

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITÈCNICA SUPERIOR DE GANDIA

Grado en Ciencias Ambientales

---



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA  
SUPERIOR DE GANDIA

# “Toxicidad de sedimentos marinos procedentes de puertos”

**TRABAJO FINAL DE GRADO**

Autor/a:  
**Bryan Andrés Rodríguez**

Tutor/a:  
**Silvia Laura Falco  
Giaccaglia**

**GANDIA, 2021**



## RESUMEN

Los sedimentos marinos juegan un gran papel en el ecosistema ya que no solo son el soporte de la flora; la cual conforma el hábitat de las especies bentónicas, sino que también le aporta gran variedad de nutrientes. Desde la creación y uso de los puertos, estas áreas que delimitan la costa y el mar han recibido una gran influencia procedente de la actividad humana. Debido a estos cambios los sedimentos comienzan a absorber las sustancias que se desprenden de estas actividades.

Por tanto, y para saber si el sedimento ha alcanzado concentraciones de contaminantes lo suficientemente tóxicas como para ser preocupantes se ha decidido analizar su toxicidad general a través del protocolo estandarizado: "Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)". Este test se ha aplicado a los sedimentos del Puerto de Gandía, del Puerto recreativo de Gandía, del Puerto del Perelló, del Puerto de Oliva y del Puerto de Denia. Siguiendo la metodología descrita podemos concluir que se han visto afectadas las longitudes de las larvas en todos los puertos, destacando el Puerto del Perelló y el de Oliva. Siendo el Puerto del Perelló el de mayor densidad de embarcaciones seguido por el de Oliva el cual, además, también recibe aportaciones de sedimentos provenientes de la Albufera.

**PALABRAS CLAVE:** Sedimentos; puerto; toxicidad; protocolo estandarizado.

## ABSTRACT

Marine sediments play a great role in the ecosystem since they are not only the support of the flora; which forms the habitat of benthic species, but also provides a great variety of nutrients. Since the creation and use of ports, these areas that delimit the coast and the sea have been greatly influenced by human activity. Due to these changes, the sediments begin to absorb the substances that are released from these activities.

Therefore, and to know if the sediment has reached concentrations of pollutants toxic enough to be of concern, it has been decided to analyze its general toxicity through the standardized protocol: "Protocol for the toxicity test of marine sediments with larvae of the *Paracentrotus sea urchin lividus* (Lamarck, 1816)". This test has been applied to the sediments of the Port of Gandía, the Recreational Port of Gandía, the Port of Perelló, the Port of Oliva and the Port of Denia. Following the methodology described, we can conclude that the lengths of the larvae have been affected in all ports, highlighting Puerto del Perelló and Oliva. Being the Puerto del Perelló the one with the highest density of vessels followed by the one in Oliva which, in addition, also receives contributions of sediments from the Albufera.

**KEYWORDS:** Sediments; port; toxicity; standardized protocol.

## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
Sedimentos del medio marino .....	1
Medio marino.....	1
Formación de sedimentos.....	1
Área de estudio .....	2
<b>Ubicación</b> .....	<b>2</b>
<b>Puertos</b> .....	<b>2</b>
Toxicidad de los sedimentos portuarios .....	9
Posibles causas.....	10
Posibles efectos.....	11
Especie empleada.....	12
Taxonomía.....	12
Hábitat.....	12
Método reproductivo.....	13
Interés experimental.....	13
Antecedentes .....	13
Estudios anteriores.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MÉTODOS Y MATERIAL .....	15
Protocolo seleccionado .....	15
Preparaciones previas .....	15
Muestreo de sedimento.....	15
Muestreo de erizos .....	16
Preparación de la muestra a analizar: Elutriado .....	17
Obtención de gametos .....	17
Fecundación .....	18
Densidad y éxito de fecundación .....	18
Test de toxicidad con muestras.....	18
Exposición e Incubación .....	18
Embriogénesis .....	19
Tóxico de referencia.....	19
Longitud larvaria .....	19
Resultados finales .....	20
4. RESULTADOS .....	23

Fecundación .....	23
Embriogénesis .....	24
Longitud larvaria .....	25
CE <sub>5</sub> , CE <sub>10</sub> , CE <sub>50</sub> .....	28
NOEC y LOEC .....	29
DISCUSIÓN.....	31
5. CONCLUSIÓN.....	34
6. Bibliografía .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### **Sedimentos del medio marino**

#### **Medio marino**

El medio marino es una pieza fundamental del origen de la vida en la Tierra, repleto de vida animal y vegetal conocida y por conocer. Hay muchos tipos distintos de medios marinos como lo son: las marismas, los manglares, las zonas intermareales, los estuarios, las lagunas costeras, los arrecifes y el fondo marino y mar profundo, presentando diferencias ya sea por su vegetación por su geología, sus niveles de oxígeno o nutrientes, o su ubicación respecto a la costa entre otras características. Este tipo de ecosistema compuesto principalmente por agua salada compone el 71% de la superficie del planeta ocupando el espacio que separa las islas y continentes. Y por motivos comerciales o bélicos los humanos han intentado cruzar este ecosistema utilizando barcos, para lo cual, y, a medida que el número de embarcaciones aumentaba fue necesaria la creación de zonas en las que almacenar los navíos para su organización, de esta forma se crearon los primeros puertos. Y desde entonces teniendo en mayor o menor consideración los beneficios de su conservación se aumentó su explotación. Poniendo en peligro sus funciones como suministro de oxígeno y sumidero de CO<sub>2</sub>, regulador del clima y hábitat para fauna y flora indispensables para el desarrollo de la vida. El fondo marino puede estar compuesto por limos, arcillas, arenas, piedras de mayor tamaño o de la misma roca madre, a continuación, por encima de esta capa puede haber materia orgánica en descomposición o viva. En concreto el medio marino de las zonas de estudio estaba formado por una mezcla en mayor o menor porcentaje dependiendo la muestra de arena y materia orgánica descompuesta y no descompuesta (Anèl.lides, 2016).

#### **Formación de sedimentos**

El proceso que sigue la roca madre en su erosión es siempre el mismo. Parte de un estado inicial de solidez y buena estructura, y con el paso del tiempo se va generando la meteorización, proceso por el que física, biológica o químicamente se degrada o fragmenta la roca, produciendo partes de ella más pequeñas. Estas partes se transportan a través del viento o de corrientes superficiales hasta que se depositan en el mar, donde con el paso del tiempo y dependiendo de las corrientes oceánicas se llegarán a depositar en el lecho marino de una zona del mundo. Estas deposiciones irán creando capas de sedimento según vayan llegando los mismos, pudiendo ser útiles como ventana al pasado al estudiar los sedimentos que se depositaron hace cierto número de años, estudiando por ejemplo los fósiles en ellos u otros componentes adsorbidos al sedimento. Y es que los elementos adsorbidos al sedimento pueden ocasionar ciertos problemas a la vida que se apoya o utiliza de cualquier manera el fondo del mar para su desarrollo, como es el caso de los peces bentónicos, que basan su vida ligada al fondo del mar (Olave Seguel, 2019).

La dinámica de los sedimentos explica numerosos fenómenos entre los cuales se encuentra la adsorción y desorción de especies químicas, debiendo tener muy en cuenta este fenómeno para saber si algún elemento que se esté vertiendo se adsorba al sedimento y afecte al ecosistema (Rodríguez, 2003)

El sedimento está constituido principalmente por 4 componentes. El primero se trata del agua intersticial que ocupa el espacio que dejan las partículas sólidas de la matriz. En segundo lugar, el componente inorgánico formado por minerales y rocas provenientes de la erosión del material terrestre. A continuación, la materia orgánica también presenta una parte, formada por mezclas de carbohidratos, lípidos, proteínas y diversas sustancias húmicas. Para finalizar, una agrupación de material antropogénico, dónde se incluyen varios tipos de contaminantes. Debido a esto el sedimento puede llegar a acumular cantidades de tóxicos con efectos adversos a la salud humana o al medio ambiente (Leticia Peluso, 2011).

## Área de estudio

### Ubicación

De forma general el área de estudio comprende puntos en diferentes puertos de la costa valenciana y otro a 2,5 kilómetros de la costa.

De manera más concreta se tomaron 6 muestras de sedimento; 5 de ellas proceden de puertos y 1 procede de una zona considerada como control que servirá para comparar la supuesta toxicidad de los puertos con la de una ubicación sin tóxicos, de esta manera se podrá eliminar del estudio el efecto que el sedimento en si mismo pueda ocasionar. La ubicación concreta de las zonas de muestreo se puede observar en la tabla 1.

*Tabla 1. Ubicación de los puntos de muestreo de sedimento.*

Muestra	Coordenadas
Puerto de Gandía	38°59'37.7"N 0°09'34.5"W
Puerto recreativo de Gandía	38°59'49.4"N 0°09'17.1"W
Puerto del Perelló	39°16'42.8"N 0°16'30.4"W
Puerto de Oliva	38°55'53.1"N 0°05'44.6"W
Puerto de Denia	38°50'27.7"N 0°07'13.5"E
Zona control	38°58'39.4"N 0°07'00.2"W

### Puertos

#### Puerto de Gandía

Se sitúa a 65 kilómetros al sur de la ciudad de Valencia y a 110 kilómetros del norte de la ciudad de Alicante (Ilustración 1). Desde diciembre de 1385 está integrado en la Autoridad Portuaria de Valencia, debido al Real Decreto 2.100/1985 de 23 de octubre. Sus funciones actualmente son la importación y manipulación de los siguientes productos: productos químicos, papel, y productos perecederos (fruta refrigerada) en exportación e importación, así como también productos forestales. El puerto de Gandía utiliza una terminal polivalente ubicada en el Muelle Serpis. La terminal presenta una longitud de 300 metros y un calado de hasta 10 metros (Tabla 2 y 3) (Autoridad portuaria de Valencia, 2020).

Tabla 2. Datos generales sobre el puerto de Gandía (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Características generales		
Superficies	Espacio terrestre Infraestructuras de abrigo (m)	(m <sup>2</sup> )
Calado en la bocana (m)		
Muelles	Calado (m)	6,5
	Longitud (m)	
Areas de evolución	Superficie (m <sup>2</sup> )	235542,34
	Calado (m)	

Tabla 3. Datos generales sobre el puerto de Gandía (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Servicios a la embarcación	
Número de amarres	47
Grúa fija	
Eslora máxima	
Área carenaje (m <sup>2</sup> )	
Hibernaje (m <sup>2</sup> )	
Superficie cubierta de talleres (m <sup>2</sup> )	
Alumbrado / Electricidad	Sí
Agua Potable	Sí
Muelle de espera	Sí
Rampa	Sí
Reparación y mantenimiento	Sí
Combustible	Sí
Varadero	Sí



Ilustración 1. Foto satelital del puerto de Gandía (Google Maps, 2021)

### Puerto recreativo de Gandía

El puerto recreativo de Gandía (Ilustración 2) se encuentra situado dentro del propio puerto comercial. Está bien protegido por un potente muelle exterior, con una entrada fácil. Al entrar se verá a Br el muelle comercial, pasado este se encuentran las instalaciones del Náutico situadas en la bahía de Cala Bona, las embarcaciones deportivas tienen prohibido el paso a las zonas pesquera y comercial, menos en caso de emergencia. Además de los servicios típicos que puede ofrecer el Real Club Náutico, el puerto ofrece una marina seca con capacidad para 90 barcos (Tabla 4 y 5) (Autoridad portuaria de Valencia, 2020).

Tabla 4. Datos generales sobre el puerto recreativo de Gandía (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Características generales		
Calado en la bocana (m)		3,8
Areas de evolución	Superficie (m2)	34219.82
	Calado (m)	3,8

Tabla 5. Datos generales sobre el puerto recreativo de Gandía (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Servicios a la embarcación	
Número de amarres	301
Alumbrado / Electricidad	Sí
Agua Potable	Sí
Muelle de espera	Sí
Rampa	Sí
Reparación y mantenimiento	Sí
Combustible	Sí

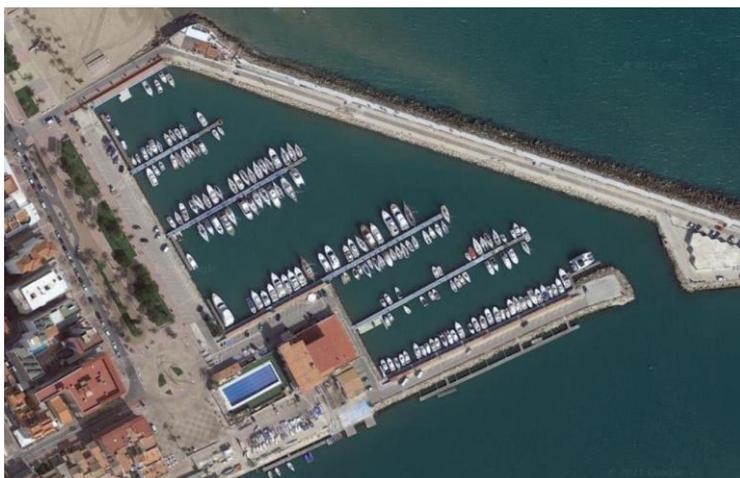


Ilustración 2. Foto satelital del puerto recreativo de Gandía (Google Maps, 2021)

### Puerto del Perelló

El Perelló conforma el barrio marítimo del municipio de Sueca, actualmente se forma con altos edificios de apartamentos de segunda residencia (Ilustración 3). El Club Náutico instaló aquí sus instalaciones gracias a uno de los canales que unen la Albufereta con el mar. Este puerto fluvial, no se ve con facilidad desde el mar, minimizado debido a su escollera casi vertical, si bien el navegante que procede de Valencia deberá calcular unas 10 millas al Sur para detectar las edificaciones que lo rodean. Los pantanales están situados en el margen derecho del canal y la mayoría de sus embarcaciones son a motor, debido a su escaso calado (Tabla 6 y 7) (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Tabla 6. Datos generales sobre el puerto del Perelló (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Características generales			
Superficies	Espacio terrestre (m <sup>2</sup> )		15.367,22
	Infraestructuras de abrigo (m)		379,70
Calado en la bocana (m)	1,7 - 2		
Muelles	Calado (m)		1,8
	Longitud (m)		701,14
Areas de evolución	Superficie (m <sup>2</sup> )		29.920,22
	Calado (m)		1,5 - 2

Tabla 7. Información sobre los servicios del puerto del Perelló (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019)

Servicios a la embarcación	
Número de amarres	186
Grúa fija	3 y 8 tn
Eslora máxima	10 m
Área carenaje (m <sup>2</sup> )	1.131
Hibernaje (m <sup>2</sup> )	550
Superficie cubierta de talleres (m <sup>2</sup> )	448
Alumbrado / Electricidad	Sí
Agua Potable	Sí
Muelle de espera	Sí
Rampa	Sí
Reparación y mantenimiento	Sí
Combustible	Sí
Varadero	Sí

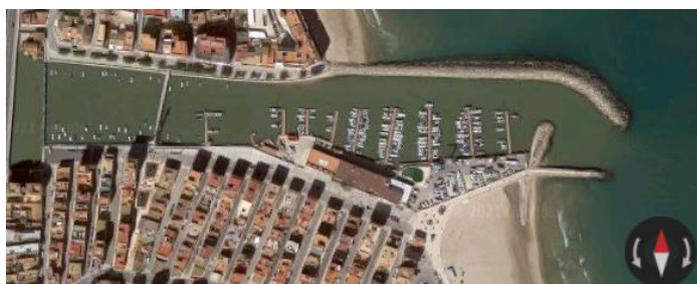


Ilustración 3. Foto satelital del puerto del Perelló (Google Maps, 2021)

### Puerto de Oliva

El Puerto deportivo La Goleta (Ilustración 4) se encuentra en el litoral de Oliva, municipio de Valencia que muy próximo con la provincia de Alicante y se halla a mitad de camino entre Gandía y Denia. Tanto el Puerto Deportivo como el Club Náutico tienen modernas instalaciones, a pesar de que el navegante cuente con pocas referencias salvo sus dos espigones que se adentran en el mar unos 200 m. No están repartidos los puestos de atraque, distribuyéndose los barcos en su interior en función de su eslora, que permite un máximo de 15 m (Tabla 8 y 9). Se realizan cursillos de náutica y en verano está operativa la escuela de vela (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Tabla 8. Datos generales sobre el puerto de Oliva (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Características generales			
Superficies	Espacio terrestre (m <sup>2</sup> )		30.023
	Infraestructuras de abrigo (m)		900,23
Calado en la bocana (m)	2,5		
Muelles	Calado (m)		2,5
	Longitud (m)		532,58
Areas de evolución	Superficie (m <sup>2</sup> )		34.699,07
	Calado (m)		2

Tabla 9. Información sobre los servicios del puerto de Oliva (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Servicios a la embarcación	
Número de amarres	423
Grúa fija	5 tn
Eslora máxima	15 m
Área carenaje (m <sup>2</sup> )	3.775
Hibernaje (m <sup>2</sup> )	391
Alumbrado / Electricidad	Sí
Agua Potable	Sí
Muelle de espera	Sí
Rampa	Sí
Reparación y mantenimiento	Sí
Combustible	Sí
Varadero	Sí



Ilustración 4. Foto satelital del puerto de Oliva (Google Maps, 2021).

## Puerto de Denia

El gran puerto de Denia, en la Costa Blanca (Ilustración 5), se conforma por dos grandes muelles que el dan protección, y que junto con el litoral crean un pseudotriángulo con acceso por su vértice exterior protegido por la escollera, permitiendo que su acceso sea seguro incluso en condiciones meteorológicas adversas. En su lado suroeste, se encuentra la dársena deportiva, gestionada por el Club Náutico, que cuenta asimismo con buenas instalaciones. Por otro lado, el puerto comercial dispone de un jet-foil a Ibiza. El calado de su lado Norte es escaso, pero dispone de balizamiento interior (Tablas 10 y 11). Es posible fondear fuera de los lugares transitados (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Tabla 10. Datos generales sobre el puerto de Denia (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Características generales		
Superficies	Tierra(m2)	295.288
	Agua abrigada(m2)	600.067
Calado en la bocana (m)	7,0	
Características por zonas		
Zona pesquera		
Muelles (ml)	332	
Calado (m)	4,5 - 4,0	
Zona comercial		
Muelles (ml)	230,0	
Calado	6,0 - 6,5	
Amarres deportivos de gestión directa		
Número (Ud)	501	
Eslora máxima (m)	8	
Calado (m)	2,0 - 3,0	
Amarres deportivos en concesión (CN)		
Número (Ud)	586	
Eslora máxima (m)	25	
Calado (m)	2,0 - 4,5	

Tabla 11. Información sobre los servicios del puerto de Denia (Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad, 2019).

Servicios a la embarcación		
Varada	Grúa (Tn)	Sí (12)
	Pórtico (Tn)	Sí (75)
Combustible	Gasolina	No
	Gasoil (A/B)	Sí (A - B)



Ilustración 5. Foto satelital del puerto de Denia (Google Maps, 2021)

### Toxicidad de los sedimentos portuarios

En primer lugar, cabe aclarar que la existencia de sedimentos contaminados; bien en zonas de agua continental o bien en aguas marinas, es una evidencia en todo el mundo desde mediados del siglo XX (Landaeta, 1995)

De forma general la toxicidad del sedimento puede provenir tanto de cualquier tipo de industria, de zonas agrícolas que utilicen pesticidas o del vertido de los emisarios submarinos (González Lozano, 2007). Sin embargo, teniendo en cuenta la ubicación del sedimento que se va a analizar, los contaminantes provendrán de otras fuentes, como el depósito de los contaminantes que porta la fauna local en su organismo y que al morir el individuo se depositan en el lecho marino, las embarcaciones y su mantenimiento, y el resto de las actividades que se ejecuten en el puerto. “Se identifica como contaminantes críticos para estos puertos, altos contenidos de: materia orgánica (MOT), metales trazas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), los que en

términos de su concentración llegan a ser tóxicos.” (Rudolph et al., 2009). Hay que tener en cuenta que a pesar que según la adaptación de la Directiva 76/769/CEE al progreso técnico se haya prohibido el uso de pinturas antiincrustantes con presencia de TBT en buques con una longitud inferior a los 25 metros, la toxicidad ya generada y acumulada por este elemento no desaparece, si no que permanecerá hasta que nuevas capas de sedimento aíslen a la flora y fauna del sedimento contaminado, el cual es un proceso lento (Organización Marítima Internacional, 1999)

### **Posibles causas**

Habría que tener en cuenta antes de los siguientes puntos que en el trabajo se analizará la toxicidad general del sedimento, sin discernir en si la toxicidad ha sido provocada por un elemento u otro. Por tanto, a pesar de que el aporte más grande de contaminación será el primordial en el momento de tomar medidas, se deben tener todas las posibles causas de contaminación en cuenta ya que sumarán toxicidad al sedimento. En segundo lugar, cabe destacar que no se profundizará en causas que no sean posibles en el ámbito de estudio.

#### **Origen natural**

Entre los diferentes procesos que ocurren en la Tierra de forma natural no todos tienen consecuencias inocuas para su entorno. Con relación a la emisión de metales pesados el lavado de los suelos, las condiciones atmosféricas que afectan a las rocas y las erupciones volcánicas tienen un gran papel.

Por otro lado, existen procesos metabólicos que también puede estar relacionados con el aporte de metales pesados, como es el caso del fitoplancton que libera cadmio particulado como observaron (Ramos & Luciano, 1998). Debido a grandes cantidades de vida animal y vegetal y a sus procesos, tales como la alimentación y la muerte pueden elevarse las concentraciones de materia orgánica particulada y disuelta.

#### **Origen artificial**

Según la I Conferencia Hemisférica sobre la protección ambiental portuaria celebrada en Panamá en 2007, las causas principales por las que pueden existir derrames de hidrocarburos y materiales peligrosos en los puertos; siendo estos dos unos de los principales a tener en cuenta, estos derrames se pueden deber a tareas operativas, a accidentes y a descargas ilegales.

En el primero de los casos, se entiende por tareas operativas la carga y descarga de las embarcaciones, el bunkering; o repostaje en alta mar y trasiegos. Sobre las causas accidentales, principalmente se deben a el error humano o al comportamiento inesperado de algún equipo o de alguna sustancia, entre ellos están las colisiones, las varaduras, las fallas estructurales, las explosiones e incendios, rotura o fisura en los ductos, colapso o daños en tanques cisterna y daños o pérdidas de contenedores. Por último, las descargas, que como su propio nombre indica son vertidos intencionados no regulado por la legislación, y realizado evitando su existencia (Vila, 2007).

Por otro lado, las emisiones incontroladas de la industria, como el uso de productos químicos como pesticidas, una vez que se transportan desde las áreas agrícolas a través del agua, estos productos químicos eventualmente se depositarán en los sedimentos o descargas "controladas", como las emisiones de los emisarios submarinos que descargan principalmente

aguas residuales domésticas, aunque en zonas donde no hay separación de tratamiento y "conducción", las aguas residuales industriales se mezclan con las aguas residuales domésticas, aumentando la carga contaminante y los niveles de toxicidad (Cuello et al., 2019). La mayoría de los metales utilizados en las actividades industriales se encuentran en las zonas costeras, especialmente cerca de refinerías de petróleo, plantas de fertilizantes, empresas mineras y metalúrgicas y, por supuesto, cerca de ciudades pobladas. Las emisiones domésticas no tratadas producen grandes cantidades de lodos ricos en metales como plomo, zinc, cadmio y cromo, que se vierten a los ríos o directamente al mar. Mediante el uso de fertilizantes y plaguicidas en áreas agrícolas y la eliminación de fundiciones y plantas de cromado, también se han introducido metales en el medio marino y costero.

Los bactericidas se utilizan actualmente en revestimientos antifouling (antiincrustante) en barcos para evitar que varios organismos marinos unicelulares y multicelulares se unan a la superficie de estas embarcaciones. El principal componente bactericida en la mayoría de los recubrimientos antiincrustantes actualmente en uso es el cobre (Cu) y, a veces, compuestos de zinc (Zn) o potenciadores orgánicos, así como una combinación de diferentes bactericidas (González Lozano et al., 2006).

Estos recubrimientos se disuelven en agua de mar y liberan sus ingredientes activos al medio ambiente circundante, los cuales son tóxicos para la vida marina y perjudican la función de diferentes vías que son críticas para su fotosíntesis, reproducción y crecimiento. Esto indica que la contaminación de cobre en sitios de gran presencia de embarcaciones como pueden ser los puertos, o turismo náutico, puede causar un incremento de hasta mil veces la concentración ambiental de este metal en el medio (González Lozano et al., 2006).

Si comparamos el nivel de toxicidad del TBT con el del cobre, este último es mucho menos dañino, por lo que es una mejor opción. Sin embargo, sigue siendo tóxico para los organismos marinos, inhibiendo la fotosíntesis y las enzimas del ciclo de Krebs, además de generar estrés oxidativo, mutaciones y deterioro de la capacidad reproductiva (González Lozano et al., 2006).

El cobre está relacionado con partículas finas y materia orgánica, y su alta concentración proviene principalmente, como comentamos con anterioridad, de los recubrimientos antifouling, aunque esta no es la única fuente, pues la descarga de aguas residuales municipales y el tratamiento de hidrocarburos son también un factor a tener en cuenta (González Lozano et al., 2006).

Las principales fuentes de zinc en los sistemas acuáticos incluyen las aguas residuales, la minería y las actividades de fundición y refinación, la quema de madera, la incineración de basura y otras aguas residuales atmosféricas. En términos generales, Cu, Pb y Zn son buenos indicadores de las actividades humanas y pueden ingresar al océano a través de las aguas residuales domésticas e industriales por los ríos o emanaciones a la atmósfera, pero a continuación son depositados y acumulados en el sedimento (González Lozano et al., 2006).

## **Posibles efectos**

### **Sobre la flora**

El efecto sobre la vegetación en los puertos es devastador, la población de flora marina disminuye drásticamente desapareciendo en la mayoría de estos puertos con fondo de sedimentos. Ya sea por el movimiento de los barcos, por la construcción del puerto o por los

contaminantes en él. En caso de que aún haya vegetación en el lecho del puerto está puede ser afectada por distintas enfermedades limitando su crecimiento, como disminuir el crecimiento de la radícula, provocando una dilatación temporal en el proceso de germinación de las semillas (Ratto et al., 2010). También puede afectar a la fotosíntesis de las plantas (Ibárcena, 2011).

### **Sobre la fauna**

La fauna en desarrollo está afectada de mayor forma por los metales pesados, ocasionando un subdesarrollo o la muerte. El cúmulo de estos contaminantes pueden generar modificaciones genéticas que pueden pasarse a las generaciones venideras ocasionando peligro a la supervivencia de la especie (Ibárcena, 2011).

Uno de los efectos más llamativos sobre especies de caracoles es el imposex provocado por el TBT, en el que las hembras desarrollan características sexuales de los machos debido al efecto del compuesto en su sistema endocrino, provocando la disminución o desaparición en sus poblaciones.

En conclusión, cabe aclarar que no solo afectan de distintas maneras a cada individuo, llevando a estos a su desaparición o disminución de la especie en la zona, si no que en muchos casos los tóxicos circulan por la cadena trófica; desde la base a la punta, intoxicando a todos los seres vivos.

### **Especie empleada**

#### **Taxonomía**

El erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) pertenece al reino *Animalia*, dentro del filo *Echinodermata*, perteneciendo a la clase *Echinoidea*, del superorden *Echinacea*, perteneciente al orden de los *Camarodonta*, de la familia de los *Parachinidae*, del género *Paracentrotus*, siendo la especie *P. lividus* (Herrero Barrencua, 2008).

#### **Hábitat**

Principalmente esta especie de erizo de mar se puede encontrar en zonas del Mediterráneo y del Atlántico nororiental; concretamente desde Irlanda y Escocia hasta Marruecos e islas como las macaronésicas de Azores, Madeira y las islas Canarias. Generalmente sin ser esta especie una excepción, los erizos habitan aguas someras, partiendo de un nivel de bajamar que puede alcanzar los 20 metros, suele preferir un sustrato duro en el que ocupa recovecos y cavidades en la roca, como áreas más planas. Aprovecha la vegetación de la zona y que esta se quede atravesada por sus púas para mejorar su camuflaje ante depredadores comportamiento denominado "covering". El *Paracentrotus lividus* es parte de la comunidad de animales bentónicos del mar, resaltando su papel como especie herbívora clave controlando las masas de vegetación marina. Su hábitat no solo está definido por su preferencia a la zona intermareal inferior o superior ocupando grietas y charcos, sino también a la presencia de otras especies de erizos y la competencia entre estas (Herrero Barrencua, 2008).

## **Método reproductivo**

“El *Paracentrotus lividus* es una especie gonocórica sin dimorfismo sexual externo, aunque se conozcan casos excepcionales de hermafroditismo. La fecundación es externa y da lugar a una larva equinopluteus planctófaga que puede durar entre 23-29 días.” Una vez que adquiere la capacidad de contactar con el sustrato y poder sujetarse realiza esta acción gracias a sus podios primarios hasta que encuentra la ubicación adecuada, pudiendo retrasar el momento de su metamorfosis si fuese necesario.

Su ciclo reproductor se regula según diferentes factores como el alimento, la temperatura y la cantidad de luz, teniendo de uno a dos picos anuales de desarrollo gonadal (Herrero Barrencua, 2008).

## **Interés experimental**

Las características principales que decantaron su uso frente a otras especies fueron:

- Facilidad de muestreo ya que a pesar de que haya que entrar al mar por zonas pedregosas y tener cuidado con sus púas, el animal no escapa de tu presencia.
- Facilidad de almacenaje vivo para tener una mayor flexibilidad en el tiempo para realizar los ensayos.
- El proceso a seguir para la obtención de las larvas no requería material al que no se tuviese alcance, y el proceso en si mismo no es complicado.

## **Antecedentes**

### **Estudios anteriores**

En la tesis doctoral de Segovia Martínez (2014) sobre los contaminantes orgánicos en el litoral de la Comunidad Valenciana se obtuvieron datos de concentraciones de tóxicos por encima de lo permitido según la norma de calidad ambiental (NCA). También se muestran datos que los organismos filtradores como los bivalvos debido a la bioacumulación portan en ellos una mayor concentración de compuestos como el 4-nonilfenol o el octinefol que los sedimentos.

Por otro lado, llama la atención que los datos más elevados y notorios en sedimentos se produzcan en la mayoría de los casos en el puerto de Sagunto y en la zona de transición entre el puerto de Gandía y el cabo de San Antonio, como se puede ver sobre todo en el año 2012 en las concentraciones de elementos como el antraceno, el benzo(a)pireno, el benzo(a)fluoranteno y otros componentes similares. Por último, cabe destacar la presencia de concentraciones de cloroalcanos en el puerto de Gandía, de dietilhexitalato y de TBT (Segovia Martínez, 2014).

## 2. OBJETIVOS

- Analizar si existe toxicidad en los sedimentos de diferentes puertos de la costa mediterránea.
- Si existe toxicidad, analizar en qué grado afectaría a las larvas su presencia.
- Determinar la causa de la posible toxicidad y si tiene relación con las características de los puertos.

### 3. MÉTODOS Y MATERIAL

#### Protocolo seleccionado

El protocolo seleccionado para replicar en nuestro caso particular es el "Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus*". Se optó por este método frente a otros tipos de bioensayo sobre todo por la facilidad de trabajar con la especie, por los rápidos resultados que ofrecía, ya que apenas se demora 2 días para poder leer los resultados y por la seguridad que ofrece el sistema experimental para saber si el bioensayo se ha ejecutado correctamente o no.

El protocolo se ha seguido prácticamente al pie de la letra, únicamente variando el método de agitación en la elaboración del elutriado, y el volumen de los botes de los bioensayos, utilizando botes de cristal con tapón de 25mL de volumen.

#### Preparaciones previas

Previo al inicio de la obtención de todos los elementos que conformarán el estudio se realizará una disolución de 250mL de cloruro potásico (KCl) con una concentración de 0,5M. Esta disolución deberá guardarse en la nevera a 4°C.

Tras guardar la disolución que se utilizará para que los erizos expulsen el material se separarán los siguientes objetos para extraer y transportar el sedimento, los erizos y el agua de mar y las rocas del mar con algas o microalgas, para ello ha sido elegido respectivamente, una draga, una cuerda de al menos 10m y un capazo para la extracción del sedimento, un cuchillo o una espátula de madera, una malla porosa plástica y un recipiente contenedor plástico de 25L para la recolección y transporte de los erizos y por último, otro recipiente contenedor plástico de 25L para transportar agua de mar y rocas que tengan algas o microalgas.

En el laboratorio se dejará preparado el espacio que ocupará la pecera destinada a albergar a los erizos hasta su uso, con el filtro y el aireador.

#### Muestreo de sedimento

Para llevar a cabo el muestreo en los puntos de la tabla 1, será necesaria la draga, una cuerda de al menos 10 metros y un capazo o algún recipiente para almacenar y transportar el sedimento. Una vez ubicados en el punto de muestreo y a pesar de que ya se había limpiado el material en el laboratorio, se procede a enjuagar tanto la draga como el capazo con el agua de la zona. Tras ello utilizando la draga se extrae el sedimento que se deposita en el capazo, es importante que al menos se obtengan 100g de sedimento, ya que será la cantidad necesaria para obtener el elutriado. Una vez obtenido se recomienda su transporte lo más rápido posible a una cámara frigorífica en la que permanecerá a 4°C en el bote de la ilustración 6 hasta su uso, que también deberá ser lo antes posible, por eso mismo como se puede ver en la tabla 12 no se realizaron todos los muestreos al mismo tiempo, sino una vez que el bioensayo con el sedimento guardado se finalice.

Tabla 12. Fecha del muestreo de los sedimentos.

Muestra	Fecha de muestreo
Puerto de Gandía	16/03/2021
Puerto recreativo de Gandía	19/03/2021
Puerto del Perelló	19/04/2021
Puerto de Oliva	23/04/2021
Puerto de Denia	1/05/2021
Zona control	12/03/2021

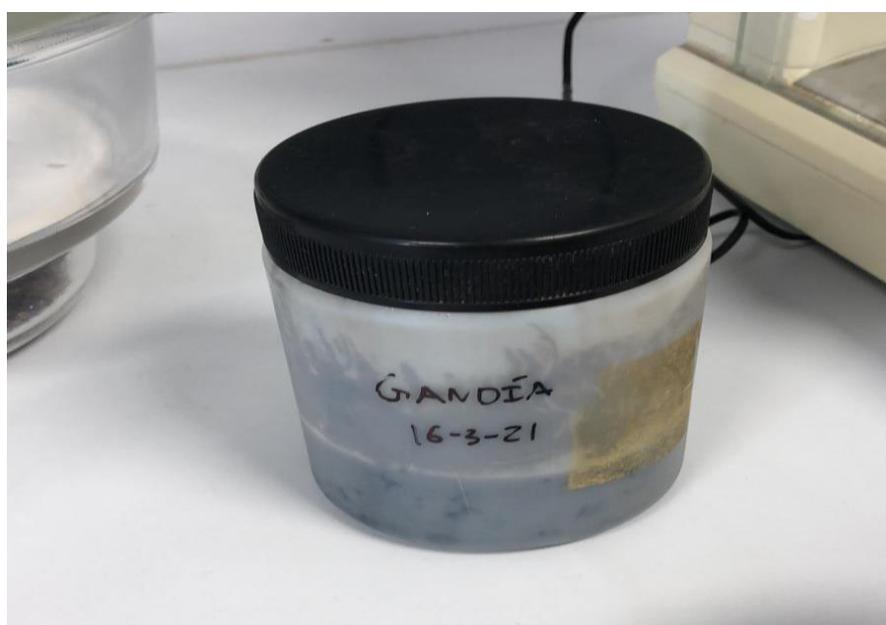


Ilustración 6. Bote de almacenaje del sedimento tras ser muestreado (Fuente propia).

### Muestreo de erizos

Para muestrear los erizos se visitaron dos ubicaciones distintas, una de ellas fue Cala blanca (Jávea) y la segunda Punta Negra (Denia). Aproximadamente se recogieron en cada muestreo entre 10 y 15 erizos para asegurar al menos un macho y una hembra con buen material reproductivo. Para recogerlos se irá vestido adecuadamente para meterse en el mar, y con la ayuda de un cuchillo, guantes o una espátula de madera se hará palanca para separar al erizo de la roca; cuánto más rápido se haga el movimiento más fácil será extraerlo ya que no le dará tiempo a sujetarse más fuerte. Los erizos muestreados se almacenan en un bidón de 25L con la misma agua de su bioma y una vez recolectados junto a otro bidón de agua para filtrar o para la pecera y alguna roca para que se alimenten de las microalgas que portan, se transportarán con la mayor brevedad y cuidado hasta la pecera del laboratorio para ser utilizados con la mayor brevedad posible.

### **Preparación de la muestra a analizar: Elutriado**

El primer paso es pesar 100g del sedimento muestreado y depositarlo en un bote aclarado con agua de mar filtrada (el filtro utilizado ha sido de 0,25 $\mu$ m) de 500mL. Tras esto, completar el volumen del bote con agua de mar filtrada. En segundo lugar, se optó por la agitación manual del bote durante media hora, aunque si se dispone de un rotador puede utilizarse durante el mismo tiempo a 60 revoluciones. A continuación, se deja decantar el sedimento “durante 12h a 20°C en total oscuridad”.

Una vez decantado, se extraerá con la ayuda de una jeringuilla y tubos de goma finos el líquido que queda por encima del sedimento decantado sin llegar a tocar este sedimento para que no se resuspenda (los primeros milímetros de elutriado se tiran para limpiar las gomas), depositándolo en otro bote de plástico de 500mL. Por último, se cierra el bote nombrado y se guarda a oscuras y a 4°C hasta su uso.

Cuando se desee realizar el bioensayo se trasvasarán directamente la cantidad calculada de elutriado según la concentración que se desee, tal y como se ejemplifica en la tabla 13.

*Tabla 13. Volúmenes de elutriado y agua de mar correspondientes para cada concentración de muestra.*

Concentración de elutriado (%)	Volumen de elutriado 0.25 $\mu$ m (mL)	Volumen de agua de mar filtrada (mL)
13	3.25	21.75
25	6.25	18.75
50	12.5	12.5
100	25	0

Para cada punto (o muestra) se preparan 5 réplicas y para el control (solamente agua de mar filtrada) se hacen 10 réplicas de 25mL (Garmendia et al., 2009).

### **Obtención de gametos**

Para su obtención en primer lugar se deberá proceder con la inyección de al menos 1mL de KCl 0,5M atravesando su parte blanda (peristoma). Durante la espera se realizarán unos pequeños y suaves giros para ayudar a que la inyección se reparta por el interior del erizo, hasta que en un par de minutos comiencen a expulsar el líquido de su interior, blanco en caso de los machos y anaranjado en caso de las hembras. Si esto no sucediese habría que proceder a abrir al erizo por la mitad paralela al suelo, estando el erizo apoyado en su boca. Esta partición deberá realizarse con el cuidado de no pincharse alguna de sus púas, se recomienda el uso de un paño y de un cuchillo debidamente limpio.

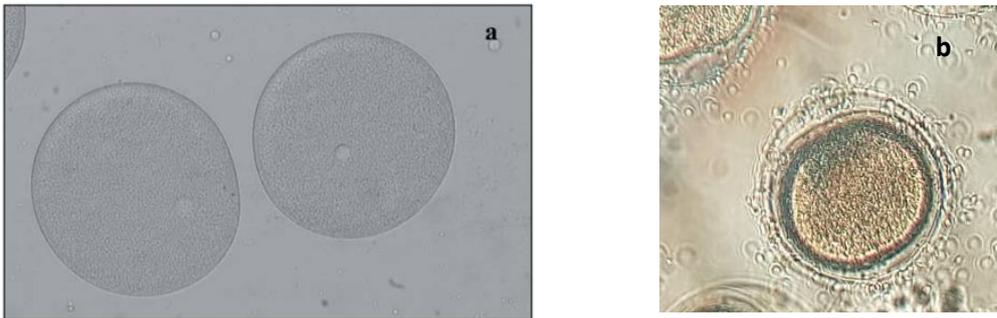
En caso de abrirlo no se deberán estrujar ni obtener el material reproductivo de su interior, se deberá extraer aquel material que salga de la gónada mediante una pipeta pasteur.

Una vez obtenidos los espermatozoides o los oocitos se deberá observar rápidamente su calidad, en el caso de los espermatozoides estos deberán presentar una alta movilidad cuando los observes en el microscopio, mientras que los oocitos deberán presentar una doble

membrana, ser esféricos y con un tamaño de al menos  $100\mu\text{m}$  como se puede ver en la ilustración 7 (Garmendia et al., 2009).

## Fecundación

El siguiente paso tras obtener gametos masculinos y femeninos es introducir en una probeta de 100mL de agua de mar filtrada a los oocitos hasta que se vea una gran cantidad de ellos en el agua a trasluz, sin que esta cambie de color en exceso. Tras 5 minutos se introducirán una o gota de esperma y se agitará suavemente durante 5-10 minutos teniendo la boca de la probeta bloqueada con Parafilm.



*Ilustración 7. Ovocitos sin fecundar (a) y ovocitos fecundados (Garmendia, 2009). (b) donde se puede observar la membrana de fertilización. Los ovocitos suelen presentar un diámetro cercano a  $100\mu\text{m}$  (Fuente propia)*

## Densidad y éxito de fecundación

A continuación, se calculará la densidad de ovocitos en la muestra y su grado de fecundación, para ello se requerirá del microscopio y de un porta cuadrulado para realizar el conteo. El proceso para calcular la densidad se repetirá 4 veces, siendo de  $20\mu\text{L}$  la cantidad que se introduce en el porta. A pesar de ello, no todo el volumen acaba dentro de la cuadrícula, es por eso que para el cálculo de la densidad solo se tiene en cuenta el volumen que acaba en el interior de la cuadrícula (la altura es de  $0,1\text{mm}$  y hay 9 celdas de  $1\text{mm}^2$  cada una). La densidad que se quiere alcanzar en los botes de cristal de 25mL es de 25 huevos/mL, por lo que se espera también que hayan unas 500 larvas. No será un problema pasarse levemente de esta cantidad para facilitar el conteo más adelante, pero sin llegar a excederte, ya que un excesivo número de larvas provocará que estas no se desarrollen por falta de recursos. Tras obtener los 4 resultados de volúmenes te quedarás con los dos valores medios y será la media de estos dos la medida de volumen resultado. “Todo este paso ha de llevarse a cabo con cierta celeridad y no debe durar más de 30 minutos” (Garmendia et al., 2009).

## Test de toxicidad con muestras

### Exposición e Incubación

Después de haber calculado el volumen de ovocitos gracias al porta con cuadrícula se pipeteará a los botes de cristal; 10 para los blancos y 5 réplicas para cada concentración. Para su incubación deberán permanecer a total oscuridad durante 48 horas a  $20^{\circ}\text{C}$  (Garmendia et al., 2009).

## **Embriogénesis**

Tras las 48 horas, se termina el tiempo de desarrollo de los vasos de la cámara a los cuales se les añaden un par de gotas de formol al 40%, de esta manera las larvas dejarán de crecer. Se deberá tener cuidado, ya que si se tarda en exceso en realizar el conteo de larvas el formol puede llegar a deformar a las mismas.

Utilizando un microscopio invertido se observa cada vaso y se procede a calcular el éxito de la embriogénesis. Para ello se tienen en cuenta el número de larvas plúteus normales entre las 100 primeras vistas. Considerándose larva plúteos aquellas en las que se puedan distinguir adecuadamente los 4 brazos como se ve en los últimos dos estados de la ilustración 9.

Por otro lado, utilizando la regla del microscopio se medirán 25 de esas 100 larvas plúteos de cada una de las réplicas. Las medidas pueden llevar a la confusión por la posición de la larva en cada situación, por lo que se seguirá el mismo patrón de medida, el elegido ha sido medir el lateral de la larva en todas las situaciones (Garmendia et al., 2009).

## **Tóxico de referencia**

El tóxico de referencia utilizado servirá para comparar la toxicidad de los sedimentos con la suya. El elegido ha sido el cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), y el procedimiento seguido será exactamente el mismo, con la diferencia de que este será preparado a diferentes concentraciones (1, 2, 4, 8 y 16 mg/L) (Garmendia et al., 2009).

## **Longitud larvaria**

A continuación, utilizando una lente del microscopio con regla integrada se procederá a medir la longitud de las larvas desarrolladas. Tras tomar los datos y dependiendo de la lente que utilices se deberá transformar los datos a su longitud real. La medida de la longitud se tomará de 25 larvas, y se deberá seleccionar una metodología para medir de la misma forma todas las larvas, en nuestro caso se decidió medir colocando la regla paralela al relieve de la larva como se puede ver en la ilustración 8. Se considerarán larvas desarrolladas a partir de la 4 etapa tal y como se muestra en la ilustración 9.



Ilustración 8. Larvas plúteos vistas en el microscopio y dónde se ubicaba la regla en su medición (Fuente propia).



Ilustración 9. Fases del estado de la larva en su desarrollo, siendo de izquierda a derecha la evolución (Garmendia et al., 2009).

## Resultados finales

El primer factor que analizar para dar por válidos los datos es comprobar que la mortalidad larvaria en los blancos no supere el 10%. Para este cálculo de la mortalidad se debe restar a los 100 individuos contados el número de larvas desarrolladas, quedando las no desarrolladas.

$$\text{Mortalidad (\%)} = \frac{\text{Larvas contadas} - \text{Larvas desarrolladas}}{\text{Larvas contadas}} * 100$$

Esta información se tomará además de todas las muestras incubadas.

A continuación, se calcularán las concentraciones letales 5, 10 y 50. En primer lugar, y con los datos de mortalidad de la embriogénesis se corregirán con la corrección de Abbott, el cual será el paso previo para poder realizar un análisis Probit con el software Statgraphics.

El primer paso de la corrección es calcular el promedio de la mortalidad en las 10 réplicas del blanco, tras ellos y mediante la siguiente fórmula se podrá obtener las nuevas mortalidades corregidas.

$$P' = \frac{P - P_c}{100 - P_c} * 100$$

Siendo:

P': Porcentaje de mortalidad corregido (% de embriones).

P: Porcentaje de mortalidad sin corregir.

P<sub>c</sub>: Porcentaje de mortalidad en el blanco (promedio)

A continuación, sabiendo el número de individuos analizados, la concentración y la mortalidad corregida se puede ejecutar el análisis Probit en Statgraphics.

Por último, se analizarán los cambios en la longitud de las larvas, para ello en primer lugar, trabajando con las medias de las medidas de cada réplica y se corregirán respecto la disminución que han sufrido en referencia a la media de las 10 réplicas del blanco siguiendo la siguiente fórmula.

$$\text{Disminución (\%)} = \frac{\text{Longitud medida}}{\text{Longitud media de los blancos}} * 100$$

Estos datos se analizarán mediante el test que proporciona Statgraphics "ANOVA" para comprobar que hay diferencia significativa entre las varianzas, y que la distribución de los datos tiene normalidad estadística. Para la diferencia significativa entre las varianzas se comprobará que el Valor-P en este campo sea >0,05, y para la normalidad se comprobará que el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada se encuentren en el rango de -2 y 2. En caso de no cumplirse alguno de estos requisitos se recurrirá al test no paramétrico de Kruskal-Wallis para mediante el gráfico de caja y bigotes ver si hay una diferencia significativa entre los datos según su concentración.

El paso que procede es el cálculo de las concentraciones efectivas 5, 10 y 50. Esta medida nos proporcionará la concentración a la que se produce una disminución significativa del 5%, 10% y 50% del tamaño medio de los blancos. Para ello se crea un gráfico que contenga el parámetro de "Disminución respecto a la media de los blancos" y la concentración. De este gráfico se obtiene la ecuación de la recta lineal con la que sustituyendo el primer parámetro mencionado por 95, 90 y 50 se puede obtener el valor de la concentración a la que se obtiene la CE<sub>5</sub>, CE<sub>10</sub> y CE<sub>50</sub> respectivamente.

Por último, para calcular el LOEC y el NOEC experimentales nos fijaremos en caso de que el análisis fuese paramétrico en las pruebas de múltiples rangos o en el gráfico de caja de bigotes

para los no paramétricos, esta información se obtiene de ejecutar la herramienta “ANOVA simple” en el Statgraphics.

LOEC: “Concentración experimental más baja en la que la respuesta es significativamente diferente de la del control” (Fernández, 2002).

NOEC: “Concentración experimental más alta que no redujo significativamente la longitud media de las larvas” (Fernández, 2002).

## 4. RESULTADOS

### Fecundación

En las tablas 14 y 15 se muestran los éxitos de fecundación de los bioensayos en cada una de sus 4 réplicas. Esta información se obtiene a partir de la división de las células fecundadas entre las totales multiplicado por 100.

Tabla 14. Éxito de la fecundación de las muestras de sedimento.

	Zona Control (%)	Puerto Gandía (%)	P. recreativo Gandía (%)	Puerto Perelló (%)	Puerto Oliva (%)	Puerto Denia (%)
Réplica 1	94,4	94,4	94,4	97,8	96,3	97,2
Réplica 2	93,8	93,8	92,7	90,2	93,8	93,3
Réplica 3	94,4	90,7	97,2	94,4	92,6	92,6
Réplica 4	93,5	92,4	93,5	91,3	90,7	92,2

Tabla 15. Porcentaje de óculos fecundados con éxito y volumen necesario para cada réplica del bioensayo del tóxico de referencia.

	Éxito de fecundación %	Volumen ( $\mu$ l)
Réplica 1	96,3	195,7
Réplica 2	91,3	187,5
Réplica 3	90,7	214,3
Réplica 4	94,4	236,8

La cantidad de oocitos liberados por los erizos dependen de cada individuo, por lo que, a la hora de realizar la fecundación, se deberá asegurar que al menos 500 de los ovocitos (oocitos fecundados) son introducidos en los botes. Las cantidades reflejada en la tabla 16 se obtendrán del cálculo de la densidad de ovocitos en cada cuadrícula teniendo en cuenta sus dimensiones y la cantidad de ovocitos introducidos en los botes.

Tabla 16. Volumen de la probeta que contiene 500 larvas para el bioensayo.

	Zona Control ( $\mu$ l)	Puerto Gandía ( $\mu$ l)	P. recreativo Gandía ( $\mu$ l)	Puerto Perelló ( $\mu$ l)	Puerto Oliva ( $\mu$ l)	Puerto Denia ( $\mu$ l)
Réplica 1	264,71	250,00	250,00	204,55	204,55	225,00
Réplica 2	264,71	281,25	281,25	204,55	204,55	236,84
Réplica 3	264,71	281,25	281,25	225,00	225,00	264,71
Réplica 4	214,29	180,00	180,00	204,55	204,55	187,50
Volumen	264,71	265,63	265,63	204,55	204,55	230,92

## Embriogénesis

Las tablas 17 y 18 se muestra la media del grado de mortalidad en función de la muestra y de la concentración de elutriado, tras 48 horas. Los datos completos se encuentran en el Anexo I.

Tabla 17. Media de la mortalidad de todos los bioensayos de sedimento en función de la concentración de elutriado.

Elutriado (%)	Zona Control (%)	Puerto Gandía (%)	P. recreativo Gandía (%)	Puerto Perelló (%)	Puerto Oliva (%)	Puerto Denia (%)
13	4,2	6,2	9	13,4	4,4	4,8
25	4,2	9,4	6,8	7,8	6,8	7,8
50	4,6	10	9	18,8	9,8	7,6
100	5	7,8	10	16,2	11,6	10,8

Tabla 18. Media de los resultados de la embriogénesis y su corrección respecto al blanco del tóxico de referencia.

Concentración (mg/L)	Mortalidad (%)	Mortalidad corregida (%)
1	7	5
2	9,8	7,8
4	11,6	9,6
8	26	24,8
16	93,8	93,8

Por último, respecto a la embriogénesis en la ilustración 10 se pueden ver las diferencias significativas entre las mortalidades al 100% de concentración de elutriado de la tabla 17 gracias a ejecutar "ANOVA simple" en Statgraphics.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Mortalidad por Puerto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Puerto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	5	5,0	X
Gandía	5	7,8	XX
Recreativo Gandía	5	10,0	XX
Denia	5	10,8	XXX
Oliva	5	11,6	XX
Perello	5	16,2	X

Ilustración 10. Comparación de la varianza de mortalidad entre las muestras de la tabla 17 en el 100% de concentración de elutriado mediante la herramienta "ANOVA simple".

CL5, CL10, CL50 de embriogénesis para el tóxico de referencia.

El análisis Probit que realizamos mediante Statgraphics, como se ve en la tabla 19, determinó las concentraciones letales 5, 10 y 50 con un intervalo de confianza el 95% para el Cd.

Tabla 19. Resultados del análisis Probit de la embriogénesis del tóxico de referencia en Statgraphics.

	Concentración (mg/L)	CL Inferior 95,0%	CL Superior 95,0%
CL 5	1,971	1,4756	2,422
CL 10	3,722	3,309	4,106
CL 50	9,900	9,545	10,277

### Longitud larvaria

En las tablas 20 y 21 se muestran la media de los 25 datos de las medidas de longitud de las larvas tras las 48 horas de incubación, en función del tipo de muestra y de la concentración utilizada. Los datos completos se encuentran en el Anexo I.

Tabla 20. Media de la longitud ( $\mu\text{m}$ ) de las larvas de los bioensayos con elutriados tras 48 horas de incubación.

Elutriado (%)	Zona Control	Puerto Gandía	P. recreativo Gandía	Puerto Perelló	Puerto Oliva	Puerto Denia
13	463,68	405,36	415,12	324,32	327,44	403,52
25	435,12	381,28	383,76	316,56	317,12	382,72
50	396,24	367,36	361,92	287,44	286,24	369,6
100	391,52	338,4	346,8	259,68	258,88	339,76

Tabla 21. Media de la longitud media de las larvas del tóxico de referencia.

Cd (mg/L)	Longitud media ( $\mu\text{m}$ )
1	394,88
2	383,68
4	344,4
8	265,68
16	/

Para poder analizar los datos en referencia a sus condiciones iniciales, se ha calculado las medias de la longitud de las larvas respecto al tamaño medio de los blancos en la tabla 22. Los datos completos se encuentran en el Anexo I.

Tabla 22. Media de las variaciones de la longitud de las larvas respecto a la media del blanco.

Elutriado (%)	Zona Control	Puerto Gandía	P. recreativo Gandía	Puerto Perelló	Puerto Oliva	Puerto Denia
0	100,01	99,99	99,99	100	100,01	99,98
13	102,54	97,76	100,12	91,3	90,7	98,96
25	96,22	91,96	92,58	89,1	87,86	93,84
50	87,62	88,62	87,28	80,9	79,3	90,62
100	86,58	81,62	83,62	73,1	71,7	83,3

Y en las ilustraciones 11, 12, 13, 14, 15 Y 16 se muestran los gráficos de la tabla 22 de manera individual para cada muestra y para el tóxico de referencia (ilustración 17).

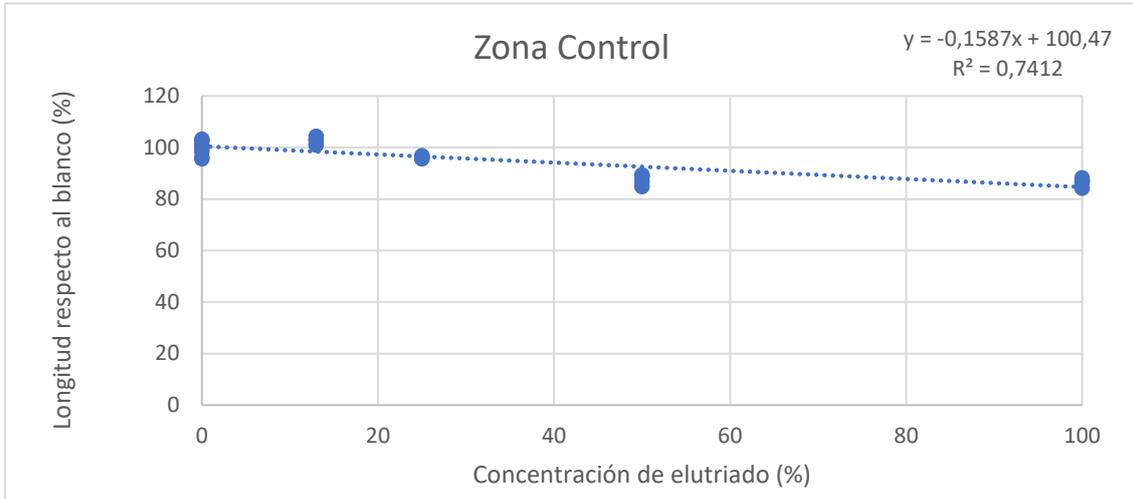


Ilustración 11. Evolución de la longitud de las larvas en la zona control según la concentración de elutriado.

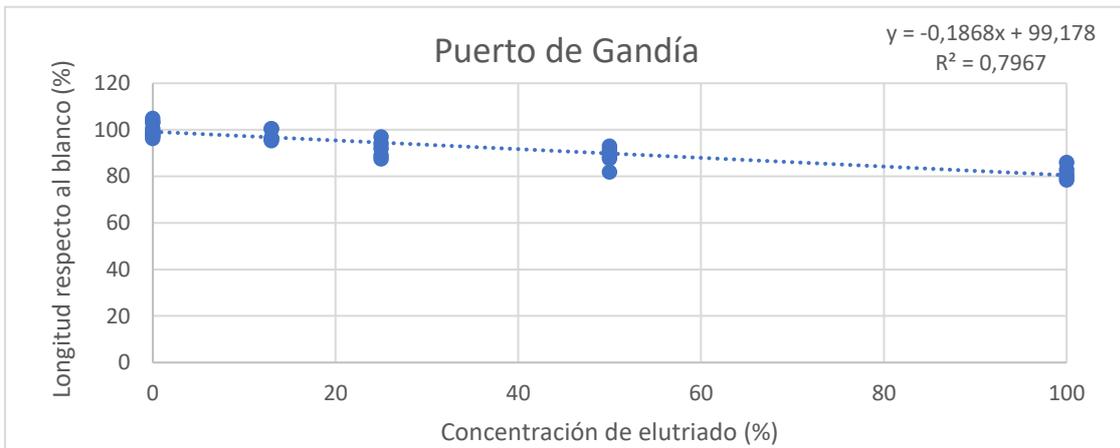
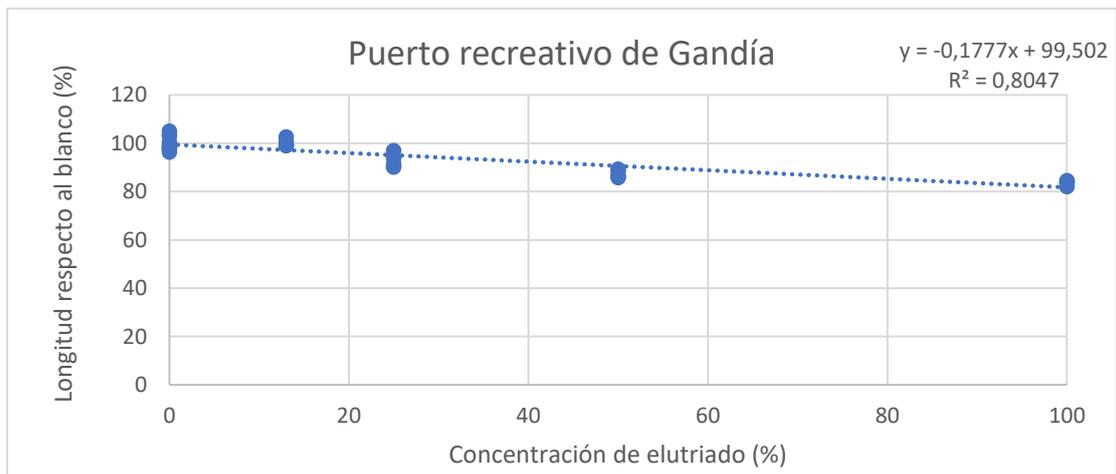


Ilustración 12. Evolución de la longitud de las larvas en el Puerto de Gandía según la concentración de elutriado.



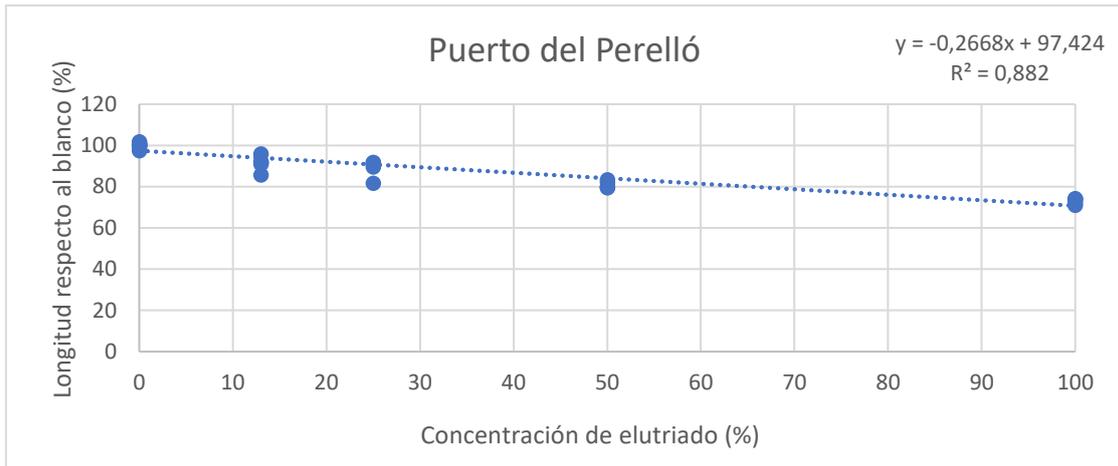


Ilustración 14. Evolución de la longitud de las larvas en el Puerto del Perelló según la concentración de elutriado.

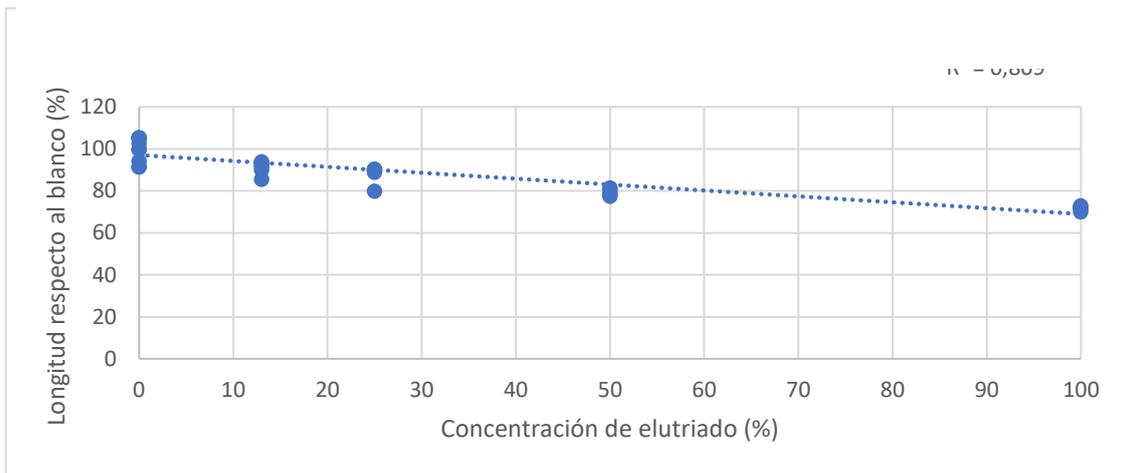


Ilustración 15. Evolución de la longitud de las larvas en el Puerto de Oliva según la concentración de elutriado.

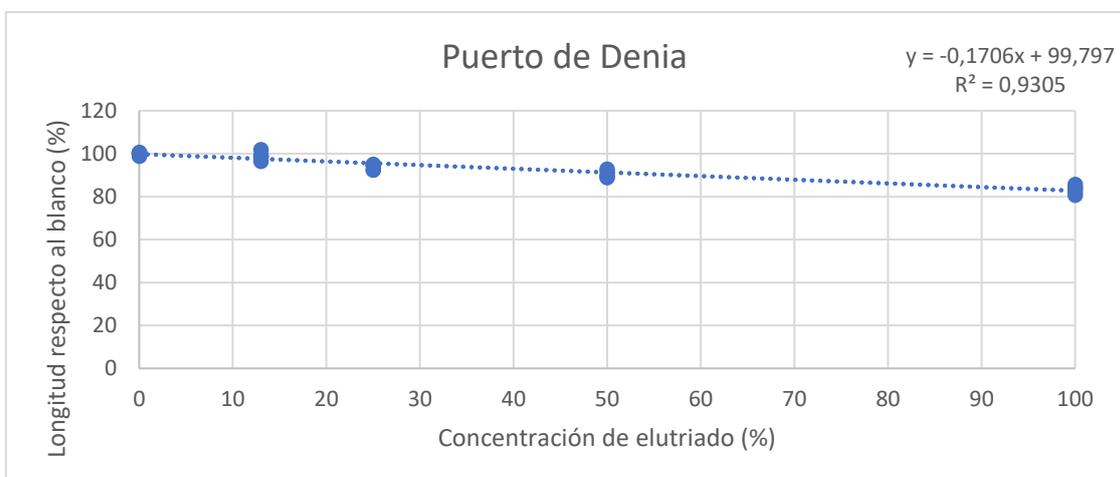


Ilustración 16. Evolución de la longitud de las larvas en el Puerto de Denia según la concentración de elutriado.

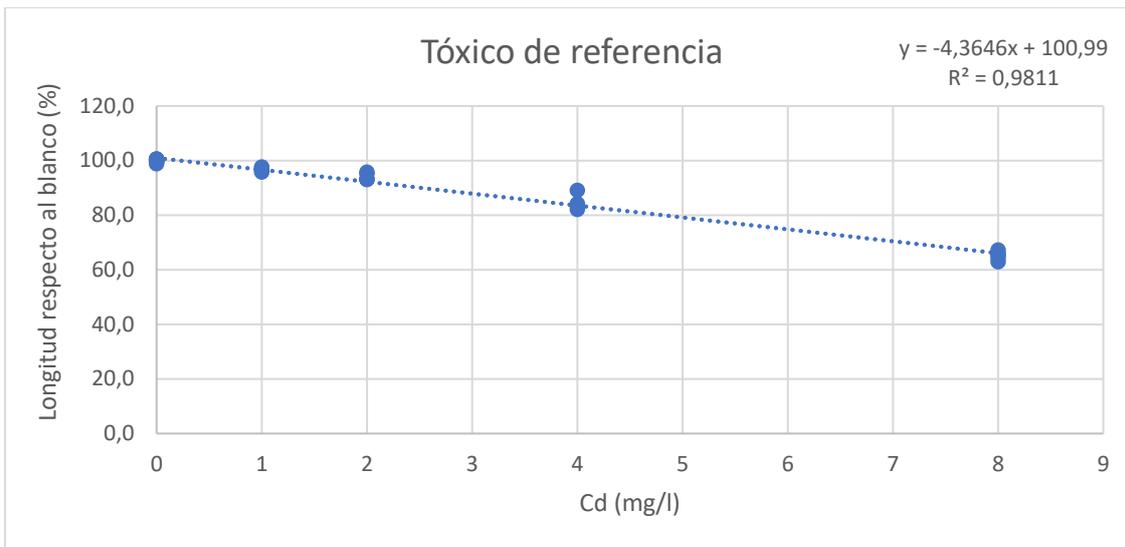


Ilustración 17. Longitud (%) de los erizos respecto al blanco en distintas concentraciones del tóxico de referencia.

### CE<sub>5</sub>, CE<sub>10</sub>, CE<sub>50</sub>

A partir de las ecuaciones obtenidas para cada muestra (ilustraciones 10-16) se han calculado las concentraciones que provocarían disminuciones del 5%, 10% y 50% del tamaño de las larvas teniendo como referencia la media del blanco (tabla 23).

Tabla 23. Datos de las concentraciones efectivas 5, 10 y 50 de los bioensayos de elutriado.

	CE 5 (%)	CE 10 (%)	CE 50 (%)
Zona Control	34	66	318*
P. Gandía	22	49	263*
P. R. Gandía	25	53	279*
P. Perelló	10	29	179*
P. Oliva	7	25	167*
P. Denia	28	57	292*
*Valores fuera del rango lógico			

Los valores de concentraciones efectivas del 5%, 10% y 50% del tóxico de referencia se pueden ver en la tabla 24.

Tabla 24. Concentraciones efectivas del cadmio sobre las larvas.

	Cd (mg/l)
CE 5	1,372
CE 10	2,518
CE 50	11,683 *
*Valores fuera del rango lógico	

## NOEC y LOEC

Para calcular la dosis mínima que produce una diferencia significativa en el tamaño de las larvas respecto al blanco (LOEC), y la máxima que significativamente no tiene efecto sobre el tamaño de las larvas respecto al blanco (NOEC), se analizarán la medida de los blancos con el resto de las concentraciones de la tabla 22.

La primera opción para validar los datos es mediante el análisis paramétrico que nos proporciona Statgraphics mediante la herramienta "ANOVA simple", utilizando el tamaño en el formato porcentaje corregido con la media del blanco. Al ejecutar el programa se responde si hay una diferencia significativa entre los resultados al analizar el P-valor, y por otro lado si la distribución de los datos es normal, y si los datos presentan homocedasticidad. Esta información está resumida en la tabla 25.

Tabla 25. Resumen del análisis "ANOVA simple" en los bioensayos con elutriado.

	Diferencia significativa	Distribución Normal	Homocedasticidad
Zona Control	Sí	Sí	Sí
P. Gandía	Sí	Sí	Sí
P. R. Gandía	Sí	Sí	Sí
P. Perelló	Sí	Sí	Sí
P. Oliva	Sí	No	No
P. Denia	Sí	Sí	Sí

Debido a que el puerto de Oliva no cumplió con los requisitos para ser analizado mediante un análisis paramétrico se utilizará el gráfico de Caja y Bigotes de la ilustración 18 obtenido del test de Kruskal-Wallis en el Statgraphics.

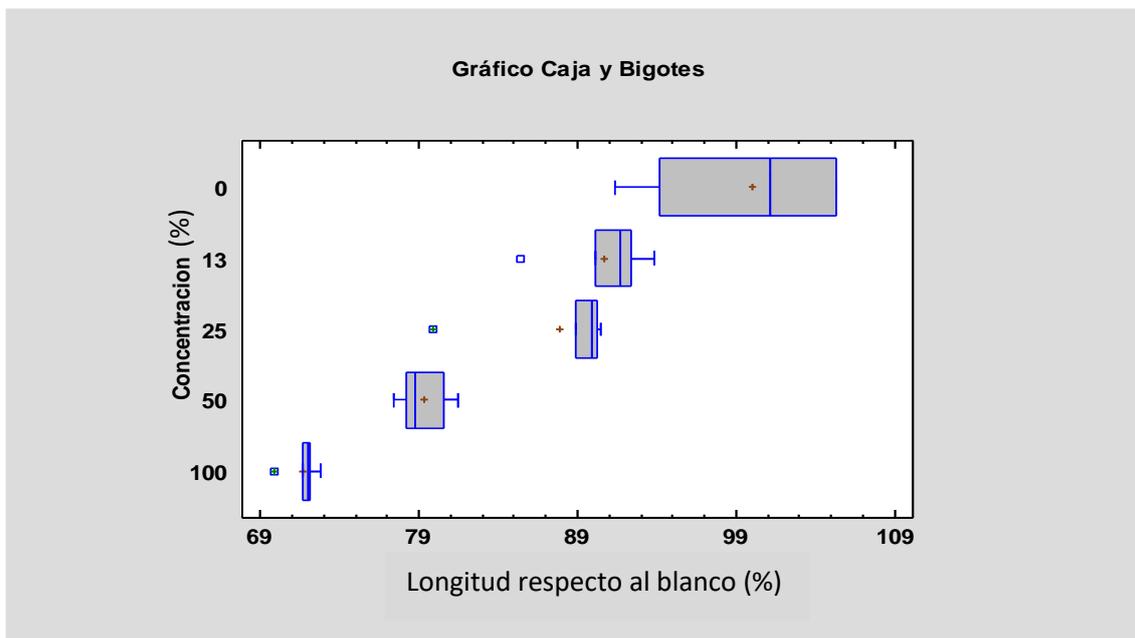


Ilustración 18. Gráfico Caja y Bigotes del Puerto de oliva que analiza si existen diferencias significativas en el tamaño de las larvas entre los rangos de concentraciones.

Por último, respecto al análisis de los bioensayos con elutriado, se puede observar en la tabla 26 las concentraciones experimentales a las que se manifiesta el NOEC y LOEC.

Tabla 26. Concentraciones a las que se encuentra el NOEC y el LOEC en los distintos bioensayos con elutriado.

	NOEC (%)	LOEC (%)
Zona Control	13	25
P. Gandía	13	25
P. R. Gandía	13	25
P. Perelló	-	13
P. Oliva	-	13
P. Denia	13	25

El análisis realizado en este caso fue el no paramétrico, ya que ni había normalidad ni se verificó la homocedasticidad, por lo que se estudió la concentración NOEC y la LOEC según el gráfico de caja y bigotes de la ilustración 19.

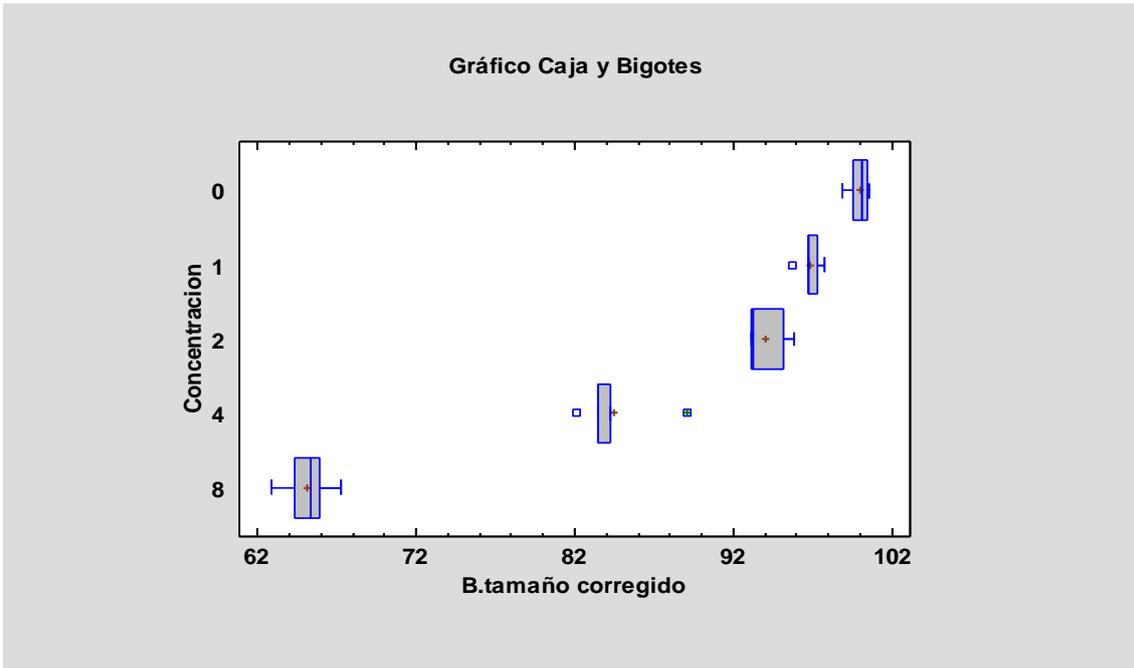


Ilustración 19. Gráfico resultante del test no paramétrico de Kruskal-Wallis mediante el software Statgraphics.

Respecto a las concentraciones del NOEC y el LOEC del tóxico de referencia se pueden observar en la tabla 27.

Tabla 27. NOEC Y LOEC del tóxico de referencia.

	Concentración (mg/L)
NOEC	-
LOEC	1

## DISCUSIÓN

En primer lugar, gracias al cálculo de la  $CL_{50}$  de la tabla 22, se puede comparar los resultados experimentales con otros valores bibliográficos que utilicen el mismo tóxico de referencia. Comprobando que el método de trabajo es el adecuado y puede compararse con otros estudios. En este caso como se puede ver en (Garmendia et al., 2009) los valores de otros bioensayos son de 9,240 mg/L de Fernández y Beiras en el 2001, y del rango 8,456-9,135 mg/L de Fernández en el 2002.

Como se puede ver en la tabla 14 se obtuvo al menos un 90% de fecundación en las larvas tras los primeros minutos del proceso, por lo que se decidió continuar en todos los casos, aunque cabe destacar que durante la experimentación no siempre se consiguió, por lo que se debió repetir el proceso. Respecto a la cantidad de volumen de material reproductivo a réplica de la tabla 16 se puede ver como coinciden la del puerto de Gandía con el del puerto recreativo de Gandía, y la del puerto del Perelló con la del puerto de Oliva, esto se debe a que estos bioensayos se hicieron al mismo tiempo, con los mismos erizos, por lo que comparten tanto estos datos como la información sobre los blancos.

En referencia a la mortalidad observada en los bioensayos con elutriado (los de los puertos y la zona control) de la tabla 16 se puede ver como esta es baja. Sin llegar a afectar gravemente en las poblaciones de las larvas. En un principio se habían realizado diluciones del elutriado al 13%, 25% y 50% esperando un efecto mayor sobre las larvas. Al no ocurrir se comentarán los resultados de la muestra sin diluir.

Por un lado, la muestra control presenta una mortalidad muy baja; la más baja en concreto, por lo que se puede confiar en que la zona control ha sido elegida correctamente. Por otro lado, en todos los puertos menos en el del Perelló y Oliva la mortalidad está próxima al 10%, y hay que recordar que este era el requisito para que un blanco fuese válido, ya que estos valores se pueden alcanzar debido a diferentes causas no asignadas a los posibles tóxicos de los sedimentos. Así que, el elutriado de estos puertos no difiere mucho de lo que se considera un blanco; al menos en este aspecto. Respecto a los puertos de Oliva y del Perelló se puede ver un efecto un poco mayor. Por este motivo se decidió estudiar si era una diferencia significativa mediante la aplicación de la herramienta "ANOVA simple", observando la ilustración 10 se puede ver como efectivamente existe una diferencia significativa entre la mortalidad de los puertos de Oliva y de el Perelló con la mortalidad del control.

Respecto a las longitudes de las larvas cabe destacar que se profundizó su análisis debido a que la mortalidad de la embriogénesis fue muy pequeña. En segundo lugar, denotar que no solo han ido disminuyendo a medida que se aumentaba la concentración del elutriado de los puertos, si no que también ha sucedido; aunque con menor gradiente, en la zona control. De esta manera no solo se le asigna como causante de la disminución del tamaño de las larvas al sedimento en general, sino que el sedimento de los puertos estudiados posee ciertos elementos que disminuyen en mayor medida el desarrollo larvario, tal como se puede ver en la tabla 23 al ver las concentraciones efectiva sobre la longitud de las larvas, sobre todo la CE<sub>5</sub> y la CE<sub>10</sub>; debido a que la CE<sub>50</sub> no tendría sentido ya que haría falta un elutriado concentrado a más de su 100%. Es importante saber que en la interpretación de estos datos el sedimento más contaminado es el que con una menor concentración produce el mismo efecto negativo que el resto. Por tanto, continuando con los datos que muestra la tabla 23, los puertos quedarían ordenados de mayor toxicidad a menor en el siguiente orden: Puerto de Oliva, Puerto del Perelló, Puerto de Gandía, Puerto recreativo de Gandía y el Puerto de Denia. Para que este análisis no fuese influenciado por haberse obtenido los datos en fecundaciones distintas, no se ha comparado el tamaño de las larvas en bruto, sino el cambio que han sufrido respecto a sus blancos como se puede ver en la tabla 22.

Por otro lado, respecto la dosis mínima que produce una diferencia significativa en el tamaño de las larvas respecto al blanco (LOEC), y la máxima que significativamente no tiene efecto sobre el tamaño de las larvas respecto al blanco (NOEC), primero se tuvo que comprobar que existía esa diferencia significativa mediante el análisis en Statgraphics (tabla 25). Tras esa evidente comprobación se detectó la NOEC en la concentración experimental más baja (13%) y la LOEC en la segunda más baja (25%), excepto en los puertos del Perelló y de Oliva, en los cuales la NOEC presenta un valor más pequeño que los reproducidos experimentalmente, por lo que no se puede saber el dato, y la LOEC en estos puertos es del 13%. Con estos datos en mano se puede decir que las larvas serán afectadas por la toxicidad en todos los puertos, y que el rango en que comenzarán a ser afectadas las larvas se encuentra entre el valor de la NOEC y la LOEC en cada caso.

Se ha demostrado como los sedimentos portuarios del Perelló y Oliva son más tóxicos que el resto, una posible causa puede ser la densidad de embarcaciones de los puertos (tabla 28).

Tabla 28. Datos de densidad (embarcaciones/100m<sup>3</sup>) de los puertos muestreados.

Puerto	Volumen (m <sup>3</sup> )	Embarcaciones	Densidad (embarcaciones/100m <sup>3</sup> )
P. Gandía	1531025	47	0,003
P. R. Gandía	130035	301	0,231
P. Perelló	52360	186	0,355
P. Oliva	69398	423	0,610
P. Denia	3000335	1087	0,036

Como se puede ver, el puerto con mayor densidad de embarcaciones coincide con el puerto más tóxico, pudiendo ser este mismo el motivo de la propia toxicidad. Por otro lado, a pesar de que el puerto del Perelló sea prácticamente el segundo más denso, al coincidir con el puerto de Denia en los valores de densidad, por lo que no se justifica el motivo de su toxicidad. Cabe destacar que, el puerto del Perelló, según el diario Las Provincias, recibe restos de sedimentos procedentes de la Albufera, estos hechos, junto con la alta densidad de embarcaciones, pueden ser los posibles causantes de la toxicidad de los sedimentos de este puerto (Aguadé, 2011).

## 5. CONCLUSIÓN

- Con respecto a la embriogénesis, solo se ha podido determinar como toxico de manera significativa los puertos de Oliva y del Perelló.
- Todos los puertos han mostrado diferencias significativas respecto sus blancos en la longitud larvaria.
- En los puertos de Oliva y el Perelló el elutriado afectó significativamente al desarrollo larvario con menos del 13% de concentración.
- En los puertos de Gandía y Denia se necesita una concentración de elutriado entre 13%-25% para que afecte significativamente al crecimiento de las larvas.
- El sedimento más tóxico pertenece al puerto con mayor densidad de embarcaciones.
- El segundo sedimento más tóxico aparte de tener una alta densidad de embarcaciones también percibe descargas de sedimento provenientes de la Albufera.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguadé, J. (2011). La nueva junta del Náutico del Perelló reclama que les arreglen la bocana. Obtenido del diario "Las Provincias." [5/09/2021]  
<https://www.lasprovincias.es/v/20110613/valencia/nueva-junta-nautico-perello-20110613.html>
- Anèl.lides. (2016). Anèl.lides serveis ambientals marins. Obtenido de la página web Anellides [16/08/2021]  
<https://anellides.com/es/blog/quina-es-limportancia-dels-oceans/>
- Autoridad portuaria de Valencia. (2020). Propuesta de delimitación de los espacios y usos portuarios (DEUP) del puerto de Gandía. Obtenido de la página web valenciaport [27/08/2021]  
<https://www.valenciaport.com/wp-content/uploads/Propuesta-DEUP-Puerto-Gandia-dic-2020.pdf>
- Conselleria de Política Territorial, Obras Públicas y Movilidad. (2019). Listado de puertos de la Generalitat Valenciana. Obtenido de la página web de política territorial de la gva. [27/08/2021]  
<https://politicaterritorial.gva.es/es/web/puertos/puertos-cv/puertos-gv-p>
- Fernández, N. (2002). Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones de mar *Paracentrotus lividus*.
- Garmendia, J. M., Menchaca, I., Belzunce, M. J., & Revilla, M. I. (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Obtenido de la Revista de Investigación marina.
- González Lozano, M. C. (2007). Evaluación de la toxicidad de sedimentos de cuerpos acuáticos receptores de PEMEX-refinación en Salina Cruz, Oaxaca. Obtenido del Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste.
- González Lozano, M. C., Méndez Rodríguez, L. C., López Veneroni, D. G., & Vázquez Botello, A. (2006). Evaluación de la toxicidad de sedimentos de cuerpos acuáticos receptores de PEMEX-refinación en Salina Cruz, Oaxaca. Obtenido del Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste.
- Google Maps. (2021). Obtenido de Google [14/08/2021]  
<https://www.google.es/maps/?hl=es>
- Herrero Barrencia, A. (2008). Aspectos reproductivos del erizo común ("*Paracentrotus lividus*") en aguas del Este de Gran Canaria. Obtenido de ULPGC.
- Ibárcena, L. W. (2011). Estudio de la Contaminación por Metales Ecotóxicos en Sedimentos en la Bahía de Ite. Obtenido de la revista Ciencia & Desarrollo.

- Landaeta, C. (1995). Potenciales impactos ambientales generados por el dragado y la descarga del material dragado.  
Obtenido del Instituto Nacional de Canalizaciones
- Leticia Peluso, M. (2011). Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes.  
Obtenido de la UNLP
- Olave Seguel, C. E. (2019). Estudio de adsorción de plaguicidas en sedimentos fluviales y optimización de técnicas de recuperación.  
Obtenido de la Universidad de Chile
- Organización Marítima Internacional. (1999). (TBT), sustancia tóxica hormonal, en las pinturas para barcos.  
Obtenido de la respuesta del Sr. Bangemann en las preguntas parlamentarias del Parlamento europeo.
- Ramos, C., & Luciano, F. (1998). Bioacumulación en moluscos gasteropodos marinos por arsénico, cadmio, cobre, mercurio y plomo en el área natural protegida punta coles, Ilo-Moquegua.  
Obtenido de la UNSA
- Ratto, S. E., Pierini, V., Vanier, M., & Giuffré, L. (2010). Bioensayos de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* en sedimentos contaminados del río Reconquista en disposición final.  
Obtenido de la revista de la Facultad de Agronomía de la UBA
- Rodríguez, M. (2003). Evaluación del grado de contaminación de sedimentos marinos afectados por vertidos antropogénicos. Aplicación de estudios termogravimétricos.  
Obtenido de la Universidad de Cádiz
- Rudolph, A., Aguirre, G., & Loyola, R. (2009). Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos.  
Obtenido de la Revista de biología marina y oceanografía.
- Segovia Martínez, L. (2014). Contribución al estudio de contaminantes orgánicos en el litoral de la Comunidad Valenciana.  
Obtenido de la Universidad de Valencia
- Vila, L. (2007). Contaminación accidental y operacional con hidrocarburos y materiales peligrosos en los puertos – planes de contingencia.  
Obtenido de la Universidad de Cantabria