.6–66.7, and n.d.–1.1 mg kg<sup>-1</sup> in Barcelona, Bilbao, and Pasajes, respectively) as a result of the fishery and maritime activities conducted in these ports.

### Toxicity test

Figure 3 shows the EC50 results obtained in the toxicity assays using *D. tertiolecta*. Some of the treatments did not show toxicity but rather considerable algal growth induction, in particular CA1 and CA2 (Cádiz), B1 and B2 (Barcelona), and H3 (Huelva). Neither was toxicity observed in the microalgae exposed to the CA3 (Cádiz), C4 (Cartagena), and H4 (Huelva) sediments. The lowest EC50 values, indicating greater toxicity, corresponded to the C2 (Cartagena), B4 (Barcelona), BI1 (Bilbao), PA3 (Pasajes), and H1 (Huelva) sediments.

### Multivariate analysis

A factor analysis was conducted to correlate the contamination and toxicity variables, and to determine the influence of these correlations on each one of the sampling stations. Three factors grouping the original variables were obtained (table 2). Factor 1 explained 31% of the variance and associated the presence of Cd, Cr, Hg, Pb, and Zn with the toxicity observed in the bioassay using *D. tertiolecta*. The weight of factor 1 for each one of the sampling stations (fig. 4) indicates that the Cartagena sediments (C1 > C3 > C2) showed the highest metal toxicity, followed by B4 (Barcelona), H2 (Huelva), and PA1 and PA2 (Pasajes). Factor 2 (23%) associated the sediment

### Análisis multivariante

Se realizó un análisis de factores con el fin de correlacionar las variables de contaminación y toxicidad y a su vez conocer la influencia de estas correlaciones en cada una de las estaciones de los puertos en estudio. De esta forma se obtuvieron tres factores que agrupan las variables originales (tabla 2). El primer factor (factor 1) explica 31% de la varianza y relaciona la presencia de los metales Cd, Cr, Hg, Pb y Zn con la toxicidad observada en el bioensayo con *Dunaliella*. El peso del factor 1 en cada una de las estaciones de estudio (fig. 4) demuestra que los sedimentos del puerto de Cartagena (C1 > C3 > C2) presentarían la mayor toxicidad por metales, seguidos de B4 (Barcelona), H2 (Huelva) y PA1 y PA2 (Pasajes). El factor 2 (23%) correlacionó el contenido de finos y de carbono orgánico en el sedimento con la contaminación orgánica de los mismos (PAHs y PCBs) y la toxicidad producida a la microalga. Este factor explica principalmente la situación de las estaciones de Bilbao y Pasajes, con mayor contaminación orgánica. En el caso de la estación CA4, ésta presenta peso positivo para este factor y ausencia de contaminación orgánica.

### Discusión

A partir de los resultados químicos obtenidos se observó que los niveles de contaminación de los puertos son, en general, mayores a los niveles ambientales comunes, lo que es debido a las diferentes actividades que se desarrollan en estas zonas y repercute de manera muy notable en los sedimentos. De las zonas seleccionadas podemos destacar los puertos de Cartagena y Huelva como los afectados por contaminación metálica en mayor grado (con valores máximos de As: 840 mg kg<sup>-1</sup>; Cd: 98.5 mg kg<sup>-1</sup>; Cu: 1938 mg kg<sup>-1</sup>; Hg: 136 mg kg<sup>-1</sup>; Ni: 129 mg kg<sup>-1</sup>; Pb: 1397 mg kg<sup>-1</sup>; Zn: 8661 mg kg<sup>-1</sup>), mientras que los que presentan niveles más elevados de compuestos orgánicos en sus sedimentos son Bilbao y Pasajes (PCBs: 740 µg kg<sup>-1</sup>; PAHs: 66.7 mg kg<sup>-1</sup>). El contenido de arena no parece estar relacionado con los contaminantes mientras que el

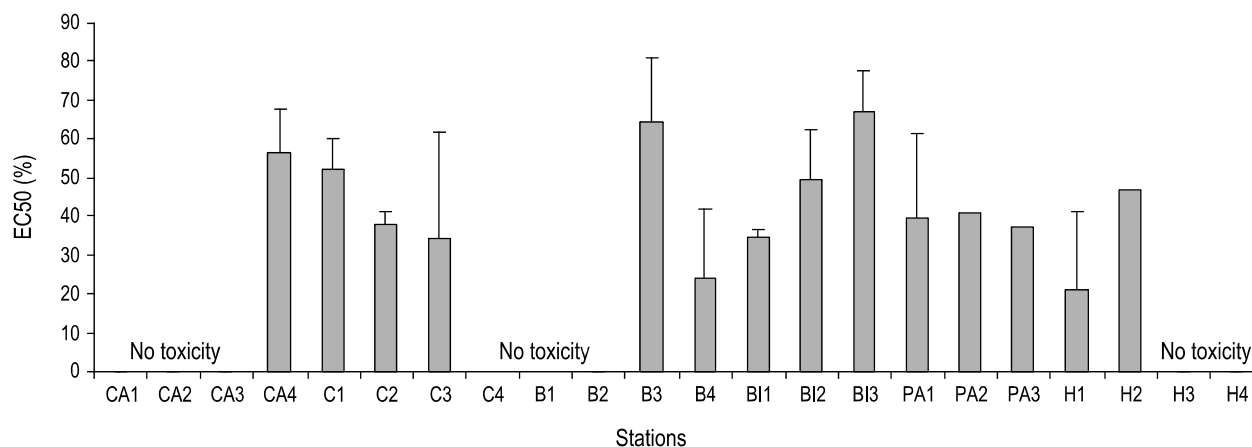


Figure 3. EC50 results obtained in the bioassay using *Dunaliella tertiolecta* for the different sediment samples.

Figura 3. Resultados de EC50 obtenidos en el ensayo con *Dunaliella tertiolecta* para las distintas muestras de sedimento.

Table 2. Values of the factors representing 14 variables after multivariate analysis of the results obtained. Only the values >0.30 are shown.

Tabla 2. Valores de los factores que representan a 14 variables tras someter los resultados a un análisis multivariante. Sólo se muestran los valores >0.30.

	Factor 1 31%	Factor 2 23%	Factor 3 13%
% Sand	–	–	–
% Fine grains	–	0.89	–
% TOC	–	0.89	–
As	–	–	0.94
Cd	0.93	–	–
Cr	0.35	–	–
Cu	–	–	0.91
Hg	0.94	–	–
Ni	–	–	0.39
Pb	0.95	–	–
Zn	0.95	–	–
PCBs	–	0.36	–
PAHs	–	0.30	–
<i>D. tertiolecta</i>	0.63	0.51	–

fine-grain and organic carbon contents, and the organic contamination (PAHs and PCBs) with the algal toxicity observed. This factor mainly explained the situation of the more organically-polluted Bilbao and Pasajes stations. In the case of CA4, this station presented a positive weight for this factor and absence of organic contamination.

## Discussion

The chemical results obtained showed that the levels of contamination in the ports are, in general, higher than the normal environmental levels as a result of the different activities conducted in these areas that significantly impact the sediments. Of the ports surveyed, Cartagena and Huelva were the most affected by metal contamination (with maximum values of As: 840 mg kg<sup>-1</sup>; Cd: 98.5 mg kg<sup>-1</sup>; Cu: 1938 mg kg<sup>-1</sup>; Hg: 136 mg kg<sup>-1</sup>; Ni: 129 mg kg<sup>-1</sup>; Pb: 1397 mg kg<sup>-1</sup>; and Zn: 8661 mg kg<sup>-1</sup>), while the Bilbao and Pasajes sediments showed the highest levels of organic compounds (PCBs: 740 µg kg<sup>-1</sup>; PAHs: 66.7 mg kg<sup>-1</sup>). The sand content does not seem to be related to the pollutants, but the fine-grain percentage is associated with the organic carbon content and organic contamination. Both types of contamination (metallic and organic) were found to have toxic effects in the bioassay conducted using *D. tertiolecta*, and Cd, Cr, Hg, and Zn, as well as PAHs and PCBs seem to inhibit algal growth. The toxicity observed at station CA4 can be attributed to the high organic carbon content in the sediments located in the fishing harbour. The statistical analysis also revealed As, Cu, and Ni contamination at the Huelva stations (H1, H2, H3) that is not associated with the toxic

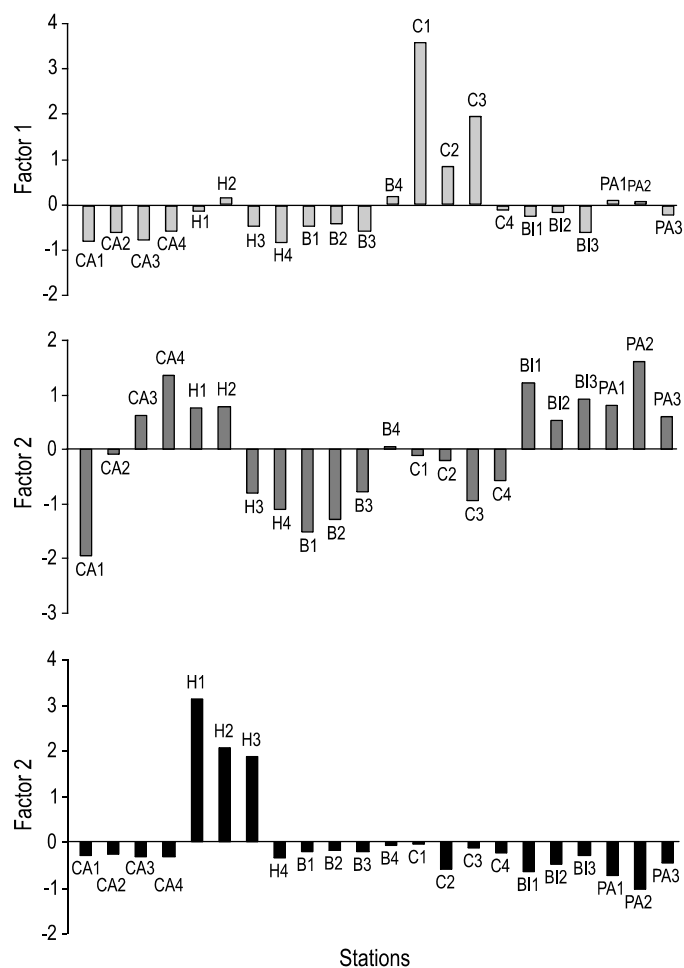


Figure 4. Relevance of each factor (factor weight) for each of the 22 stations.

Figura 4. Relevancia de cada factor (peso de factores) para cada una de las 22 estaciones.

porcentaje de finos se vincula con el contenido de carbono orgánico y la contaminación orgánica. Ambos tipos de contaminación (metálica y orgánica) han demostrado tener efectos tóxicos en el ensayo con *D. tertiolecta*, y tanto el Cd, Cr, Hg, Zn, PAHs y PCBs parecen inhibir el crecimiento de *D. tertiolecta*. En el caso de la estación CA4, se considera que el alto contenido en carbono orgánico en los sedimentos localizados en la dársena pesquera produce la toxicidad observada. Además, en el análisis estadístico se observa contaminación por As, Cu y Ni en las estaciones de Huelva (H1, H2 y H3) y que no está asociada a efectos tóxicos sobre el organismo estudiado. Por otro lado el contenido de carbono orgánico también puede afectar el desarrollo del alga. No se han detectado correlaciones entre el alto contenido de Cu, As y Ni de los sedimentos de varios de los puertos estudiados, aunque es conocido que *D. tertiolecta* es menos sensible al Cu que otras especies de microalgas (Nikookar *et al.* 2005, Levy *et al.* 2007). Es posible que el metal, a pesar de aparecer en elevadas concentraciones en los sedimentos, no se encontrara biodisponible. Una desventaja que hemos observado en el uso de esta especie con

effects on *D. tertiolecta*. On the other hand, organic carbon content may also affect algal development. Correlations have not been found between the high content of Cu, As, and Ni in sediments from several ports, though *D. tertiolecta* is known to be less sensitive to Cu than other microalgal species (Nikookar *et al.* 2005, Levy *et al.* 2007). It is possible that this metal, despite its high concentrations in sediments, is not bioavailable. The main disadvantage detected of using this species with environmental sediment samples was the hormesis observed in some of the treatments that may hide the toxic effects of the associated pollutants. This phenomenon has been observed in this type of tests using other microalgae (Hall *et al.* 1996, Adams and Stauber 2004), most likely due to the presence of nutrients in the sediment. A possible solution to this problem would be to measure the content of nutrients in sediments and establish a limit in terms of their concentration; eliminating the nutrients prior to the toxicity assay could modify the bioavailability of the pollutants, altering the initial sediment composition.

In general, the toxicity test using *D. tertiolecta* represents a useful tool when working with elutriates of port sediments that normally contain high levels of xenobiotics. Multivariate analyses establishing the correlations between pollutants and toxic effects provide a simple, economical, and efficient way to determine the bioreactivity of substances. Nevertheless, we consider that it is a test that should be conducted within a battery of bioassays including other sediment exposure pathways.

### Acknowledgements

This study was partially financed by the Spanish Ministry for Science and Technology (projects PET2006\_0685\_00, PET2006\_0685\_01 and PHB2005-0100-PC). C Morales-Caselles and A Rico were supported by the Spanish Ministry for Education and Science (ARGO program). Special thanks to C Casado-Martínez for the help provided.

English translation by Christine Harris.

### References

Adams S, Stauber JL. 2004. Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 1957–1968.

APHA-AWWA-WPCF. 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington DC.

ARPAT 1998. Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico. ARPAT-CEDIF, Serie Ricerche e Formazione, Quad. 8, Florence.

Chiaudani G, Vighi M. 1978. Metodologia standard di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine. Quaderni dell'Istituto di Ricerca Sulle Acque, CNR, 39.

Casado-Martínez C. 2006. Caracterización de material de dragado optimizando un método integrado de evaluación de la calidad ambiental. Ph.D. thesis, Universidad de Cádiz.

CEDEX 1994. Recomendaciones para la gestión del material de dragado en los puertos españoles. Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas, Puertos del Estado, Madrid.

muestras ambientales de sedimento consiste en el efecto de hormesis que se ha observado en algunos de los tratamientos y que puede enmascarar los efectos tóxicos de los contaminantes asociados. Este fenómeno se ha observado en este tipo de ensayos con otras microalgas (Hall *et al.* 1996, Adams y Stauber 2004), presumiblemente por la presencia de nutrientes en el sedimento. Una posible solución a tal problema sería medir el contenido de nutrientes de los sedimentos y establecer una limitación del método en función de la concentración de los mismos; eliminar los nutrientes antes del ensayo de toxicidad podría modificar el estado de biodisponibilidad de los contaminantes y alterar la composición inicial de los sedimentos.

En general, la prueba de toxicidad con *D. tertiolecta* representa una herramienta útil al trabajar con lixiviados de sedimentos portuarios donde generalmente hay altos niveles de xenobióticos. El estudio multivariante que determina las correlaciones entre contaminantes y efectos tóxicos permite conocer la bioreactividad de las sustancias de una forma sencilla, económica y eficaz. Aún así consideramos que es una prueba que debe realizarse dentro de una batería de bioensayos que incluya otras vías de exposición a los sedimentos.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por los proyectos PET2006\_0685\_00, PET2006\_0685\_01 y PHB2005-0100-PC del Ministerio de Innovación y Ciencia de España. C Morales-Caselles y Á Rico fueron financiadas por el Ministerio Español de Educación y Ciencia en el programa ARGO. Los autores agradecen la ayuda prestada por C Casado-Martínez.

Elnabarawy MT, Welter AN. 1984 Utilization of algal cultures and assays by industry. In: Schubert LE (ed.), *Algae as Ecological Indicators*. Academic Press, pp. 317–328.

El Rayis OA. 1985. Re-assessment of the titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *Rapp. Comm. Int. Mer. Médit.* 29: 45–47.

EPA. 1988. Methods for toxicity tests of single substances and liquid complex wastes with marine unicellular algae. Environmental Research Lab. Gulf Breeze, Florida. EPA 600-8-87-043.

EPA. 1991. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (4th ed.). Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, Ohio. EPA-600/4-90-027.

EPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Cincinnati, Ohio. EPA-600/491002.

Fernández N, Cesar A, González M, DelValls TA. 2006. Level of contamination in sediments affected by the *Prestige* oil spill and impact on the embryo development of the sea urchin. *Cienc. Mar.* 32: 421–427.

Gaggi C, Sbrilli G, Hasab El Naby AM, Bucci M, Duccini M, Bacci E. 1995. Toxicity and hazard ranking of s-triazine herbicides using *Microtox*, two green algal species and a marine crustacean. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1065–1069.

Gaudette HE, Flight WR, Torner L, Folger DW. 1974. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *J. Sediment. Petrol.* 44: 249–253.



- Ginzburg M, Weizinger G, Cohen M, Ginzburg B-Z. 1990. The adaptation of *Dunaliella* to widely-differing salt concentrations. *J Exp. Bot.* 41: 685–692.
- Hall NE, Fairchild JF, La Point TW, Heine PR, Ruessler DS, Ingersoll CG. 1996. Problems and recommendations in using algal toxicity testing to evaluate contaminated sediments. *J. Great Lakes Res.* 22: 545–556.
- Levy JL, Stauber JL, Jolley DF. 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total Environ.* 387: 141–154.
- Loring DH, Rantala RT. 1992. Methods for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth-Sci. Rev.* 32: 235–283.
- Millán de Kuhn R, Streb C, Breiter R, Richter P, Neebe T, Häder DP. 2006. Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. *Water Res.* 40: 2695–2703.
- Moreno-Garrido I, Hampel M, Lubián LM, Blasco J. 2003. Sediment toxicity tests using benthic marine microalgae *Cylindrotheca closterium* (Ehremberg) Lewin and Reimann (Bacillariophyceae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54: 290–295.
- Nikookar K, Moradshahi A, Hosseini L. 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomol. Eng.* 22: 141–146.
- Prego R, Cobelo-García A, Marmolejo-Rodríguez J, Santos-Echeandía J. 2006. Trace elements in the *Prestige* fuel-oil spill: Levels and influence on Laxe Ria sediments (NW Iberian Peninsula). *Cienc. Mar.* 32: 179–186.
- 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.
- Sbrilli G, Bucci M, Luti R. 1990. Saggio algale di tossicità. Utilizzazione di *Dunaliella tertiolecta* nella valutazione degli effetti biologici di scarichi industriali a prevalente componente marina. *Acqua Aria* 6: 483–489.
- Soriano-Sanz JA, Franco-Hernández A, Viñas-Diéguez L, Cambeiro-Cambeiro B, González-Fernández JJ. 2006. Preliminary data on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild mussels from the Cantabrian coast (N Spain) following the *Prestige* oil spill. *Cienc. Mar.* 32: 457–463.
- Stauber JL, Andrade S, Ramirez M, Adams M, Correa JA. 2005. Copper bioavailability in a coastal environment of northern Chile: Comparison of bioassay and analytical speciation approaches. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 1363–1372.
- Streb C, Richter P, Sakashita T, Häder DP. 2002. The use of bioassays for studying toxicology in ecosystems. *Curr. Top. Plant Biol.* 3: 131–142.
- 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.
- Walsh GE, Alexander SV. 1980. A marine algal bioassay method: Results with pesticides and industrial wastes. *Water, Air, Soil Pollut.* 13: 45–55.
- Walsh GE, Merrill RG. 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluent. In: Schubert LE (ed.), *Algae as Ecological Indicators*. Academic Press, pp. 329–360.
- Walsh GE, Bahner LH, Horning WB. 1980. Toxicity of textile mill effluent to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes. *Environ. Pollut. Ser. A* 21: 169–179.

*Recibido en febrero de 2008;  
aceptado en agosto de 2008.*