

# INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS SOBRE EL ERIZO COMÚN (*PARACENTROTUS LIVIDUS*)

José Miguel Ramos Durán / Orlando Garzón Gómez  
Pablo Camacho Pozo / Ignacio Merlán Llorente

## RESUMEN

Los vertidos de hidrocarburos en la Bahía tienen un efecto sobre los organismos que la pueblan, especialmente en los sésiles. Aquí englobamos al erizo común. Se estudia la reacción ante diferentes hidrocarburos y a distintas concentraciones, tanto en su fecundación y desarrollo embrionario, como en la respuesta del sistema inmune.

## INTRODUCCIÓN

El trabajo pretende valorar la incidencia de los vertidos de diferentes derivados del petróleo sobre el desarrollo embrionario del erizo común (*Paracentrotus lividus*).

El erizo común, nos parecía un buen bioindicador para medir cómo pueden afectar diferentes compuestos y concentraciones al desarrollo embrionario en sus primeros estadios.

De igual modo, se pretende valorar la incidencia de los hidrocarburos sobre el sistema inmunitario del erizo común (*Paracentrotus lividus*). La respuesta del sistema inmunitario a los contaminantes se midió a través de la hemolinfa de los erizos en las tres pruebas realizadas en nuestro trabajo: medición de los radicales de nitrógeno, quimioluminiscencia y viabilidad; todo ello en condiciones *in vitro*.

La medición de la concentración de los radicales de nitrógeno se realiza porque es uno de los sistemas de defensa del erizo. Son productos tóxicos y los utiliza para eliminar el patógeno.

La prueba de quimioluminiscencia se realiza debido a que la estimulación de los fagocitos de la hemolinfa produce un aumento del consumo de oxígeno (Adema *et al* 1991, Anderson 1996A). El estallido respiratorio provoca la emisión de fotones, que son medidos por el Flouroskan.

Por último la viabilidad mide la cantidad de células que sobreviven al tratamiento. El rojo neutro se adhiere a la membrana celular de las células vivas: la intensidad del rojo determina, por tanto, las células supervivientes.

Se pretende determinar como influyen diferentes compuestos en distintas concentraciones *in vitro* y a semejanza de como se puede dar en el medio marino después de un vertido, en el sistema inmunitario del erizo común.

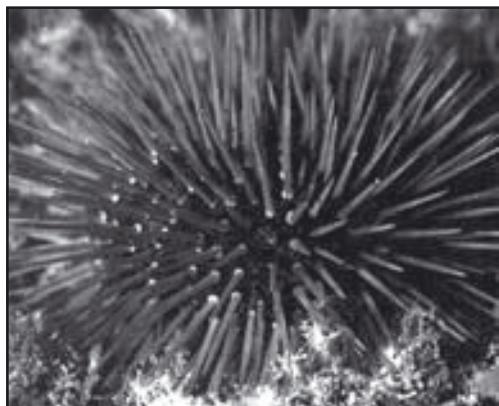


Figura 1. Erizo común (*Paracentrotus lividus*)

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Desarrollo embrionario

#### • Características del Erizo común (*Paracentrotus lividus*) y otros erizos presentes en el litoral de Algeciras

El erizo común, el más abundante en la zona, se caracteriza por su aspecto globoso, cuyo caparazón está recubierto de espinas que le protegen y le permiten desplazarse por el fondo marino. Se localiza en la costa a una profundidad entre 0 y 80m. Como todo equinodermo, tiene capacidad de regeneración. Se halla en todo tipo de colores salvo en negro. Se encuentra sobre arena y sobre roca. Se recubre de conchas, piedras y algas como defensa y para evitar la luz intensa. Además perfora las rocas.

#### • Método de extracción de los gametos

Se toma un erizo común del acuario y se depositó en un recipiente que posee agua de mar (pasterizada) que lo cubría completamente. Aquí fue sometido a la estimulación y liberación de gametos. Se estimuló la secreción de gametos aplicando una corriente eléctrica de 30 V y 50 mA mediante un transformador durante 12 s. En cuanto comienza la secreción, se tomó con una pipeta de 1 ml y se depositó en un tubo de ensayo. El erizo de mar pasó a un segundo acuario. Todas las muestras de gametos masculinos fueron posteriormente pasadas a un tubo de ensayo mayor. Igualmente las de óvulos. Conseguimos por tanto un homogenizado de las muestras.

#### • Preparación de las soluciones base para el desarrollo embrionario. Preparación de las soluciones de cultivo.

Se tomó 0,1 ml de cada compuesto y se vertió en 100 ml de agua de mar previamente pasterizada a 70°C; de esta concentración (una vez bien agitada) se tomaron tres muestras de 0,1 ml y se vertieron en 10 ml de agua de mar (concentración 1/100.000), en 50 ml (concentración 1/500.000) y en 100 ml (concentración 1/1.000.000). Posteriormente, de cada solución se prepararon 20 preparaciones en los respectivos tubos de ensayo, en los que se depositaron soluciones que portaban espermatozoides y óvulos. Por tanto los óvulos se fecundaban en las soluciones preparadas.

Al cabo de 72h, se comenzó a tomar muestras de cada tubo de ensayo (dos por tubo) en una cantidad de 1ml y se observaban a microscopio, contabilizándose la presencia de mórulas y el número de células que aparecían. Se realizaron un total de 120 observaciones a microscopía, que correspondían a 10 observaciones por cada compuesto orgánico y concentración. La visualización se realizó de modo ordinario a 100 aumentos.

Los datos observados fueron procesados en los siguientes programas informáticos: Microsoft Excel 2000, Sigmaplot 2001, Minitab 13.

### Sistema inmunitario

Para su posterior utilización en las pruebas, se realizó una extracción de hemolinfa, en la zona carnosa que se encuentra alrededor de la boca.

Se obtuvieron lentamente 10 ml de hemolinfa que depositábamos en tubos de ensayo colocados en una caja con hielo para conservar las células. Los erizos a los que se extrajo la hemolinfa, no habían sido expuestos a ningún contaminante, ya que

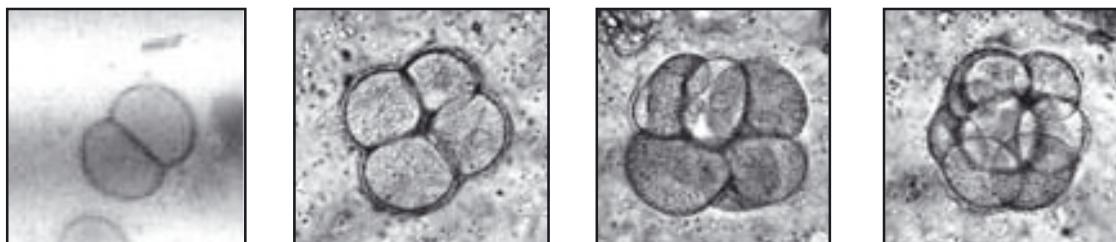


Figura 2. Mórulas de 2, 4, 8 y 12 células respectivamente.

los hidrocarburos (gasóleo y aceite base) se les añadirían en los pocillos con las siguientes concentraciones [directa (únicamente contaminante), a 1:2, 1:100, 1:1.000, 1:1.000.000 y la muestra control] y en los dos diluyentes utilizados DMSO y FSW. El DMSO facilita la dispersión de las sustancias orgánicas, en este caso los hidrocarburos, con la hemolinfa.

Con cada *pool* se realizaron las siguientes pruebas, haciéndose las mediciones a las 2 y a las 24 horas.

- **Medición de la producción de radicales de nitrógeno.**

La producción de los radicales de nitrógeno es un método de defensa utilizado por el erizo para eliminar sustancias nocivas para su desarrollo. El NO es una sustancia tóxica tanto para los agentes nocivos que atacan el sistema inmunitario del erizo, como para el propio erizo, es decir, esta respuesta por parte del erizo si no logra anular el agente nocivo le puede llevar a la autodestrucción.

Se cuantifica la concentración de nitrito utilizando la reacción de Griess, cuyo protocolo seguido por nosotros es el siguiente:

- Se toman 100 ml/ pocillo de hemolinfa.
- Se toma un control de 100 ml de FSW (agua de mar) en tres pocillos por cada *pool*.
- Se espera 30' a 15°C (para que precipiten los hemocitos).
- Se añaden 100 ml/ pocillo de Zymosan 100 mg/ml (así la concentración de Zymosan final en el pocillo será de 50 mg/ml)
- Cada pocillo tendrá de 50 mg/ml.
- Se incuban 2 h a 15°C.
- Se transfieren 50 ml de cada pocillo a otra placa.
- Se añaden 100 ml de Reactivo A y 100 ml de Reactivo B, se deja 5' a 15°C y se lee la absorbancia a 540 nm.
- Finalmente se mide en el espectrofotómetro (Labsystem iems Reader MF/ Type 1410/ Serie 14100-137)

Se estima la concentración de nitrito presente en los sobrenadantes comparando la absorbancia a la de concentraciones conocidas de  $\text{NaNO}_2$  (1, 5, 10,25, 50 Y 100 mM). Para comprobar que el patrón utilizado funciona correctamente añadimos en una placa 50 ml de  $\text{NaNO}_2$  y a continuación 100 ml de los reactivos A y B.

Reactivo A: 1% sulfanilamide en 2.5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . (50 ml)

$\text{H}_3\text{PO}_4$ Stock (85.3%)	1.465 ml
$\text{H}_2\text{O}$	48.5 ml
Sulfanilamida	0.5 gr

Tabla 1. Composición del reactivo A.

Reactivo B (Fotosensible): 0.1% N-naphthyl-ethylenediamine en 2.5% de H3PO4 (50 ml)

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> Stock (85.3%)	1.465 ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	48.5 ml
N-naphthyl.	0.05 gr

Tabla 2. Composición del reactivo B.

La medición se realizó con un espectrofotómetro Labsystems iEms Reader MF/ Type 1410 serie 140100\_137.

El programa informático utilizado para interpretar los datos fue el Ascent software for EMS Reader MF y para el tratamiento estadístico utilizamos Microsoft Excel. Por último se realizó la misma prueba a las 48h de la exposición al tratamiento.

#### • Quimioluminiscencia

Los fagocitos del sistema inmunitario del erizo común al ser estimulados por algún agente nocivo o extraño, aumentan su consumo de oxígeno, lo que provoca un estallido respiratorio, generando una emisión de fotones. La medición de la energía lumínica nos determina la mayor o menor presencia de agentes nocivos.

Este ensayo se hace en una placa de 96 pocillos. El protocolo a seguir es el siguiente:

Añadir 100 ml de hemolinfa/ pocillo.

Esperar 30 minutos a que precipiten los hemocitos (a 15°C).

Mientras, preparamos la solución de luminol con el estímulo:

- Stock luminol: 0,018 g luminol en 1 ml DMSO. Envolver en papel de plata, y preparar siempre en el momento (no guardar).
- Solución de trabajo de luminol: 15 ml stock luminol en .5 ml FSW. Envolver también en papel de plata.
- Para el estímulo estándar (Zimosán 1 mg/ ml, concentración final en el poc.): 500 ml stock Zimosán en FSW (20 mg/ ml) en 4,5 ml de solución de trabajo de luminol. Mantener asimismo en oscuridad.

Añadir 100 ml/ pocillo de la solución de trabajo de luminol con Zymosán, e inmediatamente medir luminiscencia (cuatro medidas consecutivas cada 10 min):

Medida con el Flouroskan Ascent FL Type 374, Serie 374022533-C que realiza medidas cada cinco minutos durante 35 minutos.

Este tratamiento se midió a la 24 y 48 horas de la exposición.

#### • Viabilidad de hemocitos con rojo neutro.

La viabilidad mide la cantidad de células que sobreviven al tratamiento. El rojo neutro se adhiere a la pared de la membrana celular de las células vivas y se mide la intensidad del rojo que determina la cantidad de células vivas. Cuanto mayor es la intensidad mayor es la cantidad de células vivas.

- Se añade 100 ml hemolinfa/ pocillo en una placa 96, por triplicado.
- Esperar 30' a 15°C (tiempo de adhesión de los hemocitos al fondo del pocillo).
- Añadir 100 ml de rojo neutro working solution.
- Incubar una hora en oscuridad a 15°C.
- Eliminar el sobrenadante por volcado.



Figura 3. Recuento de células mediante microscopio.

- Lavar con 100 ul de FSW y eliminar de nuevo por volcado.
- Añadir 100 ul de solución de lisis de los hemocitos.
- Incubar 10 minutos en agitación, en el propio Multiscan, y medir a continuación ABS a 540. Para ello, hay que tener el aparato conectado al PC (es el software que permite agitar mejor), y programar la agitación de 10 minutos a 1.020 rpm (vienen esas rpm por defecto) y luego inmediatamente la medida de ABS a 540nm . La concentración de hemocitos será muy baja si la absorbancia es menor de 0,2.

Soluciones utilizadas:

- Stock de rojo neutro 0,4%: 20 mg (0,02 g) de rojo neutro + 5 ml FSW. Guardar en oscuridad a RT.
- Rojo neutro Working solution: calcular su concentración para que la [rojo neutro] final en el pocillo sea de 0,004%. En este caso (100 ul de hemolinfa + 100 ul de *Working solution*), necesitamos que la *Working solution* sea al 0,008% de rojo neutro (hacer una dilución 1:50 del stock en FSW).
- Solución de lisis de los hemocitos: 50% etanol- 1% ácido acético, en dH<sub>2</sub>O.

Las mediciones se obtuvieron con el espectrofotómetro anteriormente mencionado.

#### • Recuento de células

Realizamos un recuento de células, distinguiendo las vivas de las muertas para los erizos que se habían expuesto a contaminantes durante 48 horas.

Para ello utilizamos estéreomicroscopios ópticos inversos, y colocamos hemolinfa en portas con rejillas. Para realizar las mediciones dividimos las rejillas en cuatro zonas, turnándonos para realizar la estimación del número de células vivas y muertas, después realizamos la media para verificar los datos de viabilidad obtenidos anteriormente.

Las mediciones se realizaron a las 2 y a las 24 horas.

## RESULTADOS

### Desarrollo embrionario

#### • Influencia de la contaminación en el desarrollo embrionario

En el diagrama de barras se representa el promedio de embriones encontrados por ml de cada compuesto. Si describimos la variación del número de embriones según la concentración, se aprecia de mayor a menor variación, el siguiente orden: crudo, aceite base, gasoil y fueloil. Es en este último donde el número de embriones sufre ligeras variaciones de 1,E-06 a 2,E-06. En el crudo si ve afectado el número de embriones al pasar de una concentración a otra. El crecimiento a 1,E-05 se da de un modo claro sólo en gasoil, por tanto, el compuesto con un impacto negativo menor a esa concentración.

A continuación se muestran los resultados obtenidos por cada compuesto y según la concentración, el número de embriones encontrados y su estado de desarrollo.

El descenso gradual del número de mórulas según el número de células que lo componen parece normal. Tanto a concentración 1,E-06 como 2,E-06 se observan ejemplares menos y más desarrollados. Conforme aumenta el número de células en las mórulas, éstas se presentan en menor número. A concentración 1,E-05 sólo se observan y de modo no significativo mórulas de dos células. Dado el valor tan mínimo, consideramos que el dato puede ser debido a la contaminación.

El descenso gradual del número de mórulas según el número de células que lo componen parece normal. A concentración 1,E-06 se observa una disminución gradual del número de mórulas. A 2,E-06 se observa esa gradualidad con la diferencia de apreciarse unos resultados similares de mórulas desarrolladas. A concentración 1,E-05 se observa un crecimiento aleatorio que determina unas condiciones estresantes, pero que al aparecer mórulas desarrolladas, nos da una razón de una capacidad de desarrollo, aunque mínima. Aquí desechamos darle un valor nulo.

La observación de mórulas con 3 y 6 células puede considerarse anómala. Hemos querido reflejar estos datos a pesar de saber que lo lógico es considerarlas de 4 y 8 células respectivamente. Esta observación puede deberse, bien a no apreciar con nitidez otras células integrantes, bien porque en el proceso mitótico en el que están inmersas, se haya visto bloqueado en alguna fase de su desarrollo.

La gradualidad del número de mórulas comentada en anteriores casos se manifestaría si englobáramos en 4 las de 3 y 4, y en 8 las de 6 y 8.

Es destacable el crecimiento tan alto de mórulas a 1,E-06. Sin embargo el crecimiento a 2,E-06 es bajo con respecto a la anterior y es nulo a 1,E-05. A este valor esta claro que la inhibición es total en cuanto al desarrollo.

Aplicando los comentarios sobre el número de células presentes en las mórulas que observamos en la gráfica anterior, se aprecia una gradualidad en el desarrollo, a excepción de las mórulas con 12 células donde existe un importante crecimiento, tanto a 1,E-06 como especialmente a 2,E-06, donde su presencia es mayor que en 4 y 8 células.

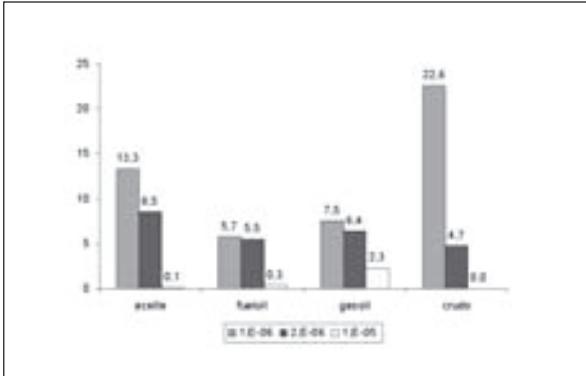


Figura 4. Crecimiento embrionario por compuesto orgánico y concentración. N=10 para cada concentración

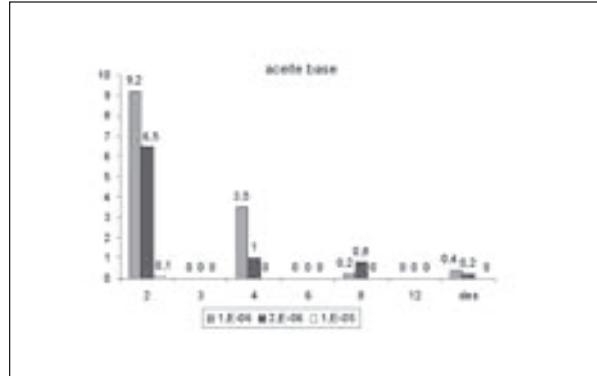


Figura 5. Promedio de mórulas para cada concentración. Los números en el eje de abscisas corresponden al número de células que componen cada mórula.

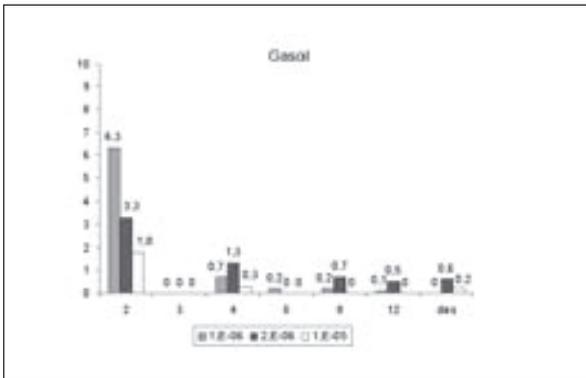


Figura 6. Promedio de mórulas para cada concentración. Los números en el eje de abscisas corresponden al número de células que componen cada mórula.

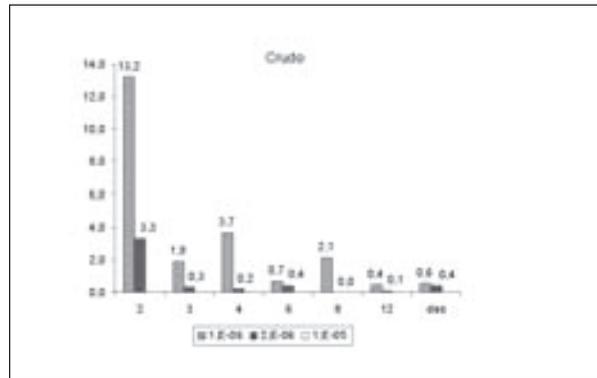


Figura 7. Promedio de mórulas para cada concentración. Los números en el eje de abscisas corresponden al número de células que componen cada mórula.

Sin embargo, la tasa de crecimiento es baja, si la comparamos con otros compuestos analizados. A concentración de 1,E-05 se aprecian mórulas de 2 células de modo reducido. Ya que no se observan de otros tamaños, podemos considerar esta concentración como limitante y por tanto darle el valor nulo a la presencia de mórulas.

El crudo inhibe totalmente el crecimiento en la concentración 1,E-05, es decir, es nulo. Como se aprecia en la curva tendencia, también a concentraciones inferiores se inhibe el crecimiento. En la concentración 2,E-06 la inhibe, pero no tan radicalmente como en la anterior y en 1,E-06 la inhibición del crecimiento es casi nula. En los demás compuestos la inhibición que se produce mantiene una mayor constancia frente al crudo, ya que su curva polinómica tiene una pendiente muy pronunciada. La curva del aceite base se puede considerar de transición entre el crudo y las demás, aceite base y gasoil poseen unos valores similares a 1,E-06 y 2,E-06, variando significativamente los resultados a 1,E-05. Sólo el gasoil presenta una tasa de crecimiento a una alta concentración, siendo las demás prácticamente cero.

Esta gráfica nos muestra la similitud de los efectos de los compuestos estudiados en sus diferentes concentraciones. El grupo que muestra mayor similitud está formado por crudo, aceite base, y fuel oil; todos a una concentración 1/ 100.000. En ellos el crecimiento es nulo. A excepción del gasoil, en todos los demás compuestos, la concentración 1,E-05 inhibe el crecimiento.

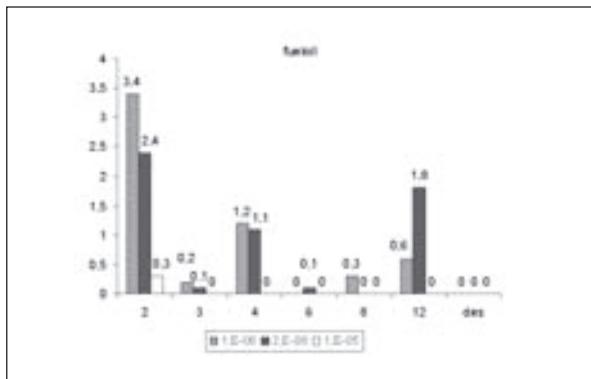


Figura 8. Promedio de mórulas para cada concentración. Los números en el eje de abscisas corresponden al número de células que componen cada mórula.

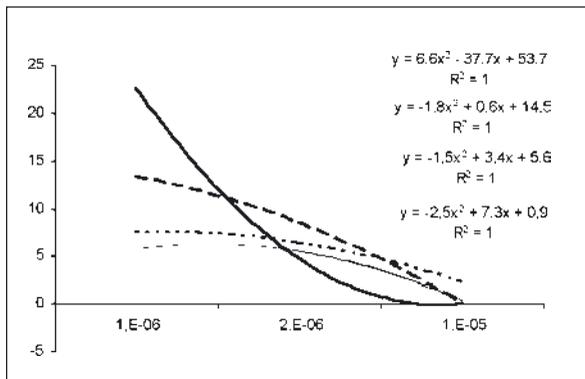


Figura 9. Curvas tendencia de distribución para cada compuesto. Número de mórulas / ml. Relacionando la tasa de crecimiento embrionaria con la concentración. Se exponen las funciones polinómicas y el coeficiente de Pearson. **Trazo continuo:** crudo; **Trazo discontinuo (rayas):** aceite base; **Trazo discontinuo (puntos):** gasoil; **Trazo gris:** fueloil.

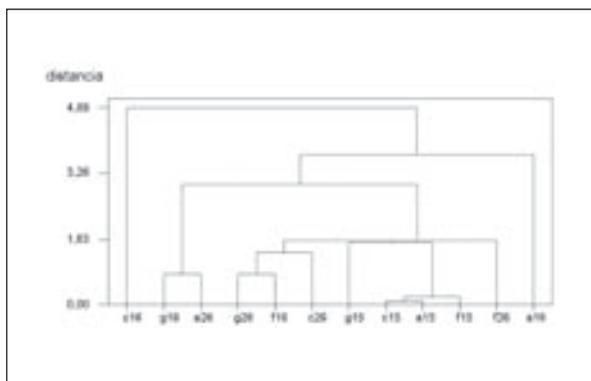


Figura 10. Análisis de clúster, método simple. Diferente comportamiento del desarrollo embrionario según compuesto y concentración. "c": crudo; "g": gasoil; "a": aceite base; "f": fueloil; "15": 1,E-05; "26": 2,E-06; "16":1,E-06.

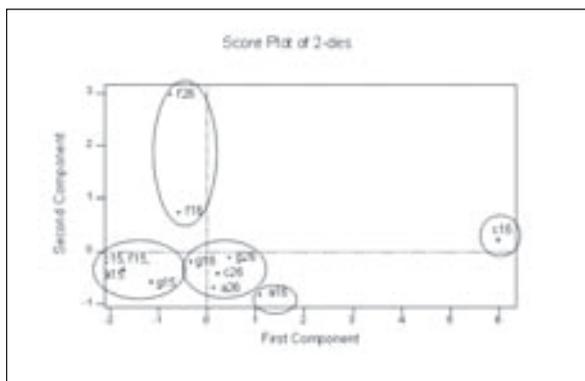


Figura 11. Análisis de los componentes principales. Asociándolos por su proximidad en cuanto a la distribución de número de morulas de cada tipo. "c": crudo; "g": gasoil; "a": aceite base; "f": fueloil; "15": 1,E-05; "26": 2,E-06; "16":1,E-06.

El siguiente grupo con valores que poseen similitud sería el formado por el gasoil 1/100.000, el crudo 1/500.000, el gasoil 1/500.000, el fuel oil 1/1.000.000 y por último, a más distancia, el fuel oil 1/500.000. De esta segunda asociación podemos destacar la similitud de valores obtenidos en torno a la concentración 2,E-06, tanto en gasoil, crudo como fueloil. Observar el pobre desarrollo embrionario a la baja concentración de fueloil.

El siguiente grupo es el formado por el gasoil 1/1.000.000 y el aceite base 1/500.000.

Los dos compuestos más alejados son aceite base 1/1.000.000 y el crudo 1/1.000.000. Por tanto, el mayor desarrollo a bajas concentraciones se da en el siguiente orden: crudo, aceite base, gasoil, fueloil.

F26 y f16 presentan una uniformidad tanto en sus valores globales como en su distribución por el número de células presentes. c16 presenta la mayor el mayor número de mórulas. A16 sería el segundo valor en importancia. g16, g26, c26 y a26 presentarían unos valores intermedios con respecto a la mayor tasa de crecimiento y la menor tasa, constituida por c15, f15, a15 y g15.

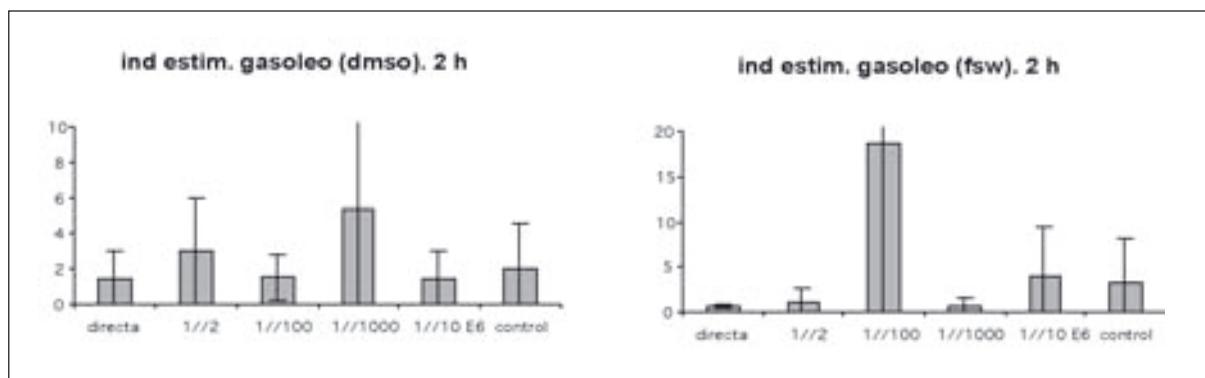


Figura 12. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72.

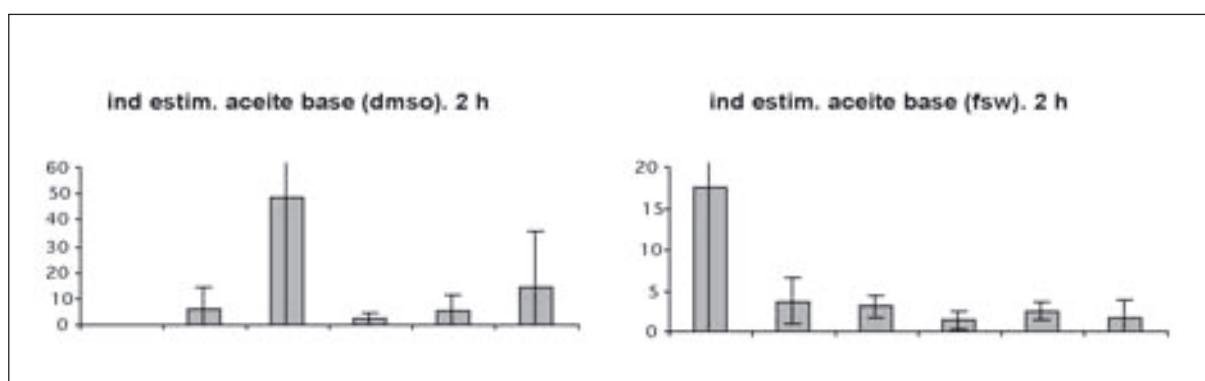


Figura 13. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72.

## Sistema inmunitario

### 1. A las 2 horas

#### 1.1. Concentración de radicales de nitrógeno

Se observa que en el índice de estimulación del gasóleo a dos horas en DMSO, es mayor a la concentración 1/1000. El índice de estimulación en FSW es mayor a la concentración 1/100, siendo las demás muy inferiores a ésta.

El índice de estimulación del aceite base en DMSO a las dos horas, es mayor en la concentración 1/100. En FSW (agua de mar) es mayor en la concentración directa.

Se aprecia como el Zym genera una respuesta mayor en todos los casos. Con el control, la mayor respuesta se da a la concentración 1/10 E6. La presencia de DMSO permite una mejor disolución de los hidrocarburos y por tanto una mayor reacción del sistema inmune.

#### 1.2. Quimioluminiscencia/Viabilidad

Mayor concentración en el control de aceite base con agua de mar (FSW). Mayor concentración a 1/2 en aceite base con DMSO.

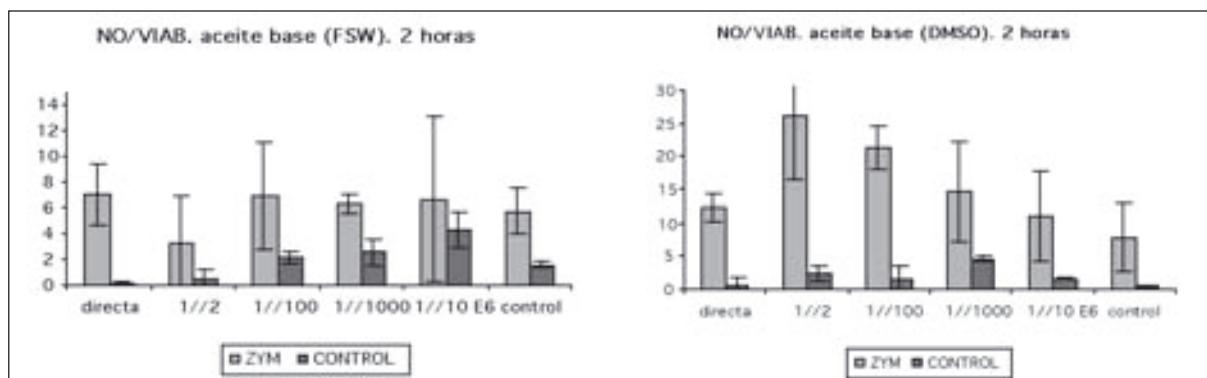


Figura 14. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72 en comparación entre Zym y control (FSW).

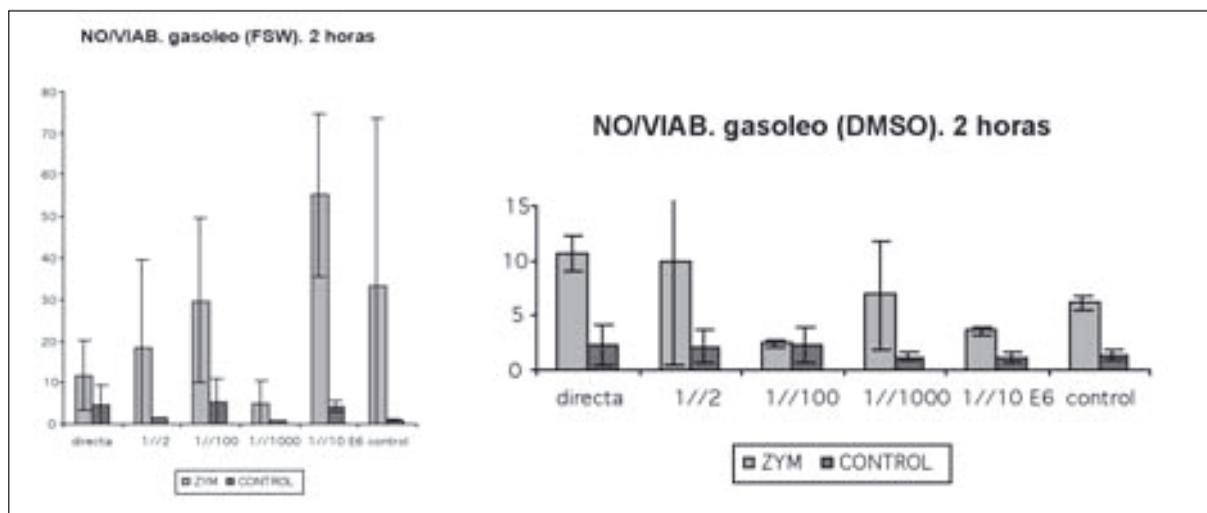


Figura 15. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72 en comparación entre Zym y control (FSW) en su caso y Zym/control (DMSO) en otro caso.

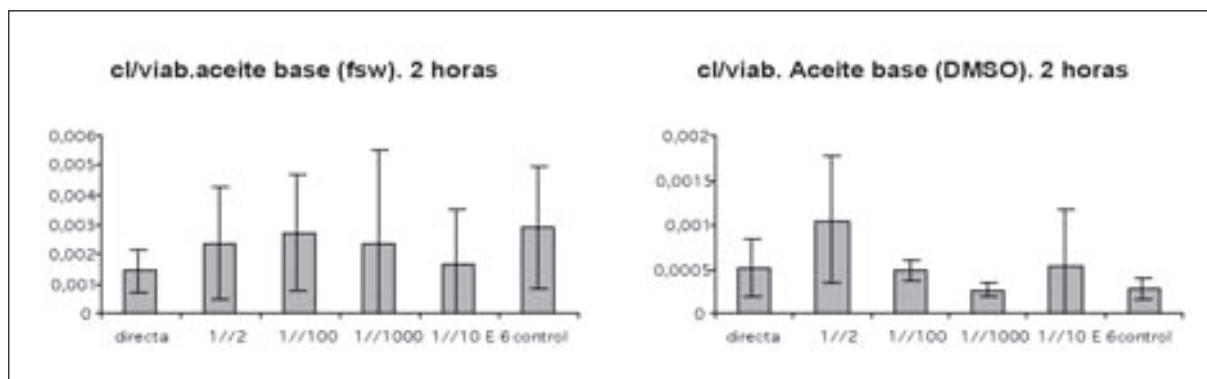


Figura 16. Eje Y: valores obtenidos en la medición [CI/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72.

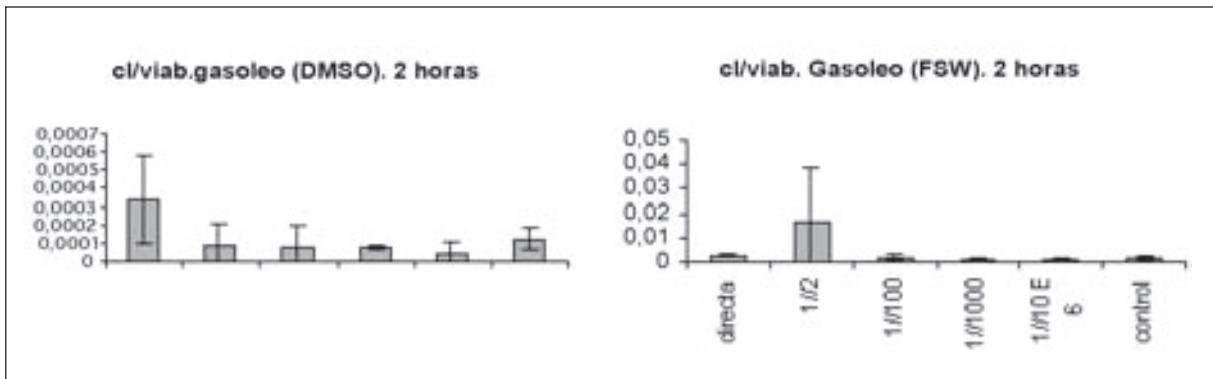


Figura 17. Eje Y: valores obtenidos en la medición [CI/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72.

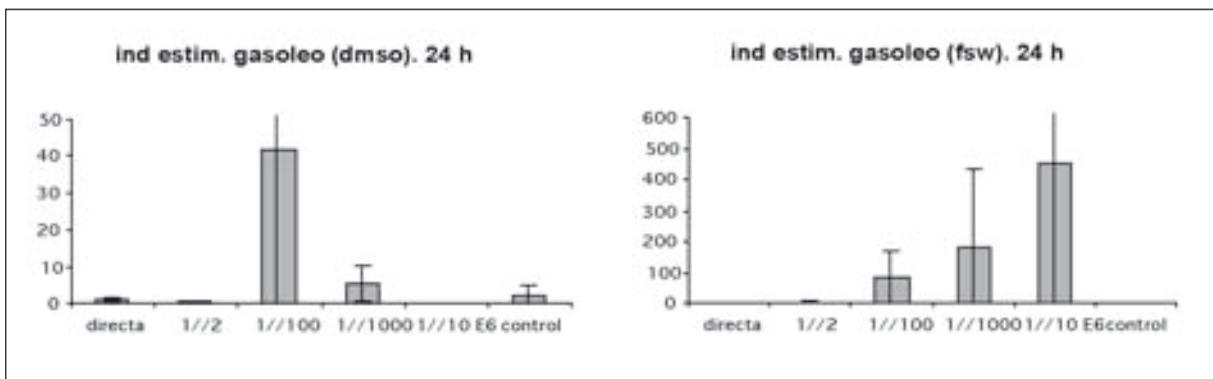


Figura 18. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72. DMSO y FSW.

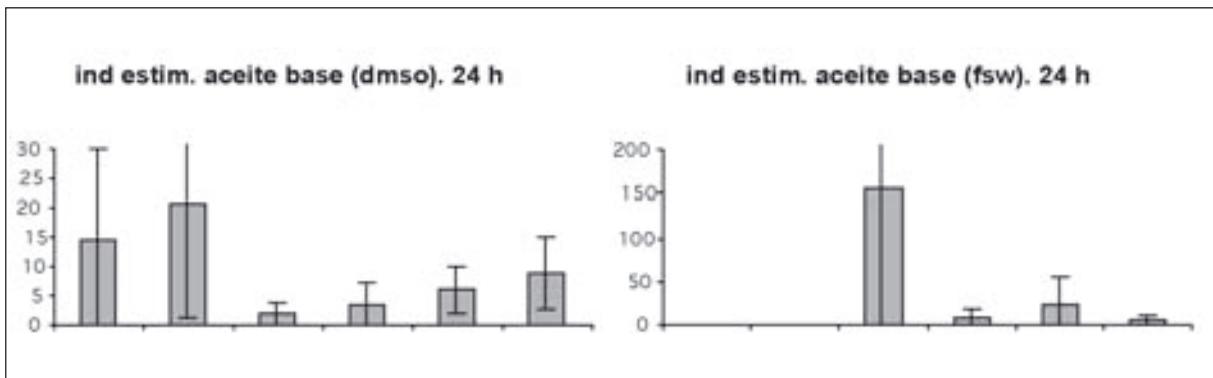


Figura 19. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72. DMSO y FSW.

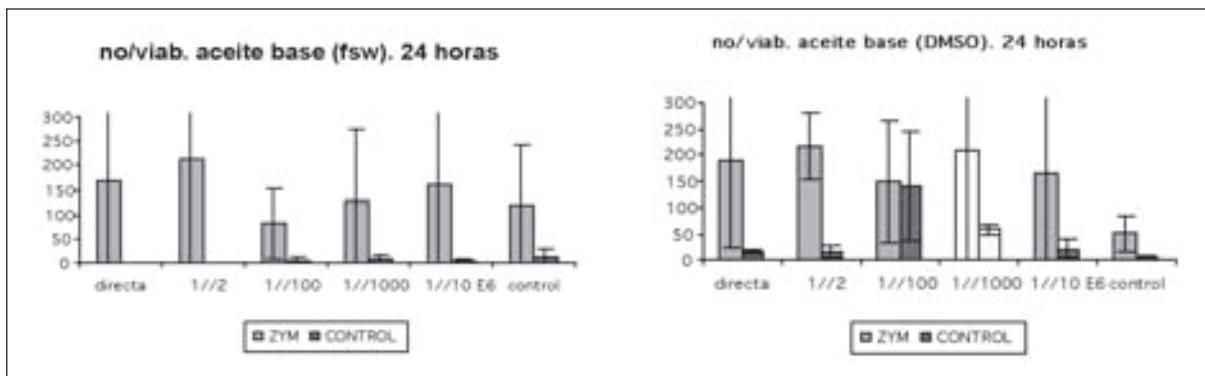


Figura 20. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72. DMSO y FSW.

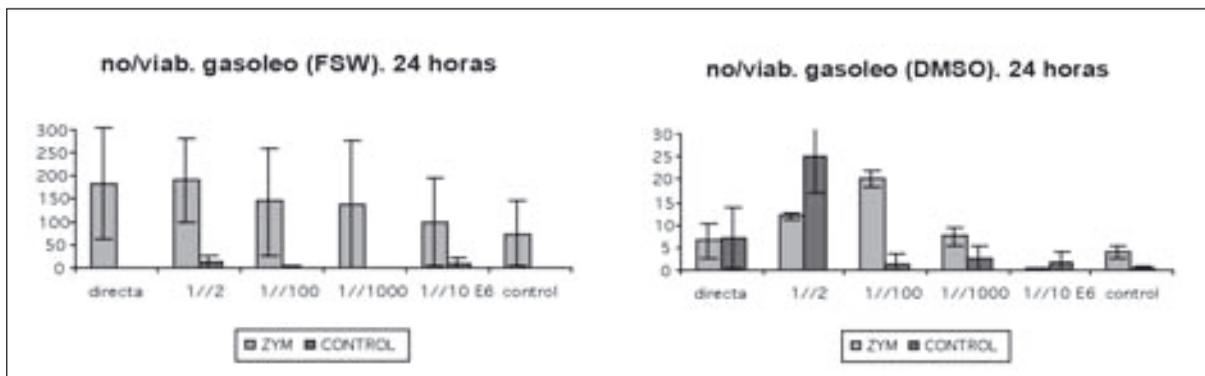


Figura 21. Eje Y: valores obtenidos en la medición [NO/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72 en comparación entre Zym/control (FSW) y Zym/control (DMSO).

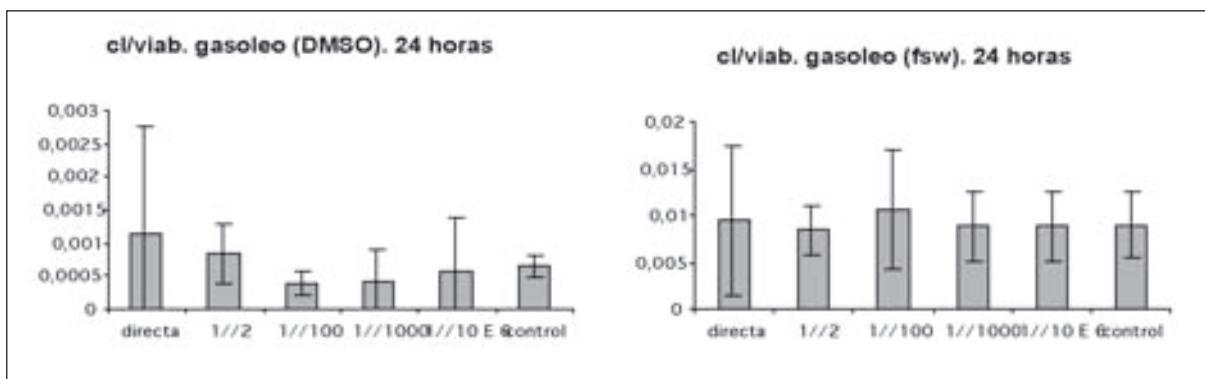


Figura 22. Eje Y: valores obtenidos en la medición [CI/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72.

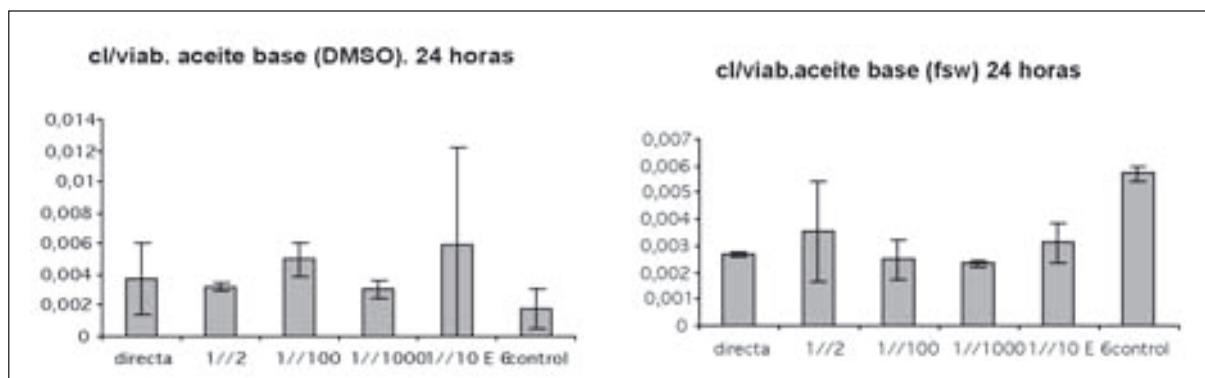


Figura 23. Eje Y: valores obtenidos en la medición [Cl/viab]. Eje X: distintas concentraciones del compuesto para n = 72.

La mayor concentración: 1/2 con gasóleo en agua de mar (FSW). Mayor concentración: 1/2 con gasóleo en DMSO a las dos horas.

## 2. A las 24 horas.

### 2.1. Concentración de radicales de nitrógeno.

Se observa que en el índice de estimulación del gasóleo a 24 horas en DMSO, es mayor a la concentración 1/100. En el gasóleo a 24 horas en FSW (agua de mar) es mayor a la concentración 1/10 E6.

Se observa que en el índice de estimulación del aceite base a 24 horas en DMSO, es mayor a la concentración 1/2. mientras que en FSW (agua de mar), se aprecia un mayor valor en la concentración 1/100.

En la concentración 1/1.000 los datos no son fiables debido a un error humano.

### 2.2. Quimioluminiscencia/Viabilidad

Mayor concentración: directa con gasóleo en DMSO a las 24 horas. Mayor concentración: 1/100 con gasóleo en FSW (agua de mar) a las 24 horas.

Mayor concentración: 1/10 E6 con aceite base en DMSO a las 24 horas. Mayor concentración : control con aceite base en FSW (agua de mar) a las 24 horas.

## DISCUSIONES

El compuesto contaminante estudiado con mayor densidad y adherencia es el fueloil, sin embargo, es el compuesto que menos se dispersa en el medio, mientras que los más dispersantes son el aceite base y el gasoil. Existe una relación entre el aceite base y el gasoil, ya que los valores de densidad, adherencia y dispersión son semejantes.

Desde el punto de vista físico, los compuestos con mayor densidad y adherencia tendrán una dispersión menor y por tanto su capacidad de contaminación se verá reducida en el espacio. Por tanto, el fueloil y el crudo serían los compuestos que contaminarían más en las zonas donde son vertidos y el gasoil y aceite base, contaminarían en menor intensidad, pero en mayor extensión por su capacidad de dispersión. Al expandirse sobre mayor superficie, su incidencia sobre los organismos

será mayor, especialmente sobre los sésiles o los que vivan en el fondo con una capacidad de desplazamiento limitada, como es el caso de los erizos de mar.

Desde la no tan hipotética situación de un vertido en la bahía de Algeciras, debido al intenso tráfico marítimo, podemos señalar las repercusiones que para las zonas supralitoral, mesolitoral e infralitoral tendría.

Por su adherencia, especialmente el fueloil y secundariamente el crudo, tendrían un impacto negativo sobre las zonas supralitoral y mesolitoral. Los ecosistemas que ocupan la franja mesolitoral serían destruidos y conforme nos introducimos mar adentro, quedarían seriamente afectados si la concentración es inferior a  $1, E-06$ . La zona infralitoral se vería seriamente afectada en el lugar del vertido, dadas las características de estos fluidos. En el caso del fueloil, la tolerancia es menor y tendría efectos más negativos que el crudo a igual concentración.

En los casos de gasoil y aceite base, tendrían un efecto más amplio en la zona, puesto que su capacidad de dispersión es mayor a los citados anteriormente. Dada una adherencia menor a los anteriores, su efecto sobre la zona supralitoral y mesolitoral sería menos permanente, aunque su presencia en el medio determinaría a concentraciones altas una tolerancia cero. Conviene matizar que el gasoil es el compuesto que permite un crecimiento a  $1, E-05$  y por tanto unido a las características mencionadas, podría resultar el menos dañino para el medio.

En cuanto al desarrollo embrionario se ha observado que el crudo, posee la distribución más irregular de valores obtenidos para cada una de las concentraciones tratadas. Presenta la mayor tasa de crecimiento embrionario en  $1, E-06$  con 22,6 mórulas por mililitro, la menor tasa de crecimiento a  $2, E-06$  con 4,7 mórulas por mililitro y en la concentración  $1, E-05$  una tasa cero. En este compuesto las concentraciones tratadas responden a los valores donde su incidencia es letal para el crecimiento ( $1, E-05$ ) y cercana a la inhibición la tasa de  $2, E-06$ . Por tanto, a altas concentraciones la inhibición es total y a bajas concentraciones la inhibición es nula.

El fueloil presenta una tasa de crecimiento similar a las concentraciones  $1, E-06$  y  $2, E-06$ . Ambos valores representan un 25% aproximado del valor medido en el crudo a  $1, E-06$ , muy por debajo del desarrollo posible. A concentraciones menores se debe dar un mayor crecimiento embrionario. A  $1, E-05$  la tasa embrionaria es nula y por tanto idéntico valor que en el crudo.

El aceite base presenta la segunda mayor tasa de mórulas a  $1, E-06$  y la mayor tasa a  $2, E-06$ . Considerando los tres tipos de soluciones que han sido estudiadas, el aceite base presenta la mejor proporcionalidad de crecimiento. Se observa una inhibición proporcional en la medida que aumenta la concentración, hasta llegar al crecimiento cero, que es el considerado a concentración  $1, E-05$ .

El gasoil es el único compuesto de los analizados que presenta un crecimiento de mórulas a  $1, E-05$ . Por tanto es el menos contaminante de todos, si bien es cierto que, los valores de aparición de mórulas en gasoil en las concentraciones  $1, E-06$  y  $2, E-06$  serían los terceros en importancia. La concentración limitante de mórulas se halla por debajo de  $1, E-05$ . Los valores de crecimiento son proporcionales: a menos concentración de gasoil, mayor número de mórulas.

Por las propiedades físicas, se encuentra una similitud entre el aceite base y el gasoil, sin embargo, las pruebas biológicas manifiestan claras diferencias en cuanto a la tolerancia al gasoil por parte de las mórulas generadas.

Atendiendo al contenido en azufre de cada uno de los compuestos señalados, se aprecia que es más alto en fueloil, en segundo lugar en aceite base y en tercer lugar en el crudo. Se puede establecer una concordancia entre estos valores y los resultados obtenidos en los tres compuestos, donde, a concentración  $1, E-05$ , no se aprecia crecimiento. El gasoil manifiesta crecimiento a esa concentración y es, de los cuatro compuestos tratados, el que menos proporción de azufre presenta, por tanto, se puede deducir que el azufre es uno de los elementos que inhibe el crecimiento de las mórulas.

Sobre el desarrollo del número de células en las mórulas, los resultados obtenidos muestran una relación que consideramos normal, puesto que el mayor número de mórulas corresponderá a las que posean menor número de células.

Dado que la fecundación de los óvulos se ha dado en las soluciones preparadas, quedaría por resolver si la inhibición se da en la fecundación, o si ésta se da en las sucesivas divisiones mitóticas del desarrollo embrionario. La presencia de mórulas con distinto número de células manifiesta que se da en el crecimiento.

Hemos profundizado en el conocimiento del sistema inmunológico básico del erizo, estudiando la diferente respuesta a los distintos agentes y concentraciones que actúan sobre los erizos.

Dadas las características de los hidrocarburos, compuestos hidrófobos, podía ser de interés comprobar la incidencia de estos compuestos sobre los erizos, bien en agua de mar libre (FSW) o bien en DMSO, medio que permite una mayor dispersión en la hemolinfa. Los compuestos utilizados han sido aceite base y gasoil para el estudio in vitro.

## - **Concentración de radicales de nitrógeno**

Se observa que en el índice de estimulación de aceite base en DMSO a dos horas y 24 horas existe una respuesta similar. Muestra una ascenso de directa a 1/2, luego se produce un descenso en concentraciones medias(1/1.000) para, a continuación, ascender con concentraciones bajas.

En 2 horas, se aprecia que el mayor índice de estimulación corresponde a la concentración 1/100, que se contrapone con el nivel observado en la misma concentración (1/100) en 24 horas.

En el índice de estimulación del aceite base en FSW a dos horas y 24 horas obtenemos que, a las dos horas existe una disminución de la estimulación conforme se disminuye la concentración (a altas concentraciones no se produce estímulo alguno; a 1/100 se produce un gran aumento que disminuye progresivamente en concentraciones más bajas), al contrario de la que sucede a las 24 horas(aumento progresivo al disminuir la concentración)

En el índice de estimulación del gasóleo en FSW a dos horas y 24 horas se aprecia que, a las 24 horas se produce un crecimiento progresivo a menor concentración siendo nulas las concentraciones directa y control . A las dos horas asciende hasta 1/100, baja en la concentración 1/1.000 y una ligera subida en las otras concentraciones.

En el índice de estimulación del gasóleo en DMSO a dos horas, se aprecia una estimulación similar en todas las concentraciones, aunque en 1/2 y 1/1.000 la estimulación es ligeramente superior. Respecto a 24 horas se observa una espectacular estimulación a 1/100 disminuyendo a 1 /1.000 y aumentando en el control.

En cuanto al NO/viabilidad observamos que tanto a las dos y las 24 horas el Zymosán alcanzan mayores valores que el control (DMSO y FSW). Las mayores diferencias se encuentran entre el Zymosán y el control(FSW) en el aceite base y el gasóleo a 24 horas, siendo el control muy inferior en estas gráficas.

## - **Quimioluminiscencia/viabilidad**

En gasóleo dos horas y 24 horas en DMSO se observa una distribución similar en la mayoría de los casos(decrecimiento hasta concentraciones medias y crecimiento a partir de concentraciones inferiores).

En el gasóleo en FSW a las dos horas, los valores obtenidos son muy pequeños, salvo un pico elevado en la concentración a 1/2, mientras que en 24 horas los valores son mucho más elevados y se mantienen constantes.

En el aceite base en DMSO a dos horas y 24 horas, se pueden observar que los resultados que obtenemos son inversos (cuando en 2 horas se produce un aumento, en 24 horas se produce una descenso)

En aceite base en FSW a dos horas y 24 horas, se observa un ritmo casi idéntico en la gráfica (aceite base, gasoil).

Podemos apreciar que el índice de estimulación en presencia de DMSO cuando la concentración es directa, es cero en el aceite base, lo que da entender que es letal mientras que el gasóleo manifiesta respuesta en exposición directa, por tanto, es menos nocivo que el aceite base.

Sin embargo en agua libre observamos un comportamiento inverso. El aceite base se manifiesta menos nocivo que el gasóleo como se puede apreciar en las gráficas correspondientes. Por tanto en el mar, el gasóleo a iguales concentraciones tiene un carácter más letal que el aceite base. En combinación con otros compuestos el aceite base se presenta más nocivo que el gasoil.

#### BIBLIOGRAFÍA

- BARBERO *et al.* *Técnicas experimentales de Laboratorio*. C.E.P.1994.0 La Línea de la Concepción (Cádiz).
- CATOIRA, J. L. *Prospección, análisis y cartografía de macroalgas y erizo de mar en el litoral de Galicia*.1993. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.
- CERDEIRA, J. D. *El Erizo de mar (Paracentrotus lividus) en la costa gallega*. 2001. Delegación territorial de Lugo. Xunta de Galicia.
- CONSEJERÍA DE PESCA Y AGRICULTURA. *Estudio Integral de la Pesquería del Erizo de Mar (Paracentrotus lividus) y la Anémona Marina (Anemonia sulcata) en la Provincia de Cádiz*. 2001. Dirección general de pesca y acuicultura. Junta de Andalucía.
- ENOSA. *Prácticas de Microscopía*. 1975. Lasgón S.L.
- DÍAZ DE RADA, V. *Técnicas de Análisis Multivariante para Investigación Social y Comercial*. 2002. RA-MA Editorial.
- PEMEX, *El Petróleo*. 1988. Anuario Estadístico de PEMEX.
- SALA, E., Ribes, M., Hereu, B., Zabala, M., Alvà, V., Coma R., Garrabou, J. 1998. "Temporal variability in abundance of the sea urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* in the northwestern Mediterranean: comparison between a marine reserve and an unprotected area". *Marine Ecology* 168: pp. 135-145.
- SALVADOR FIGUERAS, M. *Análisis de conglomerados o cluster*, 2001. [en línea] *5campus.org, Estadística* <<http://www.5campus.org/leccion/cluster>>
- WEISZ, PAUL B. *La Ciencia de la Zoología*. 1982. Ediciones Omega.