

## *Nota de Investigación/Research Note*

Ejercicio interlaboratorio de bioensayos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros. V. Ensayo de toxicidad sobre sedimento con juveniles del bivalvo *Ruditapes philippinarum*

Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. V. Whole sediment toxicity test using juveniles of the bivalve *Ruditapes philippinarum*

MC Casado-Martínez<sup>1\*</sup>, J Blasco<sup>2</sup>, MA González-Castromil<sup>3</sup>, I Riba<sup>2</sup>, TA DelValls<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Polígono Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España

<sup>3</sup> CIS Centro de Investigaciones Submarinas, Laboratorio de Calidad y Medioambiental, Vía Nobel 9, 15890 Santiago de Compostela, A Coruña, España

### Resumen

Este estudio resume los resultados del ejercicio interlaboratorio realizado en tres laboratorios para evaluar el uso del ensayo con la almeja comercial de Manila *Ruditapes philippinarum*. Seis muestras de sedimentos dragados se estudiaron mediante dos medidas finales distintas: mortalidad tras dos periodos de exposición distintos (7 y 14 días) y la medida subletal que estudia el porcentaje de organismos enterrados tras 48 h desde el inicio de la exposición. La medida de la letalidad fue sólo sensible tras el periodo más largo de exposición y la contaminación metálica más elevada. La actividad de enterramiento mostró resultados muy variables y altamente dependientes del operador responsable. De acuerdo con estos resultados se recomienda la revisión del protocolo para mejorar su uso en la gestión de dragados portuarios especialmente si se trata de zonas no afectadas por contaminación metálica.

*Palabras clave:* almeja de Manila, material de dragado, tasa de enterramiento.

### Abstract

Several species of bivalves and procedures have been used to characterize sediment toxicity. Here we report the results of an interlaboratory exercise that included three different laboratories to evaluate the use of the bioassay using the commercial clam *Ruditapes philippinarum*. Six different dredged sediments were studied using two different endpoints: lethality after two different exposure periods (7 and 14 days) and burrowing activity after 48 h of exposure. The lethal endpoint was only sensitive to characterize samples with high metallic concentration and following the 14-day exposure period. The burrowing activity showed very variable results that evidence the unsuitability of this endpoint for dredged material characterization. According to these results, a new design is recommended for the test using juvenile bivalves if it is to be used to characterize sediment samples on a regulatory context especially if sediments are not affected by metallic contamination.

*Key words:* Manila clam, dredged material, burrowing activity.

### Introducción

Varias especies de moluscos bivalvos han sido identificadas como indicadores de contaminantes, especialmente de origen metálico, en sedimentos, como por ejemplo *Scrobicularia plana* (Byrne y O'Halloran 1999, Riba *et al.* 2003, 2004a), *Macoma balthica* (Bryan *et al.* 1985, Duquesne *et al.* 2004), *Tapes decussatus* (Mariño-Balsa *et al.* 2003), o *Mya arenaria* (Phelps 1990). La almeja *Tapes semidecussatus*, o *Ruditapes philippinarum* (Reeves 1864) como también se la conoce, es un molusco bivalvo que se entierra en sedimentos blandos y

### Introduction

Different species of bivalve mollusks have been identified as suitable indicators of sediment contaminants, especially metals, such as *Scrobicularia plana* (Byrne and O'Halloran 1999, Riba *et al.* 2003, 2004a), *Macoma balthica* (Bryan *et al.* 1985, Duquesne *et al.* 2004), *Tapes decussatus* (Mariño-Balsa *et al.* 2003), and *Mya arenaria* (Phelps 1990). The Manila clam *Tapes semidecussatus*, or *Ruditapes philippinarum* (Reeves 1864) as it is also known, is a soft-sediment dwelling bivalve mollusk that can withstand a wide range of temperature and

que puede soportar un amplio rango de salinidad y temperatura (Carter 2004), por lo que presenta la ventaja de poder ser usada para evaluar la toxicidad de sedimentos estuáricos. Además, cumple la mayoría de los criterios establecidos para seleccionar especies para realizar ensayos de toxicidad: está disponible a lo largo de todo el año ya que es una especie comercial en España, es fácil de mantener bajo condiciones de laboratorio, es económicamente relevante y además tiene una amplia distribución geográfica.

El uso potencial de esta especie como organismo de ensayo para la evaluación de la toxicidad de sedimentos ha sido investigado en distintos estudios y bajo distintos diseños de ensayo. Byrne y O'Halloran (1999) estudiaron la mortalidad tras 21 días y el enterramiento después del periodo de exposición. También, Phelps (1990) estudió el enterramiento de los organismos y comparó, por medio del análisis Logit, los efectos de la toxicidad mediante el tiempo efectivo en el que se entierran 50% de los organismos. En España se ha utilizado una modificación de estos dos protocolos para evaluar la calidad de sedimentos contaminados mediante el análisis de la mortalidad y del enterramiento (Riba *et al.* 2004b). Para este ejercicio interlaboratorio se escogió el ensayo con juveniles de *R. philippinarum* y la mortalidad tras 7 y 14 días, así como la actividad de enterramiento en el sedimento problema, como medidas para la caracterización de la toxicidad de materiales de dragado.

## Material y métodos

Las almejas fueron obtenidas de un cultivo comercial por cada uno de los laboratorios participantes. Los individuos se recibieron en menos de 24 h y se aclimataron a las condiciones de laboratorio en agua de mar limpia durante al menos dos semanas antes del inicio del ensayo. Durante este periodo los organismos se alimentaron de una mezcla de microalgas (*Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galvana* y *Chaetoceros gracilis*) y se mantuvieron en un sistema abierto.

Las condiciones y los parámetros para el desarrollo del ensayo se presentan en la tabla 1. Los sedimentos se añadieron a las cámaras de exposición hasta obtener una profundidad de al menos 5 cm, añadiendo agua de mar en relación 1:3, y se airearon al menos 12 h previamente a la introducción de los organismos. El día de inicio del bioensayo se seleccionaron entre 20 y 40 organismos que fueron introducidos a cada uno de los replicados sucesivamente.

El ensayo subletal finalizó tras 48 h. El número de organismos enterrados en cada uno de los replicados se contabilizó tras 15, 30 y 45 min, y 1, 1.5, 3, 6, 12, 24 y 48 h del inicio de la exposición. Para el cálculo del tiempo estimado en el que se han enterrado 50% de las almejas (TE50) se usó una modificación del análisis Logit. Tras 7 y 14 días se contabilizó el número de organismos vivos mediante el tamizado del sedimento (0.5 mm) y se calculó el porcentaje de mortalidad.

salinity (Carter 2004). Thus, one of the main advantages of this species is its suitability for use in estuarine sediment toxicity bioassays. Moreover, it fulfills many of the criteria established for species selection in toxicity testing: it is available all year round because it is a commercial species in Spain, it is easy to maintain in the laboratory, it is economically relevant and it has a wide geographical distribution.

Its potential use as a test organism in sediment toxicity has been investigated in different studies and under different test designs. Byrne and O'Halloran (1999) studied the mortality after 21 days and the reburrowing activity after different exposure periods. Phelps (1990) studied the burrowing activity and calculated the estimated time for 50% of the clams to burrow by Logit analysis. A modification of these two tests has been used in Spain to study sediment quality using both mortality and burrowing activity as selected endpoints (Riba *et al.* 2004b). For this interlaboratory study we selected the bioassay using juveniles of the bivalve *R. philippinarum*, and mortality after 7 and 14 days and burrowing activity as the test endpoints to characterize dredged material toxicity.

## Material and methods

Clams were obtained from a commercial hatchery and received in each laboratory in less than 24 h. Organisms were acclimated to laboratory conditions in clean seawater for at least two weeks before initiating the test. During this period animals were fed a mixture of different species of microalgae (*Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galvana* and *Chaetoceros gracilis*) and were maintained in an open-water system.

Test parameters and conditions are summarized in table 1. Sediment was added to the test chambers to obtain a layer of approximately 5 cm and clean seawater was added at a ratio of 1:3. Test chambers were aerated for at least 12 h prior to the addition of the organisms. On initiating the bioassay, 20 to 40 organisms were randomly selected and added to each replicate. The sublethal test finalized after 48 h of exposure. The number of buried organisms in each test chamber was assessed 15, 30 and 45 min, and 1, 1.5, 3, 6, 12, 24 and 48 h after initiating the test. To obtain the estimated time for 50% of the clams to burrow (TE50), a modified Logit analysis was used. After 7 and 14 days the number of living organisms was assessed by sieving the sediment through a 0.5-mm mesh and the percentage of mortality was derived.

To study test reproducibility and interlaboratory variability of the results, the coefficient of variation (CV) was calculated for each sample. This value was obtained by dividing the standard deviation (SD) by the mean value (X):

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

Moreover, to study the possible effects of this variability on sample classification as toxic or not toxic, the results from each laboratory were studied individually to find differences

**Tabla 1.** Parámetros y condiciones a seguir para el desarrollo del test con bivalvos juveniles en el laboratorio.  
**Table 1.** Test parameters and conditions to develop the test using juvenile bivalves in the laboratory.

Parameters	Conditions
1. Test type	Static; on whole sediment
2. Temperature	15–20°C (19°C recommended)
3. Salinity	36–40
6. Photoperiod	Natural of the season; also continuous light
7. Test chambers	Glass, 10–5 L (aquarium type recommended)
8. Volume of sediment	1.5–2.0 L (1:4 sediment/water)
9. Volume of overlying water	6–8 L (1:4 sediment/water)
10. Water renewal	Not necessary
11. Size and state of organisms	<i>Ruditapes philippinarum</i> 1–2 cm diameter; recommended values, they can be higher
12. Number of organisms per chamber	20
13. Number of replicates	2
14. Feeding regime	No
15. Aeration	12 h before introducing the organisms, to ensure dissolved oxygen concentrations equal or higher than 90% of saturation
16. Overlying water	Clean seawater; also artificial
17. Water quality	Daily measurements of temperature; pH, ammonia, salinity and dissolved oxygen measurements at least at the beginning and end of the test
17. Test duration	Lethal, 7–14 days; sublethal, 12 and 48 h
18. Endpoints	50% of organisms burrowed (TE50 h <sup>-1</sup> , 12–48 h); survival (7–14 days)
19. Test acceptability	TE50 less than 5 h in the negative toxicity control; 90% survival in the negative toxicity control

Para el estudio de la variabilidad interlaboratorio se calculó el coeficiente de varianza (CV) de cada muestra dividiendo la desviación estándar (SD) por el valor de la media de los laboratorios (X):

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

Además, para el estudio de los posibles efectos de esta variabilidad en la clasificación de las muestras como tóxicas o no tóxicas se estudiaron los resultados de cada laboratorio individualmente para establecer diferencias entre el control de toxicidad negativo (muestra A) y cada una de las muestras de sedimentos analizadas, comparando los resultados obtenidos en los distintos laboratorios. Aunque el número de casos fue suficiente para cada muestra (dos replicados con 40 organismos cada uno), los datos no cumplían las condiciones para la utilización de un análisis estadístico paramétrico, por lo que se aplicó el test de Fisher utilizando el programa informático Simple Interactive Statistical Analysis (SISA; <http://home.clara.net/sisa/>). Los resultados del enterramiento se estudiaron mediante un ensayo de tipo ANOVA y, en caso necesario, se aplicó el test de Tukey para establecer diferencias entre las respuestas. Se utilizó el programa estadístico SPSS 11.0.

between the negative toxicity control (sample A) and each sample. Although the number of cases was sufficiently high for each sample (two replicates with  $n = 40$ ), the data did not meet the conditions to apply a parametric statistical test, so the Fisher test was applied using the Simple Interactive Statistical Analysis (<http://home.clara.net/sisa/>). The burrowing activity results were studied using ANOVA and, if necessary, Tukey's test to establish differences in the response of the samples. The SPSS 11.0 software was used.

## Results

Laboratories 1 and 2 carried out the bioassay within two weeks after sediment sampling (table 1). Laboratory 3 developed a first test but the results did not meet the acceptance criteria due to high mortality in the negative toxicity control. This laboratory developed a second test but the samples were stored for too long and did not meet the recommended guidelines.

The results obtained for 7 days of exposure do not seem to be sensitive enough for this type of sample: mortality was lower than 5% for all samples and all laboratories, except for sample C (table 2). This sample had the highest mortality values after this exposure period: 28.8%, 41.8% and 100% for

## Resultados

Los laboratorios 1 y 2 realizaron el ensayo dentro de las primeras dos semanas tras el muestreo del sedimento (tabla 1). El laboratorio 3 realizó un primer ensayo, pero los resultados no cumplieron el criterio de aceptabilidad debido a la elevada mortalidad registrada con el control de toxicidad negativo. Este laboratorio realizó un segundo ensayo con las muestras, sin embargo, en esta ocasión el tiempo de almacenamiento fue demasiado largo para estar dentro de los rangos recomendados.

Como puede observarse en los resultados de mortalidad a 7 días, ésta no parece una medida lo suficientemente sensible para este tipo de muestras: la mortalidad tras 7 días en todos los laboratorios y para todas las muestras fueron inferiores a 5%, excepto para la muestra C (tabla 2). La muestra C obtuvo valores de 28.8%, 41.8% y 100% en los laboratorios 1, 2 y 3, respectivamente. Con excepción de esta muestra en todos los laboratorios, el análisis estadístico (fig. 1) clasificó todas las muestras como estadísticamente similares al control ( $P \leq 0.05$ ). En cuanto a la mortalidad tras 14 días, ésta alcanzó valores ligeramente superiores para las muestras E y F mientras las muestras B y D mantuvieron mortalidades similares al control negativo. La muestra C aumentó en mortalidad y obtuvo una media de 69.17%. El resultado de los análisis estadísticos mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) para la muestra C pero también para las muestras E y F. A pesar de esta homogeneidad en la clasificación de las respuestas, la variabilidad de los resultados estimada mediante el CV fue elevada debido a las bajas mortalidades. La muestra C, la única con valores de mortalidad superiores, obtuvo un CV de 66.7% aunque éste se redujo a 38% en los resultados tras 14 días.

laboratorios 1, 2 and 3, respectively. The statistical analysis (fig. 1) did not reveal significant differences between any of the samples and the negative toxicity control ( $P = 0.05$ ), except for sample C for all laboratories. When mortality was assessed after 14 days of exposure, higher values were obtained for samples E and F, but samples B and D were similar to the negative toxicity control. Sample C also registered higher mortality, with a mean value of 69.17%. The statistical analysis of the results obtained for 14 days of exposure showed significant differences ( $P \leq 0.05$ ) for sample C, as well as for samples E and F. Even though the sample classification was homogeneous among laboratories, the variability of the results estimated by the CV was high because of the low mortality values. Sample C, the only sample with high mortality values, had a CV of 66.7%, though it decreased to 38% for the 14-day exposure results.

The results of the sublethal endpoint (table 3) showed that laboratory 3 was not comparable to laboratories 1 and 2. The difference in the number of exposed organisms could have influenced test results, since laboratory 3 used 20 organisms per replicate while the other two used 40, and difficulties were encountered in assessing the number of buried organisms due to the fast burrowing activity. The results obtained by the other two laboratories were also very variable and significant differences were only registered for sample C by laboratory 2 (fig. 1).

## Discussion

According to these results, mortality seems a suitable endpoint only for samples with high concentrations of metallic compounds (Casado-Martínez *et al.* 2006). Sample C had high

Tabla 2. Resultados de mortalidad tras 7 y 14 días de exposición.  
Table 2. Percent mortality after 7 and 14 days of exposure.

	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E	Sample F
Mortality after 7 d (%)						
Laboratory 1	1.25	0.00	28.8	2.50	3.75	1.25
Laboratory 2	2.50	0.00	41.8	2.50	5.00	3.75
Laboratory 3	0.00	0.00	100.0	0.00	0.00	0.00
SD	1.25	0.00	37.9	1.44	2.60	1.91
Xm	1.25	0.00	56.8	1.67	2.92	1.67
CV %	100.00	0.00	66.7	86.6	89.2	114.00
Mortality after 14 d (%)						
Laboratory 1	1.25	0.00	57.5	2.50	10.0	6.25
Laboratory 2	2.50	1.25	50.0	2.50	12.5	7.75
Laboratory 3	0.00	0.00	100.0	0.00	0.00	0.00
SD	1.25	0.72	26.96	1.44	6.61	4.11
Xm	1.25	0.42	69.17	1.67	7.50	4.67
CV %	100.00	173.21	38.98	86.60	88.19	88.08

**Tabla 3.** Resultados de enterramiento expresados como TE50 (h).  
**Table 3.** Burrowing activity, expressed as TE50 (h).

Laboratory	Replicate	Sample A	Sample B	Sample C	Sample D	Sample E
1	1	0.197	0.021	0.118	0.142	0.052
	2	0.023	0.061	0.476	0.162	0.183
2	1	0.143	0.033	0.873	0.048	0.070
	2	0.166	0.008	0.848	0.162	0.210

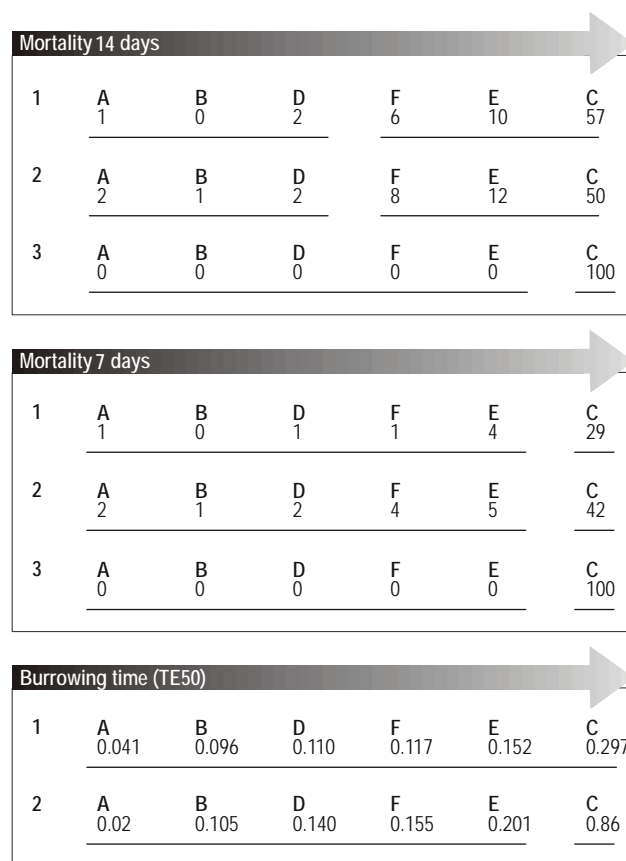
El estudio de la medida subletal (tabla 3) muestra que los resultados del laboratorio 3 no fueron comparables con los de los otros laboratorios. El principal factor que pudo haber afectado a esta medida es la diferencia entre el número de organismos expuestos ya que este laboratorio utilizó 20 organismos por replicado y encontró dificultades para contar los enterrados debido a la gran velocidad de enterramiento, según el informe enviado con los resultados. Los resultados en los otros laboratorios fueron también muy variables y sólo podrían considerarse importantes las diferencias registradas para la muestra C en el laboratorio 2 (fig. 1).

## Discusión

De acuerdo con los resultados de este ejercicio, la mortalidad parece una medida que sólo es sensible para la evaluación de toxicidad en muestras con altas concentraciones de compuestos metálicos (Casado-Martínez *et al.* 2006). Los resultados para la muestra C, con altas concentraciones de As y Cu y en menor medida Hg, Pb y Zn, son los únicos que mostraron diferencias al control negativo tras 7 días de exposición. Al aumentar el tiempo de exposición a 14 días aumentó la mortalidad de las muestras E y F, afectadas por contaminación de tipo metálica (Cu, Cd y Hg) y además con concentraciones altas de PCBs. Distintos autores han relacionado la mortalidad en esta especie de bivalvo con la presencia de contaminantes metálicos (Byrne y O'Halloran 2000, Shin *et al.* 2002), especialmente con Cd, Cu, Pb y Zn. Por el contrario, la mortalidad registrada en las muestras afectadas por contaminación de tipo orgánica (muestras B y D) fue similar a la mostrada por el control de toxicidad negativo. No se han encontrado referencias bibliográficas que relacionen directamente la mortalidad de esta especie con la presencia de contaminantes orgánicos, pero estos resultados son similares a los encontrados por Riba *et al.* (2004b), quienes encontraron mortalidades similares a los controles de toxicidad negativos en muestras de sedimentos costeros con concentraciones de Hg y PCBs superiores a los Niveles de Acción 2. De acuerdo con estos resultados, se considera que la letalidad no es una medida sensible para la caracterización de sedimentos afectados únicamente por compuestos de tipo orgánico.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los resultados para los distintos laboratorios son homogéneos y la clasificación de las muestras fue similar entre laboratorios. La gran variabilidad interlaboratorio según los altos CV no afecta a la clasificación de las muestras, más bien refleja lo poco

concentraciones de As and Cu and, to a lesser extent, of Hg, Pb and Zn, and it is the only sample that showed statistically significant differences in comparison to the control sediment after 7 days of exposure. When exposure was increased to 14 days, samples E and F, which had high Cu, Cd, Hg and PCB concentrations, could also be classified as toxic since the mortality values were statistically different from the negative toxicity control. Different authors have related bivalve mortality to metallic compounds (Byrne and O'Halloran 2000, Shin *et al.* 2002), especially Cd, Cu, Pb and Zn. On the other hand, the



**Figura 1.** Resultado del análisis estadístico de los porcentajes de mortalidad y tiempo de enterramiento (TE50) de almejas. Las muestras subrayadas por una misma línea no son significativamente diferentes con  $P \leq 0.05$  (test de Fisher).

**Figure 1.** Result of the statistical analysis of mortality percentages and burrowing activity (TE50). Samples underlined by the same line are not significantly different at  $P \leq 0.05$  (Fisher test).

adecuado que es este valor para expresar la variabilidad interlaboratorio especialmente para muestras con bajas toxicidades (como en este caso) y si se dispone de un número pequeño de laboratorios. Todos los laboratorios obtuvieron valores de mortalidad bajos para todas las muestras excepto la C: los laboratorios 1 y 2 obtuvieron bajas mortalidades y el laboratorio 3 no registró mortalidad alguna (0%). Al aumentar el tiempo de exposición a 14 días la mortalidad en los dos primeros laboratorios aumentó pero no en el laboratorio 3, lo que hace aumentar los CV de 0–114% tras 7 días a 86.6–173% tras 14 días, aún siendo los resultados homogéneos. En cambio, para la muestra C el aumento de las mortalidades en los dos primeros laboratorios hace descender los CV de 66.7% a 39%. Esta diferencia en los porcentajes de mortalidad, además de influenciar críticamente la noción de variabilidad interlaboratorio ofrecida por los CV, podría deberse a los distintos tiempos de almacenamiento de los sedimentos previamente al ensayo, ya que no se ha identificado ningún otro factor de confusión. El análisis estadístico de los resultados tras 7 días de exposición (fig. 1) clasifica la muestra C como estadísticamente diferente ( $P \leq 0.05$ ) al control negativo de toxicidad aunque tras 14 días de exposición lo son también las muestras E y F según los laboratorios 1 y 2. La diferencia en el tiempo de almacenamiento pudo afectar las muestras con concentraciones intermedias de contaminación, y aunque también era de esperarse una disminución de la toxicidad en la muestra C, éste no fue el caso.

En cuanto a los resultados de enterramiento, éstos han demostrado ser una medida inadecuada, al menos siguiendo el protocolo actual. Se han encontrado efectos adversos en la velocidad de enterramiento de organismos en sedimentos contaminados artificialmente con distintos metales (Roper *et al.* 1995, Shin *et al.* 2002), y diversos autores han utilizado con éxito el enterramiento como medida subletal para evaluar la toxicidad de sedimentos costeros (Byrne y O'Halloran 1999, Riba *et al.* 2004b) bajo distintos protocolos. Existen referencias previas en la literatura en las que se utiliza este ensayo para evaluar muestras de sedimentos de puertos (Byrne y O'Halloran 2000), aunque la medida del enterramiento se ha tomado en sedimento limpio, pero tras 10 y 20 días de exposición a los sedimentos contaminados. Estudios previos de esta medida subletal la han relacionado directamente con la contaminación metálica de las muestras, pero no existen datos para la contaminación de tipo orgánico a excepción de los registrados para sedimentos contaminados con crudo en los que la velocidad de enterramiento ha mostrado una disminución de (Olla y Bejda 1983). Esos resultados parecen confirmar la respuesta registrada para la muestra C, con valores elevados de los componentes metálicos analizados (Casado-Martínez *et al.* 2006), pero no la obtenida con el resto de las muestras, las cuales presentaban contaminación de tipo orgánico. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, en este sentido no se consideraría recomendable la medida del enterramiento en los sedimentos al inicio de la exposición. Aunque esta medida subletal pudiera ser una medida eficaz para

mortality recorded for samples B and D, affected by organic contamination, was similar to that found for the negative toxicity control. References could not be found that directly relate organic contamination and bivalve mortality, but our results are similar to those reported by Riba *et al.* (2004b), with mortality values similar to those of negative toxicity controls for coastal sediment samples with Hg and PCB concentrations higher than Action Level 2 (Casado-Martínez *et al.* 2006). Based on these results, it can be concluded that the lethal endpoint for this species is not sensitive enough for sediments affected by organic contamination.

As mentioned before, the results were homogeneous and sample classification was similar for all laboratories. The high interlaboratory variability shown by the CV does not affect sample classification, but rather reflects the inadequacy of this statistic to assess variability when low toxicity values are registered and when only a few laboratories are involved. All laboratories reported low mortality for all samples except C: laboratories 1 and 2 obtained low values, while laboratory 3 reported 0%. When the exposure time increased to 14 days, the mortality values obtained by laboratories 1 and 2 also increased, but laboratory 3 still registered 0%, which caused the CV to increase from 0–114% at 7 days to 86.6–173% at 14 days, even if the results are homogeneous. For sample C, however, the increase in mortalities recorded by laboratories 1 and 2 caused the CV to decrease from 66.7% at 7 days to 39% at 14 days of exposure. This difference in mortality percentages, apart from influencing the interlaboratory variability information provided by the CV, may be related to the different sediment storage time before testing since no other interfering factor could be identified. Statistical analyses only identified as toxic ( $P \leq 0.05$ ) sample C when the test duration was 7 days (fig. 1) and samples E and F when the exposure time was 14 days, according to laboratories 1 and 2. Differences in storage time may affect samples with an intermediate degree of contamination, though a decrease in toxicity for sample C would also have been expected but this was not reported by laboratory 3.

The burrowing activity results indicate the unsuitability of this endpoint following the present test methodology. Adverse effects on burrowing activity have been reported for sediments spiked with different metallic compounds (Roper *et al.* 1995, Shin *et al.* 2002), while burrowing activity has been successfully used for marine and coastal sediment quality assessment (Byrne and O'Halloran 1999, Riba *et al.* 2004b) following different protocols. Moreover, this sublethal endpoint has been used to test sediments from ports (Byrne and O'Halloran 2000), though the endpoint was registered after 10 and 20 days of exposure to contaminated sediments as reburrowing activity in clean sediment. Even though this endpoint seems to be directly affected by certain metallic compounds, the only data available regarding organic pollutants are those reported for oiled sediments (Olla and Bejda 1983). This previous information supports the results obtained for sample C, with high metallic concentrations (Casado-Martínez *et al.* 2006), but

predecir efectos potenciales dado que el enterramiento se considera un método de defensa contra la depredación, si se requiere utilizar en ensayos de toxicidad debería cambiarse el protocolo de ensayo y posiblemente adaptarlo al utilizado por Byrne y O'Halloran (2000).

Aunque este ensayo puede ser utilizado con éxito para la evaluación de la toxicidad de sedimentos costeros afectados por contaminación metálica mediante el uso de la medida letal y subletal, el protocolo aplicado no parece recomendable para la evaluación de la toxicidad de materiales de dragado. La baja sensibilidad de esta especie para clasificar los sedimentos como tóxicos de acuerdo con sus efectos letales, posiblemente debida a la disponibilidad de la contaminación presente a este tipo de organismos filtradores, podría aumentarse mediante la exposición de los organismos durante periodos de tiempo más largos, aunque esto aumentaría la relación coste-eficacia del ensayo. En el caso de la medida subletal, se han encontrado dificultades en cuanto al número de laboratorios capaces de desarrollar con éxito el ensayo. De acuerdo con estos resultados, pareció inadecuado considerar valores límites de toxicidad para la clasificación de materiales de dragado. En cualquier caso, y si el laboratorio lo cree conveniente, este ensayo puede ser incluido como parte de una serie más amplia de estudios para la caracterización de dragados portuarios ya que ofrece información útil y complementaria a otros bioensayos.

## Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Rosa Vázquez y al personal de la planta de cultivos marinos de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales por su ayuda durante la aclimatación de los organismos. Los autores agradecen a Laura Martín y Natalia Jiménez su ayuda durante el ejercicio. Este trabajo fue financiado parcialmente por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (REN2002\_01699/TECNO). El diseño de los ensayos de toxicidad para la caracterización de material de dragado se realizó mediante un proyecto conjunto entre el CEDEX y la Universidad de Cádiz (2001 y 2003). MC Casado fue financiada por el Ministerio Español de Educación y Ciencia en el programa de Formación de Personal Investigador (FPI). Nuestro agradecimiento a A. Luque por sus comentarios durante la preparación del manuscrito final.

## Referencias

- Bryan GW, Langston WJ, Hummerstone LG, Burt GR. 1985. A guide to the assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators. *Mar. Biol. Assoc. UK Occ. Publ.* 4: 1–92.
- Byrne PA, O'Halloran J. 1999. Aspects of assaying sediment toxicity in Irish estuarine ecosystems. *Mar. Pollut. Bull.* 39: 97–105.
- Byrne PA, O'Halloran J. 2000. Acute and sublethal toxicity of estuarine sediments to the Manila clam, *Tapes semidecussatus*. *Environ. Toxicol.* 15: 456–468.
- Carter MC. 2004. *Tapes philippinarum*. Manila clam. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom [cited 28/06/2005]. Available from <http://www.marlin.ac.uk/species/Tapesphilippinarum.htm>.

cannot confirm the lethal or sublethal effects related to organic contamination. In this sense our results indicate that burrowing activity measured just after the addition of test organisms is not a suitable endpoint for dredged material characterization. Although this endpoint introduces useful information, since burrowing is considered a defense mechanism against predation, the results suggest that the test design should be changed or possibly adapted to a new one such as that used by Byrne and O'Halloran (2000).

Despite previous successful results obtained for sediment toxicity assessment when testing samples affected by metallic contamination, this protocol does not seem to be suitable for dredged material toxicity assessment. The lethal endpoint is not sensitive enough to classify sediment toxicity probably because of the low availability of contaminants for filter-feeding species such as the Manila clam. Although the sensitivity can be increased by increasing the test duration, this would reduce the test's cost effectiveness. In the case of the sublethal endpoint, difficulties were found related to the number of laboratories capable of developing the test successfully. Based on these results, no limit values for dredged material classification were considered. Nevertheless, this assay could be included as part of a wider test battery since it can provide additional useful information for dredged material management.

## Acknowledgements

We thank Rosa Vázquez and the staff at the marine culture plant of the University of Cádiz for their help during the acclimation of test organisms, and Laura Martín and Natalia Jiménez for their help during the laboratory testing. This study was conducted under a joint research project between CEDEX and the University of Cádiz. Part of this work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (REN2002\_01699/TECNO). The first author was supported by a grant (FPI) from the Spanish Ministry of Education and Science. We are grateful to A. Luque for the useful comments on the final manuscript.

- 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).
- Duquesne S, Liess M, Bird DJ. 2004. Sublethal effects of metal exposure: Physiological and behavioral responses of the estuarine bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Environ. Res.* 58: 245–250.
- Mariño-Balsa JC, Pérez P, Estévez-Blanco P, Saco-Álvarez L, Fernández E, Beiras R. 2003. Assessment of the toxicity of sediment and seawater polluted by the Prestige fuel spill using bioassays with clams (*Venerupis pullastra*, *Tapes decussatus* and *Venerupis rhomboideus*) and the microalga *Skeletonema costatum*. *Cienc. Mar.* 29: 115–122.
- Olla BL, Bejda AJ. 1983. Effects of oiled sediment on the burrowing behaviour of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Environ. Res.* 9: 183–193.

- Phelps HL. 1990. Development of an estuarine sediment burrowing bioassay for shipboard use. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45: 722–728.
- 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: 261–264.
- Riba I, Casado-Martínez MC, Blasco J, Delvalls TA. 2004a. Effects of heavy metals bound to sediments affected by a mining spill using *Solea senegalensis* and *Scrobicularia plana*. *Mar. Environ. Res.* 58: 395–399.
- Riba I, Casado-Martínez MC, Forja JM, DelValls TA. 2004b. Sediment quality on the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 271–282.
- Roper DS, Nipper MG, Hickey CW, Martin ML, Weatherhead MA. 1995. Burial, crawling and drifting behaviour of the bivalve *Macomona liliana* in response to common sediment contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 471–478.
- Shin PKS, Ng AWM, Cheung RYH. 2002. Burrowing responses of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* to sediment contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 133–136.

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