

## Biodisponibilidad de metales en sedimentos de estuarios españoles utilizando *Carcinus maenas*

### Bioavailability of metals in sediments from Spanish estuaries using *Carcinus maenas*

ML Martín-Díaz<sup>1</sup>, I Riba<sup>1</sup>, MC Casado-Martínez<sup>2</sup>, A DelValls<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Campus Río Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.

<sup>2</sup> Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Campus Río San Pedro s/n, 11510 Puerto Real, Cádiz, España. \* E-mail: angel.valls@uca.es

#### Resumen

Se utilizaron hembras del cangrejo *Carcinus maenas* en estado de intermuda para evaluar la biodisponibilidad de metales en los sedimentos de tres estuarios españoles. Los organismos se expusieron a diferentes sedimentos en acuarios de cristal por replicado durante 21 días. Se llevó a cabo un análisis químico de los puntos de muestreo con el fin de determinar el grado y naturaleza de la contaminación. Durante toda la exposición en el laboratorio se controlaron salinidad, pH y contenido de oxígeno disuelto. El día 21 se determinaron las concentraciones de los diferentes metales (Cu, Zn, Pb, Hg y As) en tejido de branquia y en el sedimento. Los resultados mostraron una asociación entre la bioacumulación de Zn (975.50 mg kg<sup>-1</sup>) en los organismos y el enriquecimiento de este metal en el Estuario del Guadalquivir después del accidente minero de Aznalcóllar (abril de 1998). Sin embargo, la bioacumulación de Cu (548.90 mg kg<sup>-1</sup>) mostró diferentes tendencias relacionadas con otras fuentes como el vertido crónico de aguas ácidas en la Ría de Huelva. Se observaron relaciones entre el contenido de metal en el sedimento y en el tejido de branquia a través del Factor de Acumulación Biota-Sedimento (BSAF). Esta relación valida el uso del contenido de metales en tejido biológico para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos contaminados.

*Palabras clave:* bioacumulación, invertebrados, toxicidad.

#### Abstract

Intermoult female crabs (*Carcinus maenas*) were used to evaluate the bioavailability of metals in sediments from three Spanish estuaries. Animals were exposed to the different sediments per replicate in glass aquaria during 21 days. A chemical analysis of the sampling sites was performed to determine the degree and nature of contamination. Salinity, pH and dissolved oxygen were controlled throughout the laboratory exposure. On day 21, the concentrations of different metals (Cu, Zn, Pb, Hg and As) were analyzed in gill tissues and in sediments. The results showed that bioaccumulation of Zn (975.50 mg kg<sup>-1</sup>) in the organisms was associated with the enrichment of this metal in the Guadalquivir Estuary after the Aznalcóllar mining spill (April 1998), while bioaccumulation of Cu (548.90 mg kg<sup>-1</sup>) showed different trends that are associated with other sources of contamination, such as the chronic spill of acidic waters in Huelva Ria. Relationships were observed between metal content in sediments and metal content in gill tissues through the biota-sediment accumulation factor. This relationship validates the use of bioaccumulation measurements to evaluate the bioavailability of metals in contaminated sediments.

*Key words:* bioaccumulation, invertebrates, toxicity.

#### Introducción

Los sedimentos son importantes para el estudio de la polución de ambientes acuáticos y son conocidos por transportar diferentes contaminantes; también constituyen sumideros o fuentes de algunos contaminantes hacia la columna de agua (Förster y Wittman 1979). Para una mejor evaluación del proceso de polución en el medio costero marino, varios autores proponen un análisis basado en la determinación conjunta de la composición química y ensayos de toxicidad en el laboratorio (Long *et al.* 1995). Los estudios de bioacumulación de diferentes contaminantes pueden ayudar en la identificación de la biodisponibilidad de compuestos químicos en sedimentos y agua marinos, ya que, al contrario del análisis químico, la bioacumulación proporciona una

#### Introduction

Sediments are significant in studies of pollution in aquatic environments and are known to transport different contaminants. Sediments also serve as a sink or source to the water column of some contaminants (Förster and Wittman 1979). For a better assessment of the pollution process in the marine coastal environment, several authors have proposed determinations based on chemical measurements together with laboratory toxicity tests (Long *et al.* 1995). Studies on the bioaccumulation of different contaminants can help to identify the bioavailability of chemicals in marine sediments and waters, since unlike chemical analyses, bioaccumulation provides a measurement of bioavailable contaminants (Van Gestel and Van Brummelen 1996).

medida de los contaminantes biodisponibles (Van Gestel y Van Brummelen 1996).

La biodisponibilidad de compuestos químicos, que depende de procesos biogeoquímicos y fisiológicos, constituye un factor importante, a menudo desatendido en la evaluación ecotoxicológica y del riesgo. La fracción biodisponible es crítica en la incorporación, y finalmente, en la concentración en los organismos en el lugar en cuestión. El factor de bioacumulación permite predecir si el compuesto químico biodisponible es bioacumulado. La presencia de contaminación no indica el potencial de los efectos adversos. Un contaminante puede presentar efectos tóxicos sólo si se encuentra en una forma biodisponible (Suter 1993) y el compuesto puede incorporarse a la célula del animal o influir en el proceso normal del organismo.

En el presente estudio se seleccionaron diferentes sedimentos de áreas del Golfo de Cádiz afectados por actividades mineras, para caracterizar la biodisponibilidad de varios metales (Cu, Zn, Pb, Hg y As) haciendo uso del cangrejo hembra como especie bioindicadora.

Los objetivos de este estudio fueron: (a) la determinación de la biodisponibilidad de los diferentes metales del sedimento y los efectos asociados a la exposición del cangrejo *Carcinus maenas* a éstos, en el laboratorio, (b) la evaluación de las diferencias significativas entre diferentes puntos de muestreo en lo que se refiere al contenido de metal en tejido biológico.

## Materiales y métodos

Para la caracterización de la biodisponibilidad de metales se seleccionaron tres áreas estuáricas diferentes afectadas por actividades mineras en el Golfo de Cádiz (fig. 1). El Estuario del Guadalquivir (GR2 y GL2) se vio afectado por un vertido minero agudo (abril de 1998) causado por la rotura de la balsa de residuos de una mina pirítica localizada en Aznalcóllar (Gómez-Parra *et al.* 2000). La Ría de Huelva (Hu1, Hu2 y Hu3) es un área fuertemente industrializada situada en la desembocadura de dos estuarios pertenecientes a los ríos Tinto y Odiel. Éstos recibieron vertidos de aguas fluviales ácidas con altas concentraciones de metales de la época del Imperio Romano, hace varios siglos (Cabrera *et al.* 1992). Finalmente, el área de Cádiz (Ca0) es un área poco contaminada sin una contaminación significativa y en este estudio se seleccionó como un área no afectada por actividades mineras (DeIvalls y Chapman 1998). Como control de toxicidad negativa y contaminación se escogió el área afectada por el accidente minero de Aznalcóllar y se puso a punto un lodo tóxico artificial (TM1 = 8% y TM2 = 30% del vertido del accidente de Aznalcóllar; Riba *et al.* 2002).

### Selección de organismos

Se utilizaron organismos de hembra en intermuda de *C. maenas* para el desarrollo de estos ensayos. Esta especie se ha estudiado ampliamente y ha sido utilizada en el monitoreo de áreas contaminadas. Se tomaron ejemplares de *C. maenas* de

The bioavailability of chemicals, which is dependent on biogeochemical and physiological processes, is an important factor, often neglected in ecotoxicological evaluation and hazard assessment. The bioavailable fraction is critical for uptake and, ultimately, for the concentration at the target site in the organisms. The bioaccumulation factor allows predicting if a bioavailable chemical is being bioaccumulated. The presence of contamination does not indicate the potential for adverse effects. A contaminant can have toxic effects only if it occurs in a bioavailable form (Suter 1993) and the compound can enter the cell of the animal or influence the normal processes of the organism.

In the present study, sediments from different estuarine areas affected by mining activities in the Gulf of Cádiz were selected to characterize the bioavailability of several metals (As, Cu, Zn, Pb and Hg), using the female crab *Carcinus maenas* as a bioindicator species.

The objectives of this study were: (a) to determine the bioavailability of different metals from sediments and the effects associated with them in laboratory-exposed *C. maenas*, and (b) to assess the significant differences among sampling sites related to the bioaccumulation measured.

## Material and methods

Three different estuarine areas in the Gulf of Cádiz were selected to characterize the bioaccumulation of heavy metals originated by mining activities (fig. 1). The Guadalquivir Estuary (GR2 and GL2) was impacted by an acute mining spill in April 1998 caused by the breakage of a tailing pond in a pyrite mine located in Aznalcóllar (Gómez-Parra *et al.* 2000). The Huelva Ria (Hu1, Hu2 and Hu3) is a heavily industrialized area located at the mouth of two estuaries defined by the Tinto

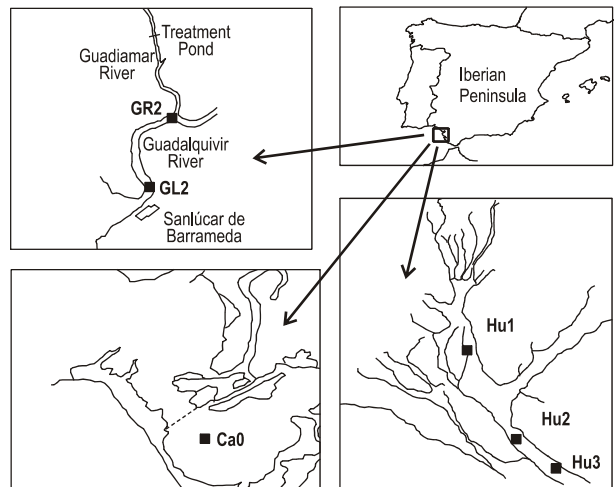


Figura 1. Mapa de las zonas seleccionadas en la Península Ibérica para el estudio, en el que se muestra la localización de los puntos de muestreo.  
Figure 1. Map of the areas in the Iberian Peninsula selected for this study showing the location of the sampling sites.

tamaño estandarizado (Martín-Díaz *et al.* 2004), de una granja de acuicultura localizada en una zona limpia de la costa. Los cangrejos se aclimataron durante dos semanas antes del comienzo del bioensayo.

#### *Toma de muestras de sedimento*

Se tomaron muestras de sedimento superficial (5–10 cm) de la Ría de Huelva, áreas adyacentes al Río Guadalquivir y la Bahía de Cádiz, con una draga Van Veen de 0.025 m<sup>2</sup> de área. Las muestras se transportaron al laboratorio para su caracterización fisicoquímica y toxicológica. Las muestras de sedimento se tamizaron a través de una malla de 0.5 µm de luz con el fin de eliminar la macrofauna asociada y las partículas de mayor tamaño. Las muestras se mantuvieron a 4°C en la oscuridad hasta que se utilizaron para la evaluación de la toxicidad.

#### *Ensayos de toxicidad*

Los individuos se expusieron a diferentes sedimentos durante 21 días. Cada muestra de sedimento se ensayó por replicado en acuarios de cristal de 20 L de capacidad. Los ensayos se llevaron a cabo en el sedimento utilizando una proporción 1:4 v/v sedimento/agua, conteniendo una lámina de 6 cm de espesor y manteniendo una aireación constante. Diariamente se controlaron y midieron temperatura ( $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ), salinidad ( $33.8 \pm 0.3$ ) y oxígeno disuelto ( $>5 \text{ mg L}^{-1}$ , 60% de saturación). Para el presente estudio se utilizaron hembras de *C. maenas* en estado de intermuda (ocho individuos por tanque). Los cangrejos se alimentaron con mejillones congelados, siempre antes del cambio de agua (agua de mar filtrada). Al final del experimento los animales se diseccionaron y las branquias se liofilizaron.

#### *Análisis químico del sedimento*

Los metales se determinaron en la fracción <0.5 mm de tamaño de grano de sedimento mediante espectrofotometría de absorción atómica, siguiendo la metodología utilizada por Riba *et al.* (2002). Todos los procedimientos analíticos se validaron con material de referencia (MESS-1 NRC y CRM 277 BCR para metales) obteniéndose resultados coincidentes con los valores de material certificado en más de un 90%.

#### *Concentración de metales en tejidos de branquia*

Los análisis de metales se realizaron en muestras de branquias de hembra *C. maenas* liofilizadas. Las muestras se digirieron con ácido nítrico (Suprapur) y peróxido de hidrógeno (Suprapur) durante 1 h a 95°C. Posteriormente se llevaron a un volumen total de 5 mL con agua destilada y fueron analizadas con ICP-MS (Amiard *et al.* 1991). Las concentraciones de metales obtenidas se validaron realizando análisis de metales en material de referencia TORT II de hepatopáncreas de langosta (National Research Council Ottawa, Canadá). Los

and Odiel rivers; it received acidic fluvial water discharges with high concentrations of heavy metals from the time of the Roman Empire, several centuries ago (Cabrera *et al.* 1992). Cádiz Bay (Ca0) is an area without significant contamination and it was selected for this study because it is not affected by mining activities (DeValls and Chapman 1998). The area affected by the Aznalcóllar mining spill was selected as a positive control of toxicity and contamination, using artificial toxic mud (TM1 = 8% and TM2 = 30% Aznalcóllar mining spill; Riba *et al.* 2002).

#### *Selection of organisms*

Individuals of intermolt female *C. maenas* were used for the development of these assays. This species has been widely studied and has already been used in the biomonitoring of contaminated sites. Specimens of *C. maenas*, of standard size (Martín-Díaz *et al.* 2004), were purchased from an aquaculture farm located at a clean coastal site. Crabs were acclimatized for two weeks prior to the assays.

#### *Sediment sample collection*

Surface sediment samples (5–10 cm) were collected from Huelva Ria, from areas surrounding the Guadalquivir River and from Cádiz Bay using a 0.025-m<sup>2</sup> Van Veen grab. The samples were transported to the laboratory and subsampled for physical-chemical and toxicological characterization. They were then sieved through a 0.5-µm mesh into a tank in order to remove any associated macrofauna and larger sediment particles. Samples were kept at 4°C in darkness until they were used in toxicity testing.

#### *Toxicity tests*

Individuals were exposed to the different sediments during 21 days. Each sediment sample was tested per replicate in 20-L glass aquaria. The tests were carried out in whole sediment using a 1:4 v/v sediment/water relation containing a 6-cm layer, with constant aeration. Temperature ( $15 \pm 1^\circ\text{C}$ ), pH (7.8–8.2), salinity ( $33.8 \pm 0.3$ ) and dissolved oxygen ( $>5 \text{ mg L}^{-1}$ , 60% saturation) were measured and controlled every day. Eight intermolt female crabs (*C. maenas*) were placed in each tank and fed frozen mussels, always before the water change (filtered seawater). At the end of the experiment, the animals were dissected and gill tissues were lyophilized.

#### *Chemical analysis of sediments*

Metals were determined in the <0.5-mm grain size fraction of the sediment using atomic absorption spectrophotometry, following the methodology used by Riba *et al.* (2002). All the analytical procedures were checked using reference material (MESS-1 NRC and CRM 277 BCR for heavy metals and NCR-CNRC HS-1 for organic compounds), more than 90% of the results coinciding with the certified values.

resultados son coincidentes con los valores de material certificado en más de un 90%.

#### Tratamiento de datos

La concentración de cada metal en tejidos de branquia de los cangrejos expuestos a diferentes sedimentos se normalizó respecto a la concentración de metal en tejidos de branquia de los cangrejos expuestos al sedimento control (Ca0).

Las concentraciones experimentales determinadas en las muestras biológicas se analizaron utilizando el test estadístico ANOVA de una cola, seguido de una comparación múltiple del test de Dunett, para identificar diferencias significativas entre individuos expuestos a sedimento control e individuos expuestos a sedimentos contaminados.

Con el fin de calcular la biodisponibilidad de los contaminantes se determinó el Factor de Acumulación Biota-Sedimento (BSAF) para cada metal y sedimento. Este factor para cada metal es la relación entre su concentración en el organismo y en el sedimento (Van der Oost *et al.* 2003).

## Resultados

#### Concentración de compuestos químicos en sedimento

En la tabla 1 se muestran las concentraciones de metales en los diferentes sedimentos recogidos en la Ría de Huelva (Hu1, Hu2, Hu3), áreas adyacentes al Rfo Guadalquivir (GL2, GR2, TM1 y TM2) y la Bahía de Cádiz (Ca0). Además, se muestran los resultados resumidos de los parámetros convencionales del sedimento tales como los porcentajes de materia orgánica y tamaño de grano. Las características de los sedimentos variaron entre los estuarios y las zonas. El porcentaje de finos osciló entre 1.713% en el sedimento de Ca0 y 91.000% en el sedimento de GR2. Esta variabilidad tan grande también se observó en el contenido de carbono orgánico, que osciló de 0.412% para los sedimentos de TM2 a 3.651% para los sedimentos de Hu1. En lo que respecta a las concentraciones de contaminantes en los sedimentos, las concentraciones más altas para todos los metales excepto Cu se encontraron en TM2 (Zn: 3342.00 mg kg<sup>-1</sup>, Pb: 957.61 mg kg<sup>-1</sup>, Hg: 8.41 mg kg<sup>-1</sup>, y As: 1317.62 mg kg<sup>-1</sup>), seguido de los sedimentos de la Ría de Huelva (Hu1, Hu2 y Hu3) y finalmente los correspondientes al Estuario del Guadalquivir (GR2 y GL2). El sedimento de la Bahía de Cádiz presentó las concentraciones de metal más bajas (Cu: 1.34 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: 6.28 mg kg<sup>-1</sup>, Pb: 4.59 mg kg<sup>-1</sup>, Hg: 0.00 mg kg<sup>-1</sup>, y As: 1.86 mg kg<sup>-1</sup>), lo que validó su uso como control de toxicidad negativo.

#### Concentración de metales en tejidos de branquia

En la figura 2 se muestran los resultados correspondientes a la concentración de metales (Cu, Zn, Pb, Hg y As) determinada en los tejidos de branquia de *C. maenas* tras 21 días. La concentración media de metal de los individuos expuestos a los

#### Metal concentrations in gill tissues

Metal determinations were performed on lyophilized, dissected gill samples of female *C. maenas*. Samples were digested with nitric acid (Suprapur) and hydrogen peroxide (Suprapur) for 1 h at 95°C. They were then brought to a total volume of 5 mL with distilled water and analyzed by inductively coupled plasma and mass spectroscopy (Amiard *et al.* 1991). The analyzed concentrations were validated by performing metal analyses on reference material TORT II lobster hepatopancreas (National Research Council Ottawa, Canada). The results showed an agreement between the chemical concentration and standards of about 90%.

#### Data treatment

The concentration of each metal in gill tissues of crabs exposed to different sediments was standardized using the metal concentration in gill tissues of crabs exposed to the control sediment (Ca0).

Experimental metal concentrations determined in biological samples were analyzed using a one-way ANOVA, followed by Dunett's multiple comparison test in order to identify significant differences between individuals exposed to control and contaminated sediments.

To calculate the bioavailability of the contaminants, the biota-sediment accumulation factor (BSAF) was determined for each metal and sediment. This BSAF of each metal is the ratio of its concentration in the organism and in sediment (Van der Oost *et al.* 2003).

## Results

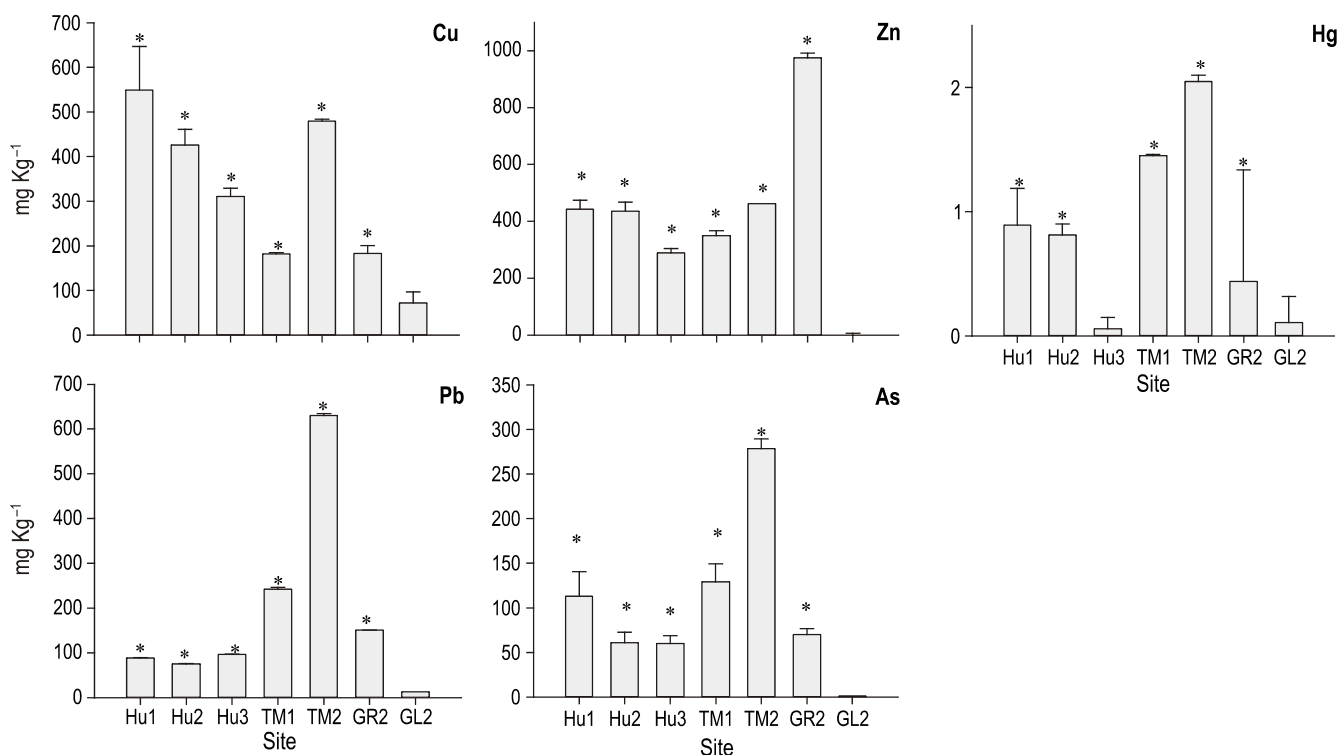
#### Chemical concentration in sediments

The chemical concentrations of metals in the different sediments collected from Huelva Ria (Hu1, Hu2 and Hu3), from areas adjacent to the Guadalquivir River (GL2, GR2, TM1 and TM2) and from Cádiz Bay (Ca0) are shown in table 1. Also shown are the summarized results of conventional sediment parameters such as organic matter and grain size percentages. The general characteristics of the sediments varied among the estuaries and sites. The percentage of fine grain sediments ranged from 1.713% for Ca0 sediments to 89.323% for Hu1 sediments. A large variability was also observed for the organic carbon content, which ranged from 0.412% for TM2 sediments to 3.651% for Hu1 sediments. Concerning the concentrations of contaminants in the sediments, the highest levels for all the metals, except for Cu, were determined in the TM2 sediments (Zn: 3342.00 mg kg<sup>-1</sup>, Pb: 957.61 mg kg<sup>-1</sup>, Hg: 8.41 mg kg<sup>-1</sup>, and As: 1317.62 mg kg<sup>-1</sup>), followed by the Huelva Ria sediments (Hu1, Hu2 and Hu3) and finally by those from the Guadalquivir Estuary (GR2 and GL2). The sediment from Cádiz Bay had the lowest metal concentrations (Cu: 1.34 mg kg<sup>-1</sup>, Zn: 6.28 mg kg<sup>-1</sup>, Pb: 4.59 mg kg<sup>-1</sup>,

**Tabla 1.** Resumen del contenido de carbono orgánico (% OC), porcentaje de sedimentos de grano fino (% FGS) y concentración de metales, analizados en diferentes sedimentos recogidos en la Bahía de Cádiz (C0), la Ría de Huelva (Hu1, Hu2 y Hu3), el Estuario del Guadalquivir (GR2 y GL2) y las diluciones del lodo tóxico del accidente minero de Aznalcóllar (TM1 y TM2). Las concentraciones se expresan en mg kg<sup>-1</sup> de peso seco.

**Table 1.** Organic matter content (% OC), percentage of fine grain sediments (% FGS) and chemical concentration of metals analyzed in different sediments collected from Cádiz Bay (C0), Huelva Ria (Hu1, Hu2 and Hu3) and Guadalquivir Estuary (GR2 and GL2) and in toxic mud dilutions from the Aznalcóllar mining spill (TM1 and TM2). Concentrations are expressed as mg kg<sup>-1</sup> dry weight.

Variable	Ca0	Hu1	Hu2	Hu3	TM1	TM2	GR2	GL2
% OC	0.71	3.65	3.03	2.59	0.42	0.40	2.51	1.81
% FGS	1.71	89.32	84.80	58.00	7.61	28.51	91.00	80.00
Cu	1.35	2012.00	2438.00	979.00	127.52	478.21	30.00	30.61
Zn	6.28	2551.00	2695.00	1310.00	891.22	332.00	152.00	94.33
Pb	4.59	423.00	433.00	270.00	255.36	957.61	35.44	25.00
Hg	0.00	2.33	3.49	1.47	2.24	8.41	0.11	0.14
As	1.86	343.00	527.00	213.00	351.36	1317.62	9.36	5.24



**Figura 2.** Resumen de los resultados de la concentración media de metal (Cu, Zn, Hg, Pb y As) determinada el día 21 en tejidos de branquia de *Carcinus maenas* expuestos a sedimentos de la Ría de Huelva (Hu1, Hu2 y Hu3), el Estuario del Guadalquivir (GR2 y GL2) y diluciones del lodo tóxico procedente del accidente minero de Aznalcóllar (TM1 y TM2). Las concentraciones de metal están estandarizadas teniendo en cuenta las concentraciones de los individuos expuestos al sedimento control (Ca0). El asterisco representa diferencias significativas con el tratamiento control ( $P < 0.001$ ).

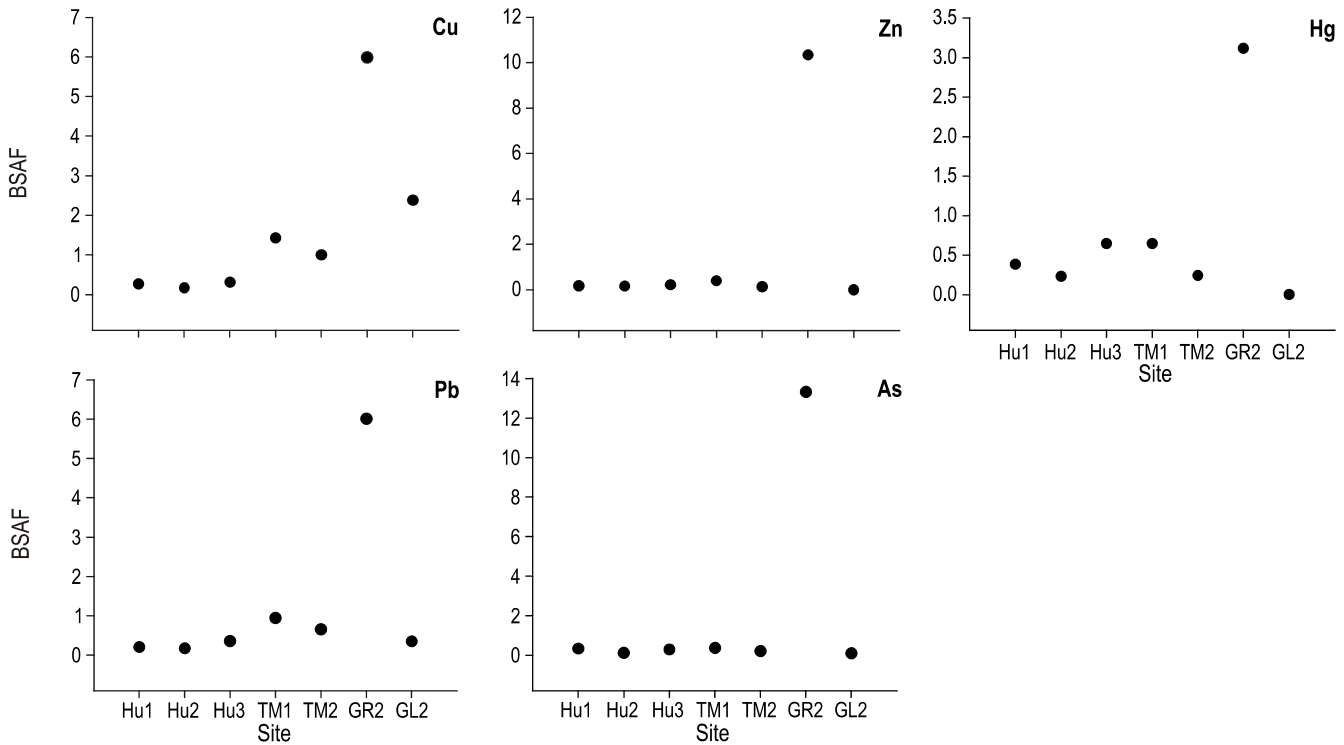
**Figure 2.** Mean metal concentrations (Cu, Zn, Hg, Pb and As) in gill tissues of *Carcinus maenas* after 21 days of exposure to sediments from the Huelva Ria (Hu1, Hu2 and Hu3) and Guadalquivir Estuary (GR2 and GL2) and to toxic mud dilutions from the Aznalcóllar mining spill (TM1 and TM2). Metal concentrations were standardized using concentrations from individuals exposed to control sediments (Ca0). The asterisk indicates significant differences with the control treatment ( $P < 0.001$ ).

diferentes sedimentos se estandarizó con la concentración media de metal determinada en los individuos control. Se observaron concentraciones significativas ( $P < 0.001$ ) de metal en comparación con el control en todos los tratamientos excepto en los individuos expuestos a sedimentos de GL2. En este caso, no se observó un contenido significativo para ninguno de los metales determinados (Cu, Zn, Pb, Hg y As).

Hg: 0.00 mg kg<sup>-1</sup>, and As: 1.86 mg kg<sup>-1</sup>), thus validating its use as negative toxicity control.

#### Metal concentration in gill tissues

The summarized results of the metal concentrations (Cu, Zn, As, Pb and Hg) determined at the end of the exposure



**Figura 3.** Representación de los factores de acumulación biota-sedimento (BSAF) determinados para cada metal (Cu, Zn, Hg, Pb y As) y sedimento de la Ría de Huelva (Hu1, Hu2 y Hu3), Estuario del Guadalquivir (GR2 y GL2) y diluciones de lodo tóxico del accidente minero de Aznalcóllar (TM1 y TM2).  
**Figure 3.** Representation of the biota-sediment accumulation factors (BSAF) determined for each metal (Cu, Zn, Hg, Pb and As) and sediment from the Huelva Ría (Hu1, Hu2 and Hu3) and Guadalquivir Estuary (GR2 and GL2) and for toxic mud dilutions from the Aznalcóllar mining spill (TM1 and TM2).

El contenido de metales en los individuos expuestos a la menor dilución de lodo tóxico TM2 alcanzó los valores más altos de concentración de todos los metales en tejidos de branquia excepto para Cu, cuya concentración fue mayor en tejidos de branquia de organismos expuestos a sedimentos de Hu1 (1.14 veces) y para Zn en organismos expuestos a sedimentos de GR2 (2.11 veces). El material tóxico del accidente minero de Aznalcóllar no se caracterizó por una significativa concentración de Cu (Riba *et al.* 2002) y este resultado confirma esta afirmación. Por el contrario, la dilución más pequeña de lodo tóxico utilizada para este experimento resultó ser un buen control positivo de toxicidad.

La bioacumulación de metal en la Ría de Huelva (Hu1, Hu2 y Hu3) alcanzó los valores más altos para la bioacumulación de Cu (580.90 mg kg<sup>-1</sup>) y Zn (442.55 mg kg<sup>-1</sup>), y la menor para Hg (0.05 mg kg<sup>-1</sup>) y As (75.47 mg kg<sup>-1</sup>). En lo que se refiere a las diferentes diluciones de lodo tóxico (TM1 y TM2), el mayor contenido de metal se determinó en los relacionados con los metales Zn (461.55 mg kg<sup>-1</sup>) y Pb (330.41 mg kg<sup>-1</sup>), y el más bajo para As (331.40 mg kg<sup>-1</sup>) y Hg (2.05 mg kg<sup>-1</sup>). Finalmente, en GR2 y GL2, el contenido más alto de metales se determinó para Zn (975.50 mg kg<sup>-1</sup>) y Cu (186.04 mg kg<sup>-1</sup>), siendo el menor para As (12.45 mg kg<sup>-1</sup>) y Hg (0.10 mg kg<sup>-1</sup>).

En la figura 3 se muestran los BSAFs obtenidos para cada metal y sedimento. Los metales más biodisponibles en los sedimentos analizados fueron el As y Zn, seguidos de Pb, Cu y Hg.

period in *C. maenas* gill tissues are shown in figure 2. The mean metal concentration of individuals exposed to different sediments was standardized with the mean metal concentration determined in control individuals (Ca0). Significant metal bioaccumulation was observed for all treatments compared with the control ( $P < 0.001$ ), except for those individuals exposed to the GL2 sediments. In this case, no significant metal concentration was observed for any of the metals analyzed.

Metal content in individuals exposed to the lowest dilution of toxic mud (TM2) reached the highest values of all metal bioaccumulation except for Cu and Zn, which were higher in Hu1 (1.14 fold) and GR2 (2.11 fold) sediments, respectively. The Aznalcóllar mining spill was not characterized by a significant concentration of Cu (Riba *et al.* 2002) and our result confirms this affirmation. On the other hand, the lowest toxic mud dilution used for this experiment proved to be a good positive toxicity control.

The highest metal bioaccumulation values in the Huelva Ría (Hu1, Hu2 and Hu3) corresponded to Cu (548.90 mg kg<sup>-1</sup>) and Zn (442.55 mg kg<sup>-1</sup>), and the lowest to Hg (0.05 mg kg<sup>-1</sup>) and As (75.47 mg kg<sup>-1</sup>). Concerning the different dilutions of toxic mud (TM1 and TM2), the highest bioaccumulation corresponded to Zn (461.55 mg kg<sup>-1</sup>) and Pb (330.41 mg kg<sup>-1</sup>), and the lowest to As (331.40 mg kg<sup>-1</sup>) and Hg (2.05 mg kg<sup>-1</sup>). Finally, in GR2 and GL2, the highest bioaccumulation was

Los sedimentos prodecentes de GR2 muestran la mayor biodisponibilidad para todos los metales. Esto podría explicar el hecho de que para concentraciones muy próximas de Cu y Hg en sedimentos de GR2 y GL2 se hayan determinado mayores niveles de metal (Cu y Hg) en tejidos de branquia de individuos expuestos a sedimentos de GR2. El analizar el comportamiento en la bioacumulación, la biodisponibilidad de la sustancia considerada es un parámetro crucial para poder obtener resultados válidos (Franke *et al.* 1994). Las desviaciones en los BSAFS pronosticados con modelos pueden por tanto ser debidas a diferencias en la biodisponibilidad de los compuestos químicos, posiblemente como resultado de una pronunciada variación dependiente la zona, de los perfiles de bioacumulación de ciertos contaminantes (Van der Oost *et al.* 2003).

## Discusión

La relación entre el contenido de metal en sedimentos y tejidos de branquia del cangrejo *C. maenas* expuesto a sedimentos de estuarios españoles durante 21 días está en discusión (Blasco *et al.* 1999, Campana *et al.* 2005). Los estuarios son las áreas costeras más intensamente utilizadas y más vulnerables (Riba *et al.* 2005). En el presente estudio se seleccionaron diferentes áreas estuáricas para la determinación de la bioacumulación de metales originada por las actividades mineras: el Estuario del Guadalquivir, afectado por una contaminación aguda debido a un vertido minero (abril de 1998) (GR2 y GL2) y la Ría de Huelva, un área fuertemente industrializada y afectada por episodios crónicos de contaminación metálica. La bioacumulación de los contaminantes en tejidos de organismos puede ser útil para la evaluación de la transferencia trófica potencial de contaminantes (Chapman 1997). Los estudios basados en la exposición de organismos a muestras de sedimento bajo condiciones de laboratorio pueden proporcionar una aproximación sobre los orígenes de la bioacumulación por metales (Van der Oost *et al.* 2003, Rodríguez de la Rúa *et al.* 2005).

Tras 21 días de exposición, las concentraciones de metal (Cu, Zn, Pb, Hg y As) en tejidos de branquia de *C. maenas* mostraron valores significativamente mayores para todos los sedimentos analizados comparados con el control, excepto para GL2, la zona más distante del vertido minero de Aznalcóllar. El Cu se bioacumuló significativamente ( $P < 0.001$ ) en organismos expuestos a sedimentos del área de la Ría de Huelva, especialmente en Hu1 (548.90 mg kg<sup>-1</sup>). Por otro lado, los metales Zn, Pb y As, con origen en el accidente minero de Aznalcóllar, mostraron mayor bioacumulación en individuos expuestos a sedimentos del área del Guadalquivir, concretamente en sedimentos de GR2, la zona más próxima al vertido minero de Aznalcóllar. Estos resultados confirman los obtenidos por Riba *et al.* (2005), quienes tras exponer a los mismos sedimentos al pez *Solea senegalensis* y la almeja *Ruditapes philippinarum* en el laboratorio, encontraron bioacumulación de Zn en organismos expuestos a sedimentos del Estuario del Guadalquivir (GR2), asociada con el

determinado for Zn (975.50 mg kg<sup>-1</sup>) and Cu (186.04 mg kg<sup>-1</sup>), and the lowest for As (12.45 mg kg<sup>-1</sup>) and Hg (0.10 mg kg<sup>-1</sup>).

The BSAFs obtained for each metal and sediment are shown in figure 3. The most bioavailable metals in the sediments tested were As and Zn, followed by Pb, Cu and Hg. Sediments from GR2 showed the highest bioavailability of all the metals. This behavior could explain the fact that for very similar Cu and Hg concentrations in the GR2 and GL2 sediments, higher metal values (Cu and Hg) were determined for gill tissues of individuals exposed to GR2 sediments. When measuring bioaccumulation behavior, the bioavailability of the substance considered is a crucial parameter for valid results (Franke *et al.* 1994). Deviations in BSAF values predicted with the partitioning models may thus partly be due to differences in bioavailability of the chemicals, possibly resulting in a pronounced site-specific variation in bioaccumulation profiles of certain contaminants (Van der Oost *et al.* 2003).

## Discussion

The relationship between metal content in sediments and gill tissues of the crab *C. maenas* exposed for 21 days to sediments from metal-contaminated Spanish estuaries is under discussion (Blasco *et al.* 1999, Campana *et al.* 2005). Estuaries are the most intensively used and vulnerable coastal areas (Riba *et al.* 2005). In the present study, different estuarine areas were chosen to determine the bioaccumulation of metals originated by mining activity: the Guadalquivir Estuary (GR2 and GL2), impacted by an acute contamination due to a mining spill (April 1998), and the Huelva Ria, a heavily industrialized area impacted by chronic episodes of metal contamination. Bioaccumulation of contaminants in organisms' tissues can be useful for assessing the potential trophic transfer of contaminants (Chapman 1997). Studies based on the exposure of organisms to sediment samples under laboratory conditions can provide an approximation of the origins of metal bioaccumulation (Van der Oost *et al.* 2003, Rodríguez de la Rúa *et al.* 2005).

After 21 days of exposure, the metal concentrations (Cu, Zn, Pb, Hg and As) in gill tissues of *C. maenas* were significantly higher ( $P < 0.001$ ) for all the sediments tested compared with the control (Ca0), except for GL2, the site farthest from the Aznalcóllar mining spill. Also, Cu was found to be significantly ( $P < 0.001$ ) bioaccumulated in organisms exposed to the Huelva Ria sediments, especially Hu1 (548.90 mg kg<sup>-1</sup>). On the other hand, the metals As, Zn and Pb, with an origin in the Aznalcóllar mining spill, showed greater bioaccumulation in individuals exposed to sediments from the Guadalquivir area, in particular from GR2, the site that was closest to the Aznalcóllar mining spill. These results confirm those obtained by Riba *et al.* (2005), who after exposing the fish *Solea senegalensis* and the clam *Ruditapes philippinarum* to the same sediments in the laboratory, observed bioaccumulation of Zn in organisms exposed to sediments from the Guadalquivir Estuary (GR2), associated with the enrichment of this metal

enriquecimiento de este metal por el vertido minero. La bioacumulación de Zn asociada a sedimentos afectados históricamente por actividades mineras ha sido ya mencionada por otros autores como Marín-Guirao *et al.* (2005) en el alga *Cymodocea nodosa* (Mar Menor, SE España) y por Gutiérrez-Galindo *et al.* (1999) en el mejillón *Modiolus capax* (Santa Rosalía, Baja California, México).

Durante los primeros días después del vertido minero de Aznalcóllar se produjo un vertido significativo de metales en el Río Guadalquivir, de los cuales algunos mostraron concentraciones muy altas que fueron tóxicas para especies autóctonas como el cangrejo *Carcinus maenas* y la almeja *R. philippinarum*, en simulaciones en el laboratorio (Martín-Díaz *et al.* 2004, 2005). En estos estudios se observó una bioacumulación significativa con respecto al control en los organismos expuestos a diferentes concentraciones de Cd, Cu y Zn determinadas en el Estuario del Guadalquivir tras el accidente minero de Aznalcóllar. La bioacumulación de estos metales en tejidos de branquia, glándula digestiva y gónada se asoció con alteraciones y daño celulares.

La contribución de la concentración de metales asociada a sedimentos a la bioacumulación total determinada en organismos expuestos es un proceso complejo y abarca homeostasis, variabilidad natural y la importancia de la biodisponibilidad. En el presente estudio los BSAFs se calcularon para determinar la biodisponibilidad de los metales asociados a los sedimentos analizados. Los metales presentes en el sedimento de GR2 fueron los más biodisponibles de todos los sedimentos analizados. Los sedimentos de GR2 se caracterizan por el mayor porcentaje de finos (91.00%), lo que podría influir en el aumento de la biodisponibilidad de los metales para *C. maenas*. Al determinar la contribución de los sedimentos como fuentes de metales, la biodisponibilidad de estos metales es una herramienta importante para entender la bioacumulación que puede causar en los organismos expuestos. Sin embargo, existen varios parámetros abióticos y bióticos que afectan a la biodisponibilidad y acumulación en los tejidos de organismos. De los parámetros abióticos, los más importantes son la especiación de metales, salinidad, temperatura, pH, altura en la columna de agua, microhábitat, interacción con otros metales, etc. (Lobel *et al.* 1989); de los bióticos son tamaño y/o peso corporal, diferencias fenotípicas, sexo, condiciones fisiológicas y estado de reproducción los más importantes. Por lo tanto, es más adecuado evaluar la biodisponibilidad mediante medidas directas de bioacumulación de compuestos específicos en organismos. Estos estudios de biodisponibilidad se han llevado a cabo en varios países para la evaluación del sedimento (Catsiki *et al.* 1994). Muchos autores han estudiado las relaciones entre biodisponibilidad y bioacumulación para la evaluación de la toxicidad del sedimento (Campana *et al.* 2005, Otero *et al.* 2005, Ruus *et al.* 2005).

El resumen, los presentes resultados han mostrado una bioacumulación de Zn en los organismos estudiados en el Estuario del Guadalquivir, identificada con un origen en el vertido minero agudo de Aznalcóllar; y una bioacumulación de Cu en

from the mining spill. Bioaccumulation of Zn associated with exposure to sediments influenced by historical mining activities has already been documented by other authors, such as Marín-Guirao *et al.* (2005) for the seagrass *Cymodocea nodosa* (Menor coastal lagoon, SE Spain) and Gutiérrez-Galindo *et al.* (1999) for the mussel *Modiolus capax* (Santa Rosalía, Baja California, Mexico).

During the first days after the Aznalcóllar mining spill there was a significant discharge of heavy metals into the Guadalquivir River, some of them in very high concentrations that were toxic to native species such as the crab *Carcinus maenas* and the clam *R. philippinarum* under laboratory simulations (Martín-Díaz *et al.* 2004, 2005). In these studies, significant bioaccumulation compared with control treatments was observed in individuals exposed to different concentrations of Cd, Cu and Zn determined at the Guadalquivir Estuary after the Aznalcóllar mining spill. Bioaccumulation of these metals in gill, digestive gland and gonad tissues was associated with cell alterations and cell damage.

The contribution of the concentration of metals bound to sediments to the total bioaccumulation measured in exposed organisms is a complex process and involves homeostasis, natural variability and the importance of bioavailability. In the present study, BSAFs were calculated in order to determine the bioavailability of metals bound to the sediments tested. The sediments from GR2 were found to be most bioavailable for all the metals analyzed. This site had the highest percentage of fine sediments (91.00%), which could influence in increasing the bioavailability of metals for *C. maenas*. When determining the contribution of sediments as sources of metals, the bioavailability of these metals is an important tool to understand the bioaccumulation that can occur in the exposed organisms. There are, however, several abiotic and biotic parameters that affect metal bioavailability and accumulation in the soft tissue of organisms. Of the abiotic parameters, the most important are those such as metal speciation, salinity, temperature, pH, height in water column, microhabitat, interaction with other metals, etc. (Lobel *et al.* 1989). Of the biotic parameters, body size and/or weight, phenotypic differences, sex, physiological conditions and reproductive state are also very important. It is therefore more appropriate to evaluate bioavailability by direct measures of bioaccumulation of specific compounds in organisms. Such bioavailability studies have been conducted in several countries for sediment assessment (Catsiki *et al.* 1994), and relationships between bioavailability and bioaccumulation for sediment toxicity assessment have been developed by many authors (Campana *et al.* 2005, Otero *et al.* 2005, Ruus *et al.* 2005).

The summarized results showed a bioaccumulation of Zn in the organisms exposed to sediments from the Guadalquivir Estuary associated with the acute Aznalcóllar mining spill, and a bioaccumulation of Cu in individuals exposed to sediments from the Huelva Ria related to a chronic spill of acidic waters. The bioaccumulation of metals bound to sediments can be a useful tool to distinguish the contribution of sediment as a



los individuos expuestos a sedimentos de la Ría de Huelva, asociada a un vertido crónico de aguas ácidas.

En este trabajo se demuestra como la bioacumulación de metales asociados a los sedimentos puede ser una herramienta útil para discriminar la contribución del sedimento como fuente de metales, de entre todos los factores que pueden afectar a la biodisponibilidad.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias a la financiación de los proyectos CTM2005-07282-CO3-01) y (CTM2005-07282-CO3-02) del Plan Nacional Español de Investigación, Innovación y Desarrollo (Ministerio de Ciencia y Tecnología).

## Referencias

- Amiard JC, Métayer C, Baud JP, Ribeyre F. 1991. Influence de divers facteurs écologiques su la bioaccumulation d'éléments métalliques (Cd, Cu, Pb, Zn) chez de jeunes palourdes (*Ruditapes philippinarum*) au cours du prégressissement en nourricerie. *Rev. Sci. Eau* 4: 441–452.
- Blasco J, Arias AM, Sáenz V. 1999. Heavy metals in organisms of the River Guadalquivir estuary: Possible incidence of the Aznalcóllar disaster. *Sci. Total Environ.* 242: 249–259.
- Cabrera F, Conde B, Flores V. 1992. Heavy metals in the surface sediments of the tidal river Tinto (SW Spain). *Fresenius Environ. Bull.* 1:400–405.
- Campana O, Rodríguez A, Blasco J. 2005. Bioavailability of heavy metals in the Guadalete River Estuary (SW Iberian Peninsula). *Cienc. Mar.* 31: 135–147.
- Catsiki VA, Bei F, Nicolaidou A. 1994. Size dependent metal concentrations in two marine gastropod species. *Neth. J. Aquat. Ecol.* 28(2):157–165.
- Chapman PM. 1997. Is bioaccumulation useful for predicting impacts? *Mar. Pollut. Bull.* 34: 282–283.
- DelValls TA, Chapman PM. 1998. Site-specific sediment quality values for the Gulf of Cádiz (Spain) and San Francisco Bay (USA), using the sediment quality triad and multivariate analysis. *Cienc. Mar.* 24: 313–336.
- Förstner U, Wittman GTW (eds.). 1979. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag, Berlin, 485 pp.
- Franke C, Studinger G, Berger G, Bohling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Johncke U. 1994. The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501–1514.
- Gómez-Parra A, Forja JM, DelValls TA, Sáenz I, Riba I. 2000. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir Estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 40(12): 1115–1123.
- Gutiérrez-Galindo EA, Villaescusa-Celaya JA, Arreola-Chimal A. (1999). Bioaccumulation of metals in mussels from four sites of the coastal region of Baja California. *Cienc. Mar.* 25: 557–578.
- Lobel PB, Belkhole SP, Jackson SE, Longrich HP. 1989. A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations in biological tissue using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis* as a model. *Mar. Biol.* 102: 513–518.

source of metals from the total factors that can affect the bioavailability.

## Acknowledgements

This research was partially supported by grants CTM2005-07282-CO3-01 and CTM2005-07282-CO3-02 funded by the Spanish National Plan for Scientific Research, Technological Development and Innovation (Ministry of Education and Science).

- Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Manage.* 19: 81–97.
- Marín-Guirao L, César A, Marín A, Vita R. 2005. Assessment of sediment metal contamination in the Mar Menor coastal lagoon (SE Spain): Metal distribution, toxicity, bioaccumulation and benthic community structure. *Cienc. Mar.* 31: 413–428.
- Martín-Díaz ML, Villena-Lincoln A, Bamber S, Blasco J, DelValls TA. 2004. An integrated approach of biomarkers responses using *Carcinus maenas*: Simulation of the Aznalcóllar mining spill. *Chemosphere* 58: 615–626.
- Martín-Díaz ML, Blasco J, González de Canales ML, Sales D, DelValls TA. 2005. Bioaccumulation and toxicokinetic of dissolved metals from the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill using *Ruditapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48: 233–241.
- Otero XL, Vidal-Torrado P, Calvo de Anta MR, Macías F. 2005. Trace elements in biodeposits and sediments from mussel culture in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Environ. Pollut.* 136: 119–134.
- Riba I, DelValls TA, Forja JM, Gómez-Parra A. 2002. Influence of the Aznalcóllar mining spill on the vertical distribution of heavy metals in sediments from the Guadalquivir Estuary (SW Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 44: 39–47.
- Riba I, Blasco J, Jiménez-Tenorio N, DelValls TA. 2005. Heavy metal bioavailability and effects. I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW Spain). *Chemosphere* 58: 659–669.
- Rodríguez de la Rúa A, Arellano JM, González de Canales ML, Blasco J, Sarasquete C. 2005. Accumulation of copper and histopathological alterations in the oyster *Crassostrea angulata*. *Cienc. Mar.* 31: 455–466.
- Ruus A, Schaanning M, Øxnevad S, Hylland K. 2005. Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquat. Toxicol.* 72(3): 273–292.
- Suter GW II. 1993. *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 538 pp.
- Van Gestel CAM, Van Brummelen TC. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for the redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217–225.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.

*Recibido en abril de 2005;  
aceptado en marzo de 2006.*