

A close-up, high-contrast portrait of a person's face, focusing on the eyes and nose. The person has light skin and blue eyes. The lighting is dramatic, with the right side of the face (viewer's left) in shadow.

INVESTIGACION

CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA

VOLUMEN 9

Nº 18

2017

MEDICINA FISICA.FARMACOLOGIA.BIOLOGIA.PSIQUIATRIA.BIOLOGIA MARINA.EMPRESA.DERECHO ECONOMIA.BELLAS ARTES

INVESTIGACION

CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA

VOLUMEN 9 Nº 18 2017

Director
José Luis Vázquez López

Consejo de Redacción
Francisco Javier Rodríguez Berrocal
Almudena Fernández Biera
José Luis Vázquez López

Dirección Creativa
María del Mar Vázquez Jiménez
mariadelmarvj@gmail.com

Dep. Administración y Divulgación
Raquel María Vázquez

Revista adscrita al
INSTITUTO DE CULTURA,
CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(ICCT)

www.institutociencia.es

ISSN: 1889 - 4399
DEPÓSITO LEGAL:
VG - 347 - 2009
C./ Oporto, 1, 3º
36201 Vigo

Patrocina



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE ECONOMÍA,
EMPREGO E INDUSTRIA



INSTITUTO CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA

Queda prohibida la reproducción total o parcial de cualquiera de los contenidos de esta publicación, sin citar la procedencia. La revista "Investigación" no se hace responsable, ni se identifica con artículos, ni opiniones que publican sus autores y colaboradores.

LOS INVESTIGADORES DE INSTITUCIONES, EMPRESAS, LABORATORIOS Y UNIVERSIDADES INTERESADOS EN REMITIR ARTÍCULOS, PREVIAMENTE DEBERÁN CONTACTAR CON NUESTRO DEPARTAMENTO DE REDACCIÓN PARA RECIBIR LAS NORMAS DE ENVÍO:

investigacion@galicia.com



índice

SUMARIO

VOLUMEN 9 Nº 18 2017

- 6** Editorial
E L INSTITUTO ESPAÑOL DE OCEANOGRAFÍA (IEO)
M^a Victoria Besada Montenegro
Directora Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía.
- 8** Ecología y Biodiversidad Marina
E L CABALLITO DE MAR NARIZÓN, HIPPOCAMPUS GUTTULATUS, UN SÍMBOLO A PROTEGER
Andreu Blanco
Departamento de Ecología y Biología Animal. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Vigo.
- 13** Edafología
R ECUPERACIÓN DE SUELOS DE MINA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TECNOSOL Y BIOCHAR COMBINADOS CON *Brassica juncea* L.
Rubén Forján, Alfonso Rodríguez-Vila, Beatriz Cerqueira, Emma F. Covelo
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo. Universidad de Vigo.
- 24** Sanidad Animal
R PARASITISMOS Y PARASITOSIS INTESTINALES EN ANIMALES DEL PARQUE ZOOLOGICO: ESTUDIO COMPARATIVO 1994/2017
Iago Dacruz Pérez¹, Antonio Acuña Rodríguez², María Cristina Arias Fernández¹, Alejandro Pamies Castellanos¹.
1 Laboratorio Parasitología. Departamento Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo.
2 Director Veterinario del Parque Zoológico de A Madroa, Vigo-Zoo
- 30** Ecología. Patrimonio Natural Islas Cíes.
I SLAS CIES, PATRIMONIO NATURAL. INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN OCEÁNICA EN LA ECOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS SÉSILES DEL INTERNACIONAL ROCOSO: PATRONES ESPACIALES QUE DEFINEN LOS LÍMITES DE LA ZONACIÓN VERTICAL
Jesús Souza Troncoso¹, Jeffrey A. Sibaja-Cordero².
1 Catedrático de Zoología. Director del Centro Singular Marino Universidad de Vigo-ECIMAT
2 Profesor Titular de Zoología. Universidad de Costa Rica

41 **O** **Marcaje citoquímico**
OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE DOBLE TINCIÓN PARA LA DEMOSTRACIÓN SIMULTÁNEA DE ASTROCITOS Y MICROLOGÍA EN BULBO OLFATIVO
Ana Ardid de Cabo, Pilar Molist García
Área de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

47 **E** **Proyecto Selatun**
VALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD Y LA BIOACCESIBILIDAD DEL COMPLEJO SELENIO-MERCURIO EN EL MUSCULO DEL ATÚN. POSIBLES EFECTOS CITOTÓXICOS DEL CONSUMO SOBRE LINEAS CELULARES CANCERÍGENAS IN VITRO
J. Lago, M. Atanassova, A. G. Cabado, J. M. Vieites
Área de I+D+i ANFACO-CECOPECA

55 **T** **Satélites-Teledetección**
TELEDETECCIÓN DE INCENDIOS FORESTALES CON SATÉLITES; MAPEADO ACTIVO Y GESTIÓN
Castro Miguel¹, Pérez Franco², Aguado Fernando², Yáñez Pablo¹.
Universidade de Vigo, Campus Universitario Lagoas Marcosende
1 Departamento de Ingeniería Mecánica
2 Departamento de Teoría de la Señal y Comunicaciones

59 **U** **Investigaciones Marinas**
UTILIZACIÓN DE UN EXTRACTO LIPÓFILO DE PIEL DE CALAMAR GIGANTE (DOSIDICUS GIGAS) COMO FUENTE DE COMPONENTES CONSERVANTES DURANTE LA COMERCIALIZACIÓN DE ESPECIES MARINAS
Josafat Marina Ezquerro-Brauer, Jesús E. Chan-Higuera, Wilfrido Torres-Arreola¹, José M. Miranda, Jorge Barros-Velázquez², Santiago P. Aubourg³.
1 Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora (Hermosillo, Sonora, México)
2 Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Escuela Ciencias Veterinarias. Universidad de Santiago de Compostela (Lugo- España)
3 Departamento de Tecnología de Alimentos. Instituto de Investigaciones Marinas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) - (Vigo, España)

65 **I** **Superconductividad**
INTERACCIÓN ENTRE DOS ANILLOS DE YBaCuO. SUPERCONDUCTORES CON CORRIENTES I_a e I_b
G. Briones Galán, G. Domarco, L. Romani
Departamento de Física Aplicada. Campus Ourense. Universidad de Vigo..

70 **E** **Noticias**
PAÑA FORMARÁ PARTE DEL COMITÉ EJECUTIVO DE LA COMISIÓN OCEANOGRÁFICA INTERGUBERNAMENTAL DE LA UNESCO

editorial

EL INSTITUTO ESPAÑOL DE OCENOGRAFÍA

El Instituto Español de Oceanografía (IEO), es un Organismo Público de Investigación con dos funciones principales. Por un lado, desarrolla investigación básica y aplicada en numerosos proyectos de investigación relacionados con el medio marino. Por otro, es responsable de ofrecer asesoramiento científico, imparcial y riguroso, a las diferentes Administraciones Públicas basado en datos científicos. Para poder llevar a cabo estas funciones, es necesaria una comprensión holística del funcionamiento físico, químico y biológico de los ecosistemas marinos al objeto de poder interpretar y asesorar sobre el impacto que ejercemos sobre ellos. Los informes de asesoramiento científico del IEO proporcionan recomendaciones que pueden mejorar las decisiones de los gestores sobre el uso más adecuado de los recursos marinos vivos y los ecosistemas.

El establecimiento del Centro Oceanográfico de Vigo del IEO, el 2 de septiembre de 1917, fue debido a la crisis de la sardina de los primeros años del siglo XX que tuvo una enorme repercusión social en las Rías gallegas, provocando una gran preocupación en el sector pesquero y en la sociedad. Cien años después, nos encontramos con un escenario similar, en el que la escasez de sardina vuelve a causar inquietud en el sector. Sin embargo, en la actualidad, la forma de abordar estos estudios ha evolucionado hasta un enfoque multidisciplinar, trabajando en el marco del Ecosistema y teniendo en cuenta las especies acompañantes en la cadena trófica, el medio físico en el que se desarrollan y todas las actividades que les afectan, como puede ser la pesca u otro tipo de explotaciones.

El trabajo realizado por el Centro Oceanográfico de Vigo, en este siglo de existencia, ha estado enfocado al servicio de la sociedad y del tejido productivo de su entorno, afrontando grandes retos de investigación, desarrollo y consejo científico dirigidos a dar respuesta a los requerimientos y desafíos sectoriales en materia de medio ambiente, pesca, acuicultura y calidad de los productos alimenticios de origen marino.

El reconocimiento a la gran labor de investigación realizada por el Centro de Vigo para incrementar el conocimiento científico de los océanos, la sostenibilidad de los recursos pesqueros, el desarrollo de los cultivos marinos y el respeto y protección del medio ambiente marino así como el importante trabajo de formación de investigadores y técnicos sobre el medio marino y en la divulgación y comunicación científica de los resultados de sus estudios está siendo reconocido, este año 2017, tanto a

nivel local como regional. El 27 de marzo el Concello de Vigo le ha concedido la *Medalla de Oro de la ciudad* y el 28 de junio ha recibido la *Medalla Castelao*, el máximo reconocimiento que otorga la Xunta de Galicia para reconocer el trabajo de la sociedad civil.

Estos galardones concedidos al Centro Oceanográfico de Vigo y que provocan una enorme satisfacción y orgullo a todo su personal, reflejan la puesta en valor del servicio del IEO a la sociedad a través de una labor científica realizada de una manera seria y responsable. Por ello, toda la investigación marina está de enhorabuena, pues se reconoce el papel fundamental del avance en el conocimiento en el campo de las ciencias marinas en nuestro país, donde el impulso a la investigación debería ser una prioridad para el Gobierno.

Es importante destacar que el Instituto Español de Oceanografía y el Instituto de Cultura, Ciencia y Tecnología tienen como objetivo común, entre otros, apoyar y favorecer la comunicación y divulgación científica concienciando a la sociedad de la importancia de las ciencias marinas y de la necesidad de velar por la salud del Ecosistema Marino y la explotación sostenible de sus recursos. Para alcanzar esta meta es imprescindible potenciar la difusión de los conocimientos adquiridos en los numerosos proyectos de investigación realizados por las Instituciones que trabajan en este ámbito del conocimiento. La transferencia de los resultados es una deuda contraída con la sociedad, ya que sin ciencia no hay futuro en nuestros mares y sin divulgación la ciencia carece de sentido.

M^a Victoria Besada Montenegro

Directora Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía (IEO)

EL CABALLITO DE MAR NARIZÓN, HIPPOCAMPUS GUTTULATUS, UN SÍMBOLO A PROTEGER.

Andreu Blanco

Departamento de Ecología y Biología Animal, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Vigo, España

INTRODUCCIÓN

Los caballitos de mar pertenecen al género *Hippocampus*; este nombre proviene del griego *Hippokampos* (*Hippos-* y *-kampos*) que literalmente significa caballo-monstruo. Los "*Hippokampos*" (caballos con cola de pez) pertenecen a un antiguo grupo de animales mitológicos entre los que podemos encontrar, además de los caballitos de mar, a los "*Leokampos*" (leones con cola de pez), "*Taurokampos*" (toros con cola de pez), "*Pardalokampos*" (leopardos con cola de pez), o los "*Aigikampos*" (cabra con cola de pez). Todos ellos comparten la característica común de poseer la parte anterior del cuerpo de algún animal de origen terrestre y una cola serpentina de pez como parte posterior. Además, de acuerdo con esta definición, cabe resaltar la figura de "*Satyroi*", o más conocidas como sirenas. Desde su descripción por los antiguos griegos, los caballitos de mar se han convertido en símbolo de muchas culturas y se han descrito y representado tanto en la literatura como en una gran variedad de objetos: presentes en los poemas de Homero como los caballos del carro de Poseidón, iconografías de broches y monedas datados entre los siglos IV y VI (Waxman, 2008; IAA, 1981), y ya en la actualidad en multitud de reclamos publicitarios, sellos, dibujos y un gran abanico de representaciones y símbolos.

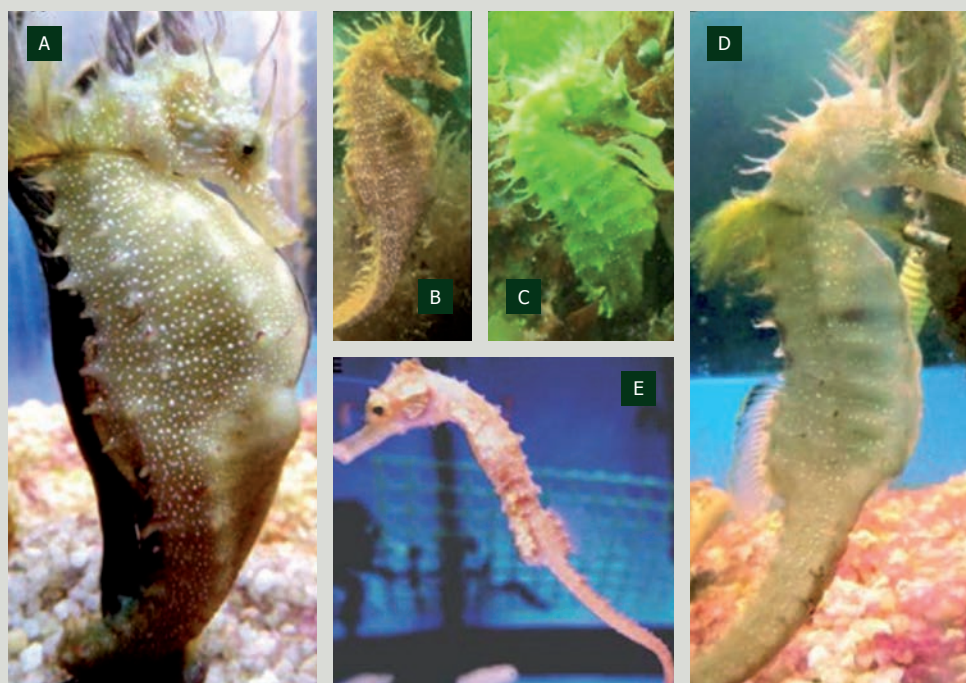
A pesar de su alto valor cultural (Figura 1), las poblaciones salvajes de caballitos de mar se encuentran mundialmente amenazadas por diversos factores, incluyendo la pérdida de hábitat, la captura accidental asociada a determinadas artes de pesca, y la presión pesquera sobre estas poblaciones para la Medicina Tradicional China o su comercio para la acuariofilia y souvenirs. Por ello, en 1988, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) incluyó la primera especie de caballito de mar (*Hippocampus capensis*) en la Lista Roja de Especies en Peligro (IUCN, 2014). Más adelante,

en 1996, después de los hallazgos derivados de uno de los trabajos de referencia sobre el estado de las poblaciones naturales de caballitos de mar a nivel mundial (Vincent, 1996) y debido a la gran variabilidad en la resiliencia de las diferentes especies y a la disminución generalizada de sus poblaciones naturales, todas las especies de *Hippocampus* se incluyeron en dicho listado. De este modo, un 88% de las especies se incluyó en la lista como 'Vulnerable' y el resto como 'Datosinsuficientes' (IUCN, 2014). Desde entonces y tras varias revisiones del listado, en 2012, diez especies se catalogaron como 'Vulnerable', 26 especies como 'Datosinsuficientes', una de ellas como 'En peligro' y una como 'Fuera de peligro'. Además, la Convención sobre Comercio Internacional de Especies en Peligro (CITES, de sus siglas en inglés) ampara todas las especies de caballitos de mar en el Apéndice II, por lo que aun pudiéndose comerciar con ellas, los países firmantes deben preservar sus poblaciones naturales (CITES, 2002).

MEDIDAS DE CONSERVACIÓN: EL CULTIVO

La aplicación de medidas de conservación, como la cría en cautividad, es necesaria como solución potencial para garantizar el bienestar y la recuperación de las poblaciones naturales (Figura 2). Uno de los mayores problemas en el cultivo de caballitos de mar ha sido que tradicionalmente dependía de la captura de machos preñados para la obtención de camadas viables (Wilson and Vincent, 2000). Como resultado, las poblaciones naturales se han visto mermadas en lugar de verse favorecidas a través de la producción de juveniles como resultado de estos cultivos (Tlustý, 2002), no solo evitando las capturas de animales salvajes para su comercio sino produciendo una fuente viable de potenciales repobladores. Una producción eficaz de caballitos de mar debería desarrollar protocolos y técnicas sencillos que

Figura 1. *Hippocampusguttulatus* en cautividad (A, D, E) y en medio natural (B and C). Machos (A y B), Hembras (C y D) y juvenil (E).



ofreciesen un comercio viable y estable, que asegurase los objetivos de conservación y que, a la vez, proporcionase un estilo de vida alternativo para los pescadores que obtienen su sustento de su pesca en medio natural (Vincent, 1996). Los caballitos de mar pertenecen a la familia *Syngnathidae*, palabra greco-latina que significa mandíbula (*-gnathos*) junta (*syn-*), y como tal poseen una estrategia de alimentación común, la succión, por la cual una expansión bucofaringea produce una corriente de agua que arrastra a las presas y evita que escapen (Roos *et al.*, 2010). Además, tienen un conducto intestinal simple sin estómago (Wardley, 2006) y por lo tanto una capacidad digestiva limitada y altamente dependiente de los enzimas digestivos (Figura 3). La escasa actividad quitinolítica de algunas especies de caballitos de mar explica la escasa digestibilidad de algunas presas, especialmente aquellas que presenten exoesqueletos gruesos y acorazados como, por ejemplo, los nauplios de *Artemia*, pudiendo aparecer nauplios vivos en las heces de los juveniles de estas especies de caballito de mar (Blanco *et al.*, 2015). De hecho, la alimentación y los requisitos nutricionales de los caballitos de mar son uno de los mayores problemas para su cultivo (Koldewey and Martin-Smith, 2011). Los juveniles, desde recién nacidos, son depredadores voraces que capturan sus presas activa y selectivamente (Blanco and Planas, 2015). El uso de copépodos en su cultivo ha demostrado grandes



Figura 2. Macho de caballito de mar, *Hippocampusguttulatus*, preñado un día antes del parto.

TABLA1. PRECIO DE MERCADO DE DIFERENTES ESPECIES DE CABALLITOS DE MAR POR MORFOTIPO Y PAÍS DE VENTA.

ESPECIE Y VARIEDAD	PRECIO	VENDEDOR	FUENTE
Hippocampus erectus var Red Fire	332 €	USA	www.seahorse.com
Hippocampus erectus var Pintos	332 €	USA	www.seahorse.com
Hippocampus whitei	332 €	USA	www.seahorsecorral.com
Hippocampus reidivar Leopard	112 €	Spain	www.tiendadecaballitos.com
Hippocampus guttulatus juvenile	65 €	Spain	www.tiendadecaballitos.com
Australian Hippocampus kuda	74 €	USA	www.liveaquaria.com
Yellow Hippocampus kuda	65 €	UK	www.aquaticstoyourdoor.uk



Figura 3. Aparato mandibular de un juvenil de caballito de mar, Hippocampus guttulatus, de 20 días de edad.

beneficios en el cultivo de juveniles incrementando su supe os factores esenciales en la modulación de una gran cantidad de procesos biológicos y fisiológicos. Además, es un factor determinante en el crecimiento y supervivencia de varias especies de caballitos de mar; el rango térmico en el cultivo de caballitos de mar es muy amplio y puede variar desde los 10 a los 28°C (Martínez-Cárdenas and Purser, 2012; Wong and Benzie, 2003; Lin *et al.*, 2010; Planas *et al.* 2012).

Otro de los factores importantes en el cultivo de caballitos de mar es el fotoperíodo ya que éstos son depredadores visuales y, por tanto, requieren de ciclos de luz-oscuridad determinados para la captura y digestión de las presas. En este sentido, la relación óptima entre día/noche en el cultivo de caballitos de mar presenta una gran discrepancia interespecífica con cultivos exitosos en regímenes de luz continua (24h luz), 16h luz / 8h oscuridad, 12h luz / 12h oscuridad y 10h luz / 14h oscuridad (Pawar *et al.*, 2011; Otero-Ferrer *et al.*, 2010; Lin *et al.* 2010; Blanco *et al.* 2014).

Por último, la distribución de los juveniles y de sus presas se ve altamente condicionada a la turbulencia y movimiento de la masa de agua dentro de los acuarios y, por tanto, determinará la energía invertida en natación, captura, alimentación y crecimiento de los juveniles. De hecho, se ha registrado una mayor supervivencia de juveniles cultivados en condiciones de elevada turbulencia respecto a los cultivados en aguas más tranquilas; aunque las tasas de crecimiento de los primeros fueron menores debido principalmente al elevado gasto de energía en condiciones de mayor turbulencia.

GALICIA, FUENTE DE CABALLITOS DE MAR

En Galicia, las poblaciones naturales de caballitos de mar presentes pertenecen, mayoritariamente, a la especie *Hippocampus guttulatus*. Esta especie se encuentra en una situación de reducción demográfica genética a largo plazo (López 2011) y, por tanto, es esencial su reproducción en cautividad y la protección de sus poblaciones naturales. Por ello, en 2006 se inició en el Instituto de Investigaciones Marinas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIM-CSIC) el Proyecto Hippocampus, un programa de cultivo en cautividad de reproductores de *H. guttulatus* con la finalidad de recuperar las poblaciones gallegas de caballito de mar mediante la reproducción en cautividad de adultos. Más adelante, en 2008, el Proyecto *Hipporearingse* enmarcó en la producción de juveniles como herramienta de conservación de las poblaciones naturales con los objetivos específicos de mejorar la supervivencia y el crecimiento de los juveniles cultivados en cautividad.

Como resultado se desarrolló un procedimiento de cultivo para el *Hippocampus guttulatus* basado en el uso de acuarios específicamente diseñados para el proyecto (Pseudo Kreisel, figura XX), una fuerte aireación para aumentar la turbulencia y evitar, así, la sobreexpansión de la vejiga natatoria de los juveniles, una temperatura aproximada de 19°C y un fotoperíodo de día largo (16h luz / 8h oscuridad). Además, se propuso un esquema alimentario de acuerdo al desarrollo del sistema digestivo de los juveniles y de la ontogenia de sus enzimas digestivos, a la preferencia por determinadas presas y al tamaño de su boca. Este esquema incluía el suministro de copépodos durante, al menos, los primeros 10 días de vida de los juveniles. Bajo estas condiciones de cultivo se consiguió cerrar el ciclo de vida de esta especie por primera vez, produciendo camadas con un éxito de supervivencia en torno al 90% (Blanco, 2014). De este modo se ha conseguido introducir el *H. guttulatus* en el mercado de la acuariofilia con un elevado valor, (Tabla 1), con una producción estable que aseguran el bienestar de las poblaciones naturales y potencialmente mejorarlas a través de futuras acciones dirigidas a la repoblación y refuerzo de las poblaciones naturales ya establecidas en aguas gallegas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco, A., 2014. Rearing of the seahorse *Hippocampus guttulatus*: Key factors involved in growth and survival. PhD Thesis, University Balearic Islands, 262 pp.
2. Blanco, A, A Chamorro, M Planas (2014) Implications of physical key factors in the early rearing of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*. Vol 433, p: 214-222.
3. Blanco, A, FJ Moyano, M Planas (2015) Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses *Hippocampus guttulatus* fed on different live diets. *Aquac Res*. DOI: 10.1111/are.12806.
4. Blanco, A, M Planas (2015) Mouth growth and prey selection in juveniles of the European long-snouted seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *J World Aquacult Soc*. Vol. 46 (6), p. 596-607.
5. CITES, 2002. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora, Twelfth Meeting of the Convergence of the Parties, Santiago de Chile, Chile.
6. IAA, 1981. Yizre'el Valley Silver hoard. In: Israel Antiquities Authority, (Ed.), Available at: http://www.antiquities.org.il/hoards_eng.asp.
7. IUCN, 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. In: <http://www.iucnredlist.org>. Accessed in March 2014.
8. Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*. 302, 131-152.
9. Lin, Q., Lin, J., Huang, L., 2010. Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture Research*. 42, 91-98.
10. López, A., 2011. Aplicación de marcadores moleculares al análisis de recursos genéticos y desarrollo del cultivo en especies de caballito de mar del Atlántico noreste, Genetic Department. PhD Thesis, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, 322 pp.
11. Martínez-Cárdenas, L., Purser, G.J., 2012. Effect of stocking density and photoperiod on growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses *Hippocampus abdominalis* Lesson, 1827. *Aquaculture Research*. 43, 1536-1549.
12. Otero-Ferrer, F., Molina, L., Socorro, J., Herrera, R., Fernández-Palacios, H., Soledad Izquierdo, M., 2010. Live prey first feeding regimes for short-snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* (Linnaeus, 1758) juveniles. *Aquaculture Research*. 41, e8-e19.
13. Pawar, H., Sanaye, S., Murugan, A., Sreepada, R., 2011. Effect of background color of tank on growth and survival of juvenile Yellow Seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker 1852), in the pelagic phase. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 63, 1-6.
14. Planas, M., Blanco, A., Chamorro, A., Valladares, S., Pintado, J., 2012. Temperature-induced changes of growth and survival in the early development of the seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 438, 154-162.
15. Roos, G., Van Wassenbergh, S., Herrel, A., Adriaens, D., Aerts, P., 2010. Snout allometry in seahorses: insights on optimisation of pivot feeding performance during ontogeny. *The Journal of Experimental Biology*. 213, 2184-2193.
16. Tlustý, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*. 205, 203-219.
17. Vincent, A.C.J., 1996. The international trade in seahorses. *TRAFFIC International*.

18. Wardley, R.T., 2006. A Study on the Feeding of the Pot-bellied Seahorse (*Hippocampus abdominalis*): Reducing the Reliance on Brine Shrimp (*Artemia*). PhD Thesis, University of Tasmania, Australia, 634 pp.
19. Waxman, S., 2008. Chasing the Lydian hoard. Available at: www.smithsonianmag.com (<http://bit.ly/2teVRvz>). Accessed in March 2014
20. Wilson, M., Vincent, A.J., 2000. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorse species, *Hippocampus* spp., in captivity. *Aquarium Sciences and Conservation*. 2, 179-196.
21. Wong, J.M., Benzie, J.A.H., 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. *Aquaculture*. 228, 107-121.

RECUPERACIÓN DE SUELOS DE MINA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TECNOSOL Y BIOCHAR COMBINADOS CON BRASSICA JUNCEA L.

Rubén Forján, Alfonso Rodríguez-Vila, Beatriz Cerqueira, Emma F. Covelo.

Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

INTRODUCCIÓN

La minería es la actividad industrial dedicada a la obtención de georrecursos para el abastecimiento de materias primas a la población. Este tipo de minería provoca un gran impacto ecológico, social y cultural. Además, es una actividad industrial no sostenible, ya que la explotación del recurso supone su agotamiento y la recuperación total de la zona explotada es prácticamente imposible (Instituto Geológico y Minero de España, 2004).

Un ejemplo de este tipo de minería fue a mina de cobre de Touro situada en el ayuntamiento de Touro localizado al sur de la provincia de A Coruña y limitando con el río Arinteiro (Figura 1). Este yacimiento fue explotado por Explosivos Río Tinto S.A entre los años 1973 y 1988. Cuando cesó la actividad minera en el año 1988 en esta zona no se aplicaron medidas de recuperación ya que la legislación vigente en ese año no lo exigía. En este suelo la existencia de elevadas concentraciones de metales, no sólo Cu y Fe, sino también Ni, Pb y Zn, junto con la posibilidad de aumento de su solubilidad al disminuir el pH, causan una fuerte contaminación de las aguas y los suelos circundantes (Asensio *et al.*, 2011, Pérez-Otero, 1992). Además, este suelo presenta bajos contenidos en carbono, nutrientes y una capacidad de intercambio catiónica descompensada. Desde hace años el Catedrático Felipe Macías Vázquez ha recuperado zonas de esta mina mediante la aplicación de enmiendas.

Otro problema de la sociedad actual es la producción y gestión de residuos, lo que puede provocar contaminación del aire, agua y suelo. Muchos de estos residuos son mal gestionados incluso siguiendo la legislación, filtrándose o desechándose,

terminando de esta forma en el medio ambiente alterando los ecosistemas. Para solucionar el problema de la recuperación de suelos contaminados o degradados, recientemente está aumentando la demanda de la utilización de enmiendas que sean aplicables y económicas (Anawar *et al.*, 2015, Puga *et al.*, 2016). Algunas de estas enmiendas se elaboran con residuos que se producen en la sociedad actual, como son entre otros los residuos de industrias agroalimentarias y los lodos de depuradora residuos que actualmente también son un problema por su compleja gestión. De este modo al incluir los residuos en las enmiendas también se les da una salida sostenible. Alguna de estas enmiendas elaboradas con residuos son los tecnosoles y en los últimos años el biochar

Los tecnosoles comprenden un nuevo grupo de suelos de referencia (GSR) y combinan suelos cuyas propiedades están originadas por su origen técnico. Presentan un contenido significativo de artefactos, o están sellados por roca dura técnica. Incluyen suelos de desechos, pavimentos con sus materiales subyacentes no consolidados, suelos con geomembranas y suelos construidos en materiales hechos por el hombre (FAO, 2007).

Los tecnosoles pueden tener dos funciones: dar salida a los residuos y como enmienda para recuperar o mejorar suelos. Los tecnosoles pueden ayudar a la recuperación de las funciones del suelo en espacios degradados y/o contaminados y retener una gran parte de su carbono y nitrógeno (Camps *et al.*, 2008; Macías, 2004, Macías *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2009) (Figuras 2 y 3). A pesar de los grandes beneficios que presentan los tecnosoles, éstos pueden tener problemas derivados de los residuos con los que se elaboran. Algunos de estos problemas son la presencia de metales.



Figura 1. Mina de Touro.



Figura 2. Planta de elaboración de tecnosoles de la empresa TEN.



Figura 3. Utilización de diferentes tecnosoles para recuperar zonas con diferentes requerimientos. Macías-García et al. (2009).

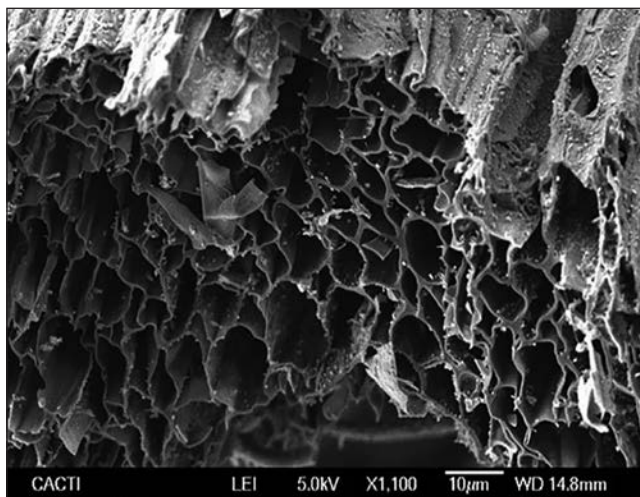


Figura 4. Imagen de biochar obtenido a partir de biomasa de eucalipto a 360 °C. La imagen se obtuvo mediante un microscopio electrónico de barrido por emisión de campo (FE-SEM) equipado con un espectrómetro dispersivo de energía (EDS).

En el año 2015, el International Biochar Initiative definió el biochar como un carbón vegetal finamente granulado de alto contenido en C orgánico y muy resistente a la descomposición (Figura 4). Se produce a partir de la pirólisis de plantas y de residuos. Las características de cada biochar dependen del material de partida y de las condiciones a las que se elabore (Dai *et al.*, 2017). Como enmienda aplicable al suelo, el biochar a menudo tiene un efecto encalante, y posee una microestructura porosa que da como resultado una alta área de superficie específica y grupos funcionales activos en su superficie, lo que implica una alta capacidad de complejar metales en su superficie y una elevada capacidad de retención de nutrientes. Además de una gran importancia a la hora de aumentar el almacenamiento de carbono en el suelo reduciendo su emisión a la atmósfera (Beesley y Marmiroli, 2011).

Autores como Fowles (2007) o Kammann *et al.* (2015) demostraron que la combinación del biochar con enmiendas elaboradas con residuos como los tecnosoles mejora la efectividad de los mismos.

En los últimos años este tipo de enmiendas (tecnosol y biochar) además de combinarse entre sí, también se están empezando a combinar con plantas fitorremediadoras. La fitorremediación es el uso de plantas y microorganismos asociados al suelo para eliminar o reducir los contaminantes en el aire, suelo y agua (Rascio y Navari-Izzo, 2011). La fitoestabilización es un tipo de fitorremediación que reduce el riesgo intrínseco de los contaminantes sin eliminarlos del lugar al reducir su biodisponibilidad en el suelo. Una solución simple para la

estabilización de los metales es la revegetación con plantas tolerantes a los mismos, muy útil para la estabilización de residuos mineros. Esta técnica impide la erosión y lixiviación.

El objetivo de este trabajo es evaluar en el suelo de la balsa de decantación de la mina de Touro el efecto de diferentes enmiendas tanto por separado como combinadas entre sí como con *Brassica juncea L* a la hora de reducir las concentraciones fitodisponibles de cobre, níquel, plomo y zinc.

MATERIAL Y MÉTODOS

Suelo y enmiendas

La zona de muestreo está ubicada en la antigua mina de cobre en Touro (Figura 1) (8° 20' 12.06" W 42° 52' 46.18" N). Para llevar a cabo el estudio, se seleccionaron un suelo y tres enmiendas. El suelo escogido provenía de la balsa de decantación de la mina Touro (S), y las tres enmiendas fueron arena (SS) suministrada por la empresa Leboriz S.L.U., utilizada como control neutro; tecnosol (T) suministrado por la empresa Tratamientos Ecológicos del Noroeste (T.E.N.) y biochar (B) suministrado por la empresa Proinins S.A.

El suelo de la balsa de decantación (S) se formó por la decantación de los residuos resultantes de la flotación de sulfuros durante el procesamiento del cobre. La balsa de decantación lleva seca desde hace décadas, y se considera un suelo de acuerdo con la última versión de la FAO (2007).

La arena (SS) consistía en arena de mar lavada.

El tecnosol (T) utilizado se elaboró con una mezcla de lodos de depuradora, lodo de una empresa de aluminio, cenizas de una empresa de celulosa, residuos procedentes de la industria agroalimentaria y arena procedente de plantas de depuración.

El biochar (B) utilizado se elaboró a partir de madera de *Quercus ilex* (roble) con una temperatura de pirólisis de 400 °C durante 8 h.

Diseño experimental

El experimento en invernadero se realizó en cilindros para tratar de reflejar los 45 centímetros superiores del suelo. Los cilindros estaban hechos de PVC de 50 cm de alto y 10 cm de diámetro. En los cilindros se introdujo una malla porosa con el suelo o el suelo con los tratamientos (Figura 5). Los diferentes tratamientos aplicados fueron:

- Suelo de la balsa de decantación + tecnosol (ST)
- Suelo de la balsa de decantación + tecnosol + *Brassica juncea L.* (STP)

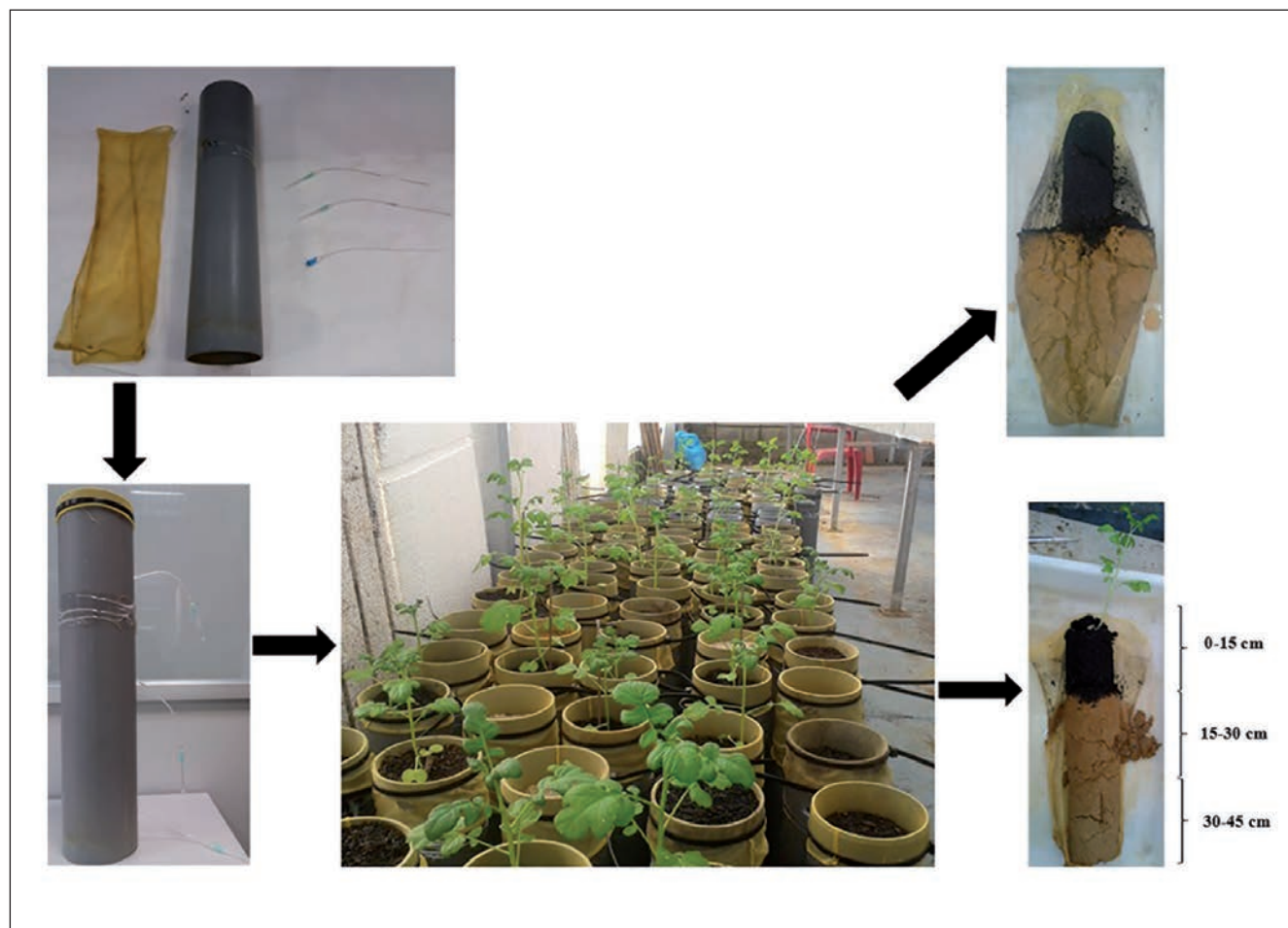


Figura 5. Diseño experimental

TABLA 1. PROPORCIONES UTILIZADAS PARA ELABORAR LOS CONTROLES Y LOS TRATAMIENTOS

	Suelo	Arena	Tecnosol	Biochar
S	100%			
SS	85%	15%		
ST	85%		15%	
STP	85%		15%	
STB	85%		11%	4%
STBP	85%		11%	4%

- Suelo de la balsa de decantación + tecnosol + biochar (STB)
- Suelo de la balsa de decantación + tecnosol + biochar + *Brassica juncea* L. (STBP).

Las proporciones utilizadas se detallan en la Tabla 1. El peso total de cada cilindro fue 3,5 kg. El experimento se llevó a cabo durante 11 meses a temperatura y humedad controladas. Un total de 54 cilindros (9 cilindros por tratamiento) fueron preparados y distribuidos al azar (S, SS, ST, STP, STB, STBP) (Figura 5). Se retiraron tres cilindros de cada tipo en tres tiempos diferentes: Tiempo 1 = 3 meses, Tiempo 2 = 7 meses, Tiempo 3 = 11 meses. Las mallas fueron retiradas de los cilindros y procesadas para análisis a 3 profundidades diferentes: la primera de 0-15 cm, la segunda de 15-30 cm y la tercera de 30-45 cm (Figura 5). Los cilindros se regaron a capacidad de campo durante todo el experimento.

TABLA 2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL SUELO DE LA Balsa DE DECANTACIÓN (S), ARENA (SS), TECNOSOL (T) Y BIOCHAR (B).

		S	SS	T	B
pH		2,73±0,07d	3,83±0,55c	6,04±0,05b	9,90±0,02a
Carbono total	(g/kg)	1,93±0,15c	2,76±0,60c	256±2,51b	676±4,58a
Nitrógeno total	(mg/kg)	u.d	0,10±0,01c	17,6±0,50a	5,34±0,22b
CEC	(cmol(+)kg⁻¹)	6,11±0,05c	0,14±0,01d	76,6±4,80a	15,8±17,8b
Cu	Pseudototal (mg/kg)	637±2,08a	46,4±1,14c	226±5,13b	27,1±1,24d
Pb		16,1±1,00b	10,4±0,56c	89,6±1,52a	u.d
Ni		16,4±1,10b	8,26±1,05c	26,3±0,57a	25,0±2,00a
Zn		65,4±2,51b	18,9±1,20c	340±5,50a	62,6±1,95b
Cu	CaCl₂ (mg/kg)	139±2,08a	3,11±0,17b	6,01±0,03b	u.d
Pb		0,65±0,03a	0,11±0,01c	0,33±0,02b	u.d
Ni		2,25±0,30a	0,05c	1,03±0,02b	0,33±0,02c
Zn		64,4±1,24b	0,32±0,01c	165±1,63a	1,24±0,01c

TABLA 3. EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES FITODISPONIBLES (EXTRAÍBLES CON CaCl₂) DE CU, PB, NI Y ZN (MG.KG⁻¹) EN LA PROFUNDIDAD 0-15 A LO LARGO DE LOS 11 MESES DE TIEMPO EXPERIMENTAL.

Profundidad 0-15 cm		S	SS	ST	STP	STB	STBP
Tiempo 1	Cu	50.6±3.25a	3.37±0.07d	6.06±0.10c	6.64±0.09b	2.09±0.14f	2.54±0.10e
	Pb	0.41±0.08a	0.15±0.01e	0.39±0.04b	0.41±0.05a	0.23±0.01d	0.30±0.02c
	Ni	2.06±0.05a	0.07±0.01f	1.03±0.32c	0.22±0.01d	0.19±0.6e	1.54±0.70b
	Zn	3.09±0.87e	0.42±0.02e	166±6.66a	160±1.47b	151±6.22c	145±3.54d
Tiempo 2	Cu	54.5±6.82a	5.30±0.20b	7.27±0.091b	7.61±0.73b	1.16±1.00c	1.77±0.06c
	Pb	0.44±0.02a	0.15±0.09d	0.37±0.02b	0.37±0.05b	0.22±0.01c	0.21±0.01c
	Ni	2.53±0.41a	0.02e	0.84±0.07c	0.94±0.10c	0.71±0.03d	1.55±0.29b
	Zn	2.63±0.09d	0.59±0.88d	157±4.01b	166±1.98a	155±4.21b	134±3.69c
Tiempo 3	Cu	54.1±3.13a	4.76±0.39b	4.49±0.51b	4.11±0.07b	1.13±0.14c	1.22±1.00c
	Pb	0.44±0.04a	0.19±0.21e	0.38±0.01b	0.35±0.02c	0.30±0.01d	0.35±0.02c
	Ni	3.32±0.25a	0.02e	1.28±0.06b	1.07±0.04c	1.03±0.02c	0.93±0.01d
	Zn	2.34±0.70d	0.31±0.06d	167±0.75b	175±3.11a	165±1.39b	151±4.02c

Análisis del suelo

Las muestras recogidas de los cilindros se secaron al aire, se pasaron a través de un tamiz de 2 mm y se homogeneizaron. El pH del suelo se determinó utilizando un electrodo de pH en agua 1: 2,5 para extraer el suelo. Se determinó el carbono total del suelo (CT) y el nitrógeno total (TN) en un módulo LECO CN-2000. Los cationes de cambio se extrajeron con BaCl₂ 0,1M (Hendershot y Duquett 1986) y sus concentraciones se determinaron con un ICP-OES (Optima 4300 DV, Perkin - Elmer). Las concentraciones fitodisponibles de cobre, níquel, plomo y zinc de la solución del suelo se extrajeron con CaCl₂ 0,01M (Houba et al., 2000). Las concentraciones pseudototales de cobre, níquel, plomo y zinc se extrajeron con agua regia por digestión ácida (Milestone ETHOS 1). Las concentraciones de metales se determinaron mediante ICP-AES (Optima 4300 DV, Perkin-Elmer).

Determinación de los metales en los tejidos vegetales

Las plantas de *Brassica juncea* L. (mostaza de la India) se pre-germinaron en semilleros hasta que presentaron dos hojas totalmente expandidas y posteriormente se transplantaron a los cilindros (STP, STBP). Se realizaron 3 cosechas y en el mismo estado de madurez (Tiempo 1 = 3 meses, Tiempo 2 = 7 meses, Tiempo 3 = 11 meses). En cada cosecha se separaron los tallos y las raíces y se lavaron cuidadosamente con agua desionizada. La biomasa fresca se pesó inmediatamente y la masa seca después de un secado en horno durante 48 horas a 80 ° C. Los tejidos vegetales, divididos en raíces y tallos, fueron secados al aire y posteriormente triturados. Las concentraciones totales de Cu, Pb y Zn en *Brassica juncea* L. se extrajeron por digestión ácida utilizando una mezcla de H₂O₂ y HNO₃ en un horno microondas (Milestone ETHOS 1).

Con el fin de establecer la capacidad fitorremediadora de *Brassica juncea* L., se calcularon el coeficiente de transferencia (TC) y el factor de translocación (TF).

El coeficiente de transferencia (TC) mide la eficiencia en la absorción de metales del suelo por parte de las plantas (Peijnenburg y Jager, 2003).

Planta acumuladora o hiperacumuladora TC > 1 (Busuioc et al. 2011).

El factor de translocación (TF) mide la capacidad de translocar metales de la raíz a la parte aérea.

Planta translocadora TF > 1 (Baker y Brooks, 1989).

Discusión

Evolución de las concentraciones fitodisponibles de Cu, Pb, Ni, Zn

En la profundidad 0-15 cm, los tratamientos provocaron un efecto positivo en las concentraciones fitodisponibles de los metales (Cu, Ni, Pb, Zn) reduciendo las de Cu, Pb y Ni, aunque no las de Zn, en comparación con el suelo de la balsa de decantación sin tratamiento (Tabla 3). La aplicación directa de tecnosol presentó las mayores concentraciones fitodisponibles de Zn debido a los residuos con los que se elaboró. Estas concentraciones fitodisponibles de Zn suelen aparecer en el suelo cuando se le aplican residuos como lodos de depuradora o restos de industrias agroalimentarias los cuales suelen contener altas concentraciones de Zn (Alvarenga et al., 2016, González-González et al., 2013). Dentro de los tratamientos aplicados, el tratamiento que combina tecnosol con biochar y *Brassica juncea* L. (STBP) fue el más efectivo.

La reducción de las concentraciones fitodisponibles de metales está relacionada directamente con el aumento de pH, CT y CEC (Cui et al., 2016, Chandra et al., 2014; Karer et al., 2015; Puga et al., 2015). Como se puede observar en la Tabla 2 tanto el tecnosol como el biochar presentaron valores superiores de estos factores en comparación con el suelo de la balsa de decantación.

En la profundidad 15-30 cm (Tabla 4), los tratamientos aplicados pierden eficacia a la hora de reducir las concentraciones fitodisponibles de Cu, Pb, Ni y Zn. Sin embargo, al final del tiempo experimental el tratamiento elaborado con tecnosol y biochar y vegetado con *Brassica juncea* L. (STBP) redujo las concentraciones de Cu y Ni en comparación con el suelo de la balsa de decantación. Además, en esta profundidad STBP fue el tratamiento que mejor resultados presentó entre los tratamientos aplicados.

Después de los once meses de experimento se observó, que en la profundidad 30-45 cm, tanto la aplicación de tecnosol como de tecnosol combinada con biochar (con y sin planta) es efectiva a la hora de disminuir las concentraciones fitodisponibles de metales en el suelo de la balsa de decantación (S) (Tabla 5), con la excepción del Cu en el suelo tratado únicamente con tecnosol, sin diferencias significativas en comparación con S. Tenemos que recordar que los tratamientos son aplicados en superficie y, esta profundidad del cilindro (30-45 cm) está formada por suelo de la balsa de decantación y las partículas que hayan podido migrar desde las enmiendas. En esta profundidad (30-45 cm), algo que destacó al final de los 11 meses fue el efecto del tratamiento que combina tecnosol con biochar y *Brassica juncea* L. (STBP), el cual presentó menores concentraciones fitodisponibles de todos los metales en comparación con el suelo de la balsa de decantación.

TABLA 4. EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES FITODISPONIBLES (EXTRAÍBLES CON CACL₂) DE CU, PB, NI Y ZN (MG.KG-1) EN LA PROFUNDIDAD 0-15 A LO LARGO DE LOS 11 MESES DE TIEMPO EXPERIMENTAL.

Profundidad 15-30 cm		S	SS	ST	STP	STB	STBP
Tiempo 1	Cu	50,9±1,31a	50,2±0,09a	48,7±0,98b	44,8±0,07c	42,3±0,11d	41,9±1,00e
	Pb	0,40b	0,38±0,02c	0,41±0,01b	0,54±0,04a	0,32±0,02b	0,41±0,02b
	Ni	2,06±0,07f	2,09±0,09e	2,74±0,10d	3,62±0,22a	2,90±0,02c	3,21±0,17b
	Zn	2,37±0,06e	2,33±0,08e	4,65±0,05c	6,65±0,37a	5,91±0,17b	4,50±0,06d
Tiempo 2	Cu	55,4±0,33b	53,3±0,01c	55,2±0,28b	56,5±0,51a	47,2±0,99d	44,0±1,68e
	Pb	0,48±0,01ab	0,35±0,45e	0,46c	0,51±0,02a	0,43±0,01d	0,44±0,02d
	Ni	2,40±0,01d	2,38±0,01e	2,88±0,05b	3,21±1,84a	2,64±0,10c	2,88±0,07b
	Zn	2,59±0,01f	2,66±0,04e	5,29±1,02c	5,57±0,03b	5,69±0,05a	3,23±0,20d
Tiempo 3	Cu	55,9±0,03b	57,2±0,06a	55,0±0,09b	55,5±0,04b	50,5±c	48,1±1,01d
	Pb	0,43±0,01c	0,37±0,04d	0,47b	0,48±0,01b	0,47±0,01b	0,50±0,01a
	Ni	3,31±0,12a	2,48±0,06d	3,02±0,07b	3,00±0,03b	2,17±0,10e	2,74±0,05c
	Zn	2,58±0,17c	2,64±0,09c	5,59±0,49a	4,51±0,38ab	4,15±0,20b	3,62±0,41b

TABLA 5. EVOLUCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES FITODISPONIBLES (EXTRAÍBLES CON CACL₂) DE CU, PB, NI Y ZN (MG.KG-1) EN LA PROFUNDIDAD 0-15 A LO LARGO DE LOS 11 MESES DE TIEMPO EXPERIMENTAL.

Profundidad 15-30 cm		S	SS	ST	STP	STB	STBP
Tiempo 1	Cu	52,0±0,01b	53,6±0,03a	52,8±0,02ab	51,4±0,03c	47,6±0,5e	50,1±0,01d
	Pb	0,55±0,02a	0,43±0,01b	0,39±0,02c	0,40±0,01c	0,38d	0,32±0,03e
	Ni	2,10±0,05b	2,21±0,01b	2,92±0,02a	3,10±0,04a	3,00±0,03a	3,00±0,02a
	Zn	3,45±0,02e	2,55±0,01f	3,97±0,01c	4,26±0,05a	4,09±0,03b	3,72±0,01d
Tiempo 2	Cu	53,1±1,76b	52,7±1,01b	59,0±3,61a	58,3±2,99a	50,4±1,07c	50,2±1,64c
	Pb	0,55±0,49a	0,42±0,01c	0,43±0,02bc	0,45±0,02b	0,37±0,31d	0,37±0,29d
	Ni	2,57±1,02e	2,82±0,87c	3,30±2,64a	3,29±1,69a	2,96±0,04b	2,75±0,79d
	Zn	3,43±0,03d	3,00±1,99e	3,93±0,02b	3,02±2,22e	4,03±0,05a	3,55±0,50c
Tiempo 3	Cu	58,3±1,11b	61,8±0,73a	58,1±0,89b	57,4±1,45bc	46,7±0,99c	46,3±0,83c
	Pb	0,47±0,01a		0,44±0,01b	0,45b	0,34±0,05c	0,43±0,02b
	Ni	3,48±0,09a	3,14±0,12c	3,01±0,04c	3,34±0,06ab	2,85±0,06d	2,67±0,10e
	Zn	3,73±0,24a	3,02±0,01d	3,15±0,11b	3,04±0,01cd	3,10±0,04b	3,06±0,02c

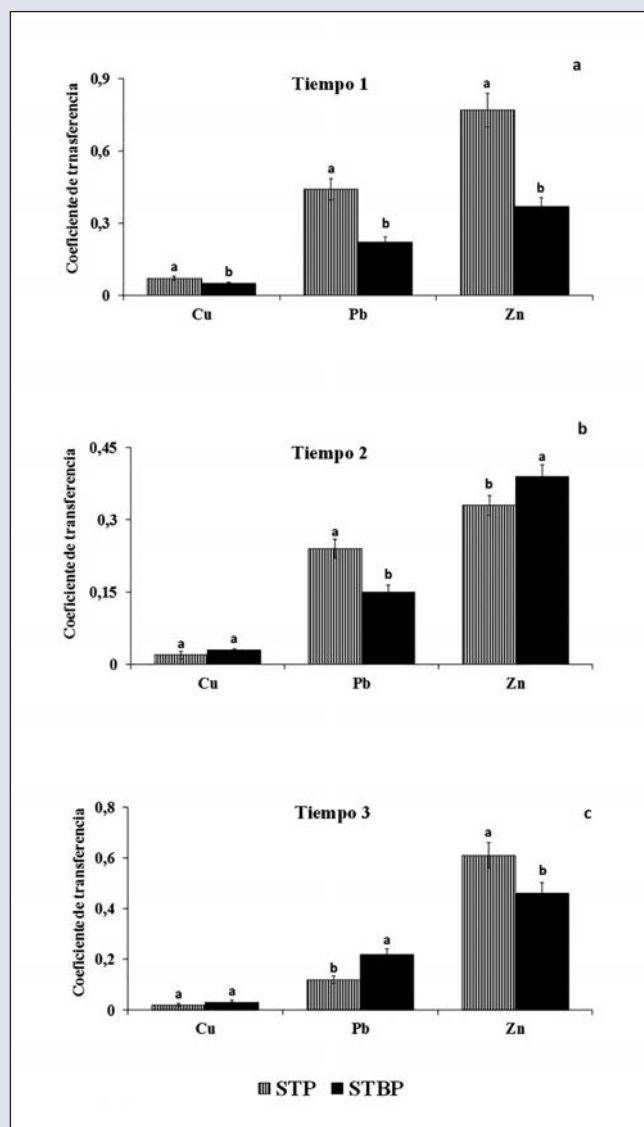


Figura 7. Coeficiente de transferencia (CT) para el Cu, Pb, y Zn de las mostazas según el coeficiente de transferencia (CT) (concentración tallo / concentración pseudototal suelo) durante el período de 11 meses. Para cada fila, las letras diferentes en diferentes muestras significan diferencias significativas (n = 3, prueba t de Student: P < 0.05). Las barras de error representan la desviación estándar.

Evolución de los contenidos cosechables de Cu, Pb y Zn

En los tallos y raíces de *Brassica juncea* L. cultivadas sobre la combinación de tecnosol y biochar, los contenidos cosechados de Cu, Pb y Zn fueron, en líneas generales, superiores en comparación con los contenidos de *Brassica juncea* L. cultivadas sobre la aplicación directa de tecnosol (Figura 6). El metal cosechado en mayor cantidad fue el Zn, posiblemente debido a que fue el metal con mayores concentraciones fitodisponibles en el material de partida (Tabla 2) y a que el Zn es el metal con menor afinidad por el tipo de enmiendas con las que se elaboró este tratamiento (tecnosol principalmente) (Forján *et al.*, 2016 a y b). El biochar es un acondicionador del suelo que mejora el crecimiento de las plantas al suministrar y retener nutrientes, y al proporcionar otros beneficios como mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Fellet *et al.*, 2011). Posiblemente debido a las características citadas anteriormente del biochar, las *Brassica juncea* L. cultivadas en STBP hayan presentado mayores contenidos de Cu, Pb y Zn al final del tiempo experimental. Además, si observamos los datos de las concentraciones fitodisponibles de los metales estudiados en la zona de mayor acción de las raíces (0-15 cm), coincide que el tratamiento STBP presentó, en prácticamente todos los casos, concentraciones fitodisponibles significativamente inferiores en comparación con el tratamiento STP (Tabla 3). Autores como Prapagdee *et al.* (2014) ya han demostrado que la aplicación de biochar en suelos contaminados por metales para mejorar el crecimiento de las plantas también puede conducir a un aumento en la absorción de metales por algunas plantas.

Evolución del Coeficiente de transferencia (TC) en las *Brassica juncea* L. cultivadas sobre STP y STBP

Busuioc *et al.* (2011) propusieron que, para que una planta se considere fitoextractora, debe presentar valores mayores que 1 del coeficiente de transferencia (TC > 1). Una vez calculado el TC para los metales estudiados en este trabajo (Cu, Pb y Zn) se observó que, a lo largo del tiempo y tanto en el tratamiento STP como en el tratamiento STBP, los valores de este coeficiente no superaban el 0,9 (Figura 7). Esto nos indica que, en nuestro caso, las *Brassica juncea* L. no presentan capacidad fitoextractora. Sin embargo, según Kidd *et al.* (2009), las plantas efectivas a la hora de fitoestabilizar tienen coeficientes de transferencia raíz-tallo bajos, como ocurre en nuestro caso. Por lo tanto, nuestras *Brassica juncea* L. presentan un claro papel fitoestabilizador de los metales estudiados. Además, hace décadas, autores como Cunningham *et al.* (1995) concluyeron que la fitoestabilización es la técnica más adecuada para la recuperación de suelos de mina.

Evolución del Factor de translocación (TF) en las *Brassica juncea* L. cultivadas sobre STP y STBP

Para que una planta se considere que tiene capacidad de translocar metales de la raíz al tallo, según el valor del factor de translocación (TF), éste debe ser mayor que 1 ($TF > 1$) (Baker y Brooks, 1989). Sin embargo, en nuestro caso, solo a los 11 meses y en las *Brassica juncea* L. cosechadas en el tratamiento que combinaba tecnosol y biochar (STBP), este factor supera el valor de 1 para el Pb y el Zn (Figura 8). Esto sugiere que *Brassica juncea* L. puede ser una buena especie translocadora para Pb y Zn una vez que el tratamiento STBP se ha estabilizado. Por otro lado, que los valores de TF para el Cu no hayan superado el valor de 1 no significa que para estos metales las *Brassica juncea* L. no hayan sido efectivas, ya que según Nouri et al. (2009) que los $TF < 1$ significa que la planta fija los metales en la raíz cumpliendo un papel fitoestabilizador.

Observando los valores obtenidos de TC y TF se podría decir que *Brassica juncea* L. cultivada sobre este tipo de tratamientos tendría un papel marcadamente fitoestabilizador.

Conclusiones

El suelo de la balsa de decantación al que se aplicaron los tratamientos de tecnosol y biochar fueron los que presentaron una mayor corrección a la hora de reducir los contenidos fitodisponibles de Cu, Pb, Ni y Zn. Esto demuestra el efecto positivo del biochar el cual provoca un aumento en la capacidad del tecnosol para reducir estas concentraciones de elementos potencialmente tóxicos fitodisponibles. Las concentraciones de Cu, Pb y Ni se redujeron considerablemente a las profundidades 1 y 3 a medida que transcurrió el tiempo. En la altura 2, los tratamientos que se aplicaron fueron capaces de reducir las concentraciones fitodisponibles de Cu y Ni. *Brassica juncea* L. demostró ser capaz de fitoestabilizar Cu, Pb y Zn, especialmente las cultivadas en tecnosol y biochar. *Brassica juncea* L. también demostró que puede ser una buena especie translocadora de Pb y Zn una vez que el tratamiento se ha estabilizado y puede acumular Pb y Zn de una manera satisfactoria. Esto significa que, de acuerdo con los valores de TC y TF, *Brassica juncea* L. combina una capacidad fitoestabilizadora y acumuladora cuando se cultiva en estos tratamientos, complementando así la capacidad de estos tratamientos para fijar Cu, Pb, Ni y Zn. Por lo tanto, se puede concluir que la combinación de tecnosol con biochar y *Brassica juncea* L. es un tratamiento efectivo a la hora de reducir las concentraciones fitodisponibles de Cu, Pb, Ni y Zn en el suelo de la balsa de decantación.

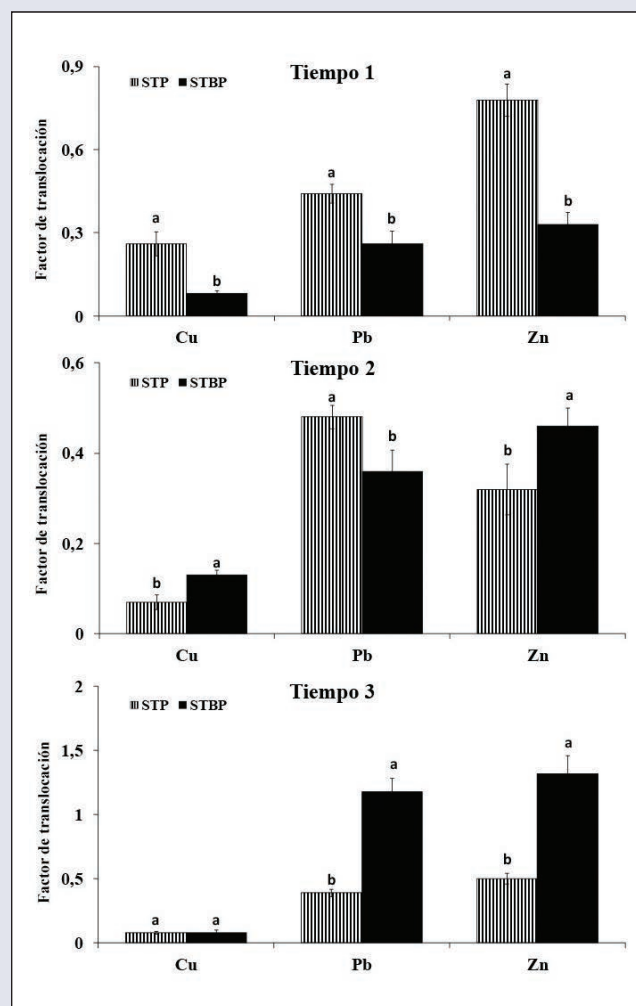


Figura 8. Factor de translocación (TF) para el Cu, Pb, y Zn de las mostazas según el factor de translocación (TF) (concentración tallo / concentración raíz) durante el período de 11 meses. Para cada fila, las letras diferentes en diferentes muestras significan diferencias significativas ($n = 3$, prueba t de Student: $P < 0.05$). Las barras de error representan la desviación estándar.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad bajo el proyecto CGL2016-78660-R.

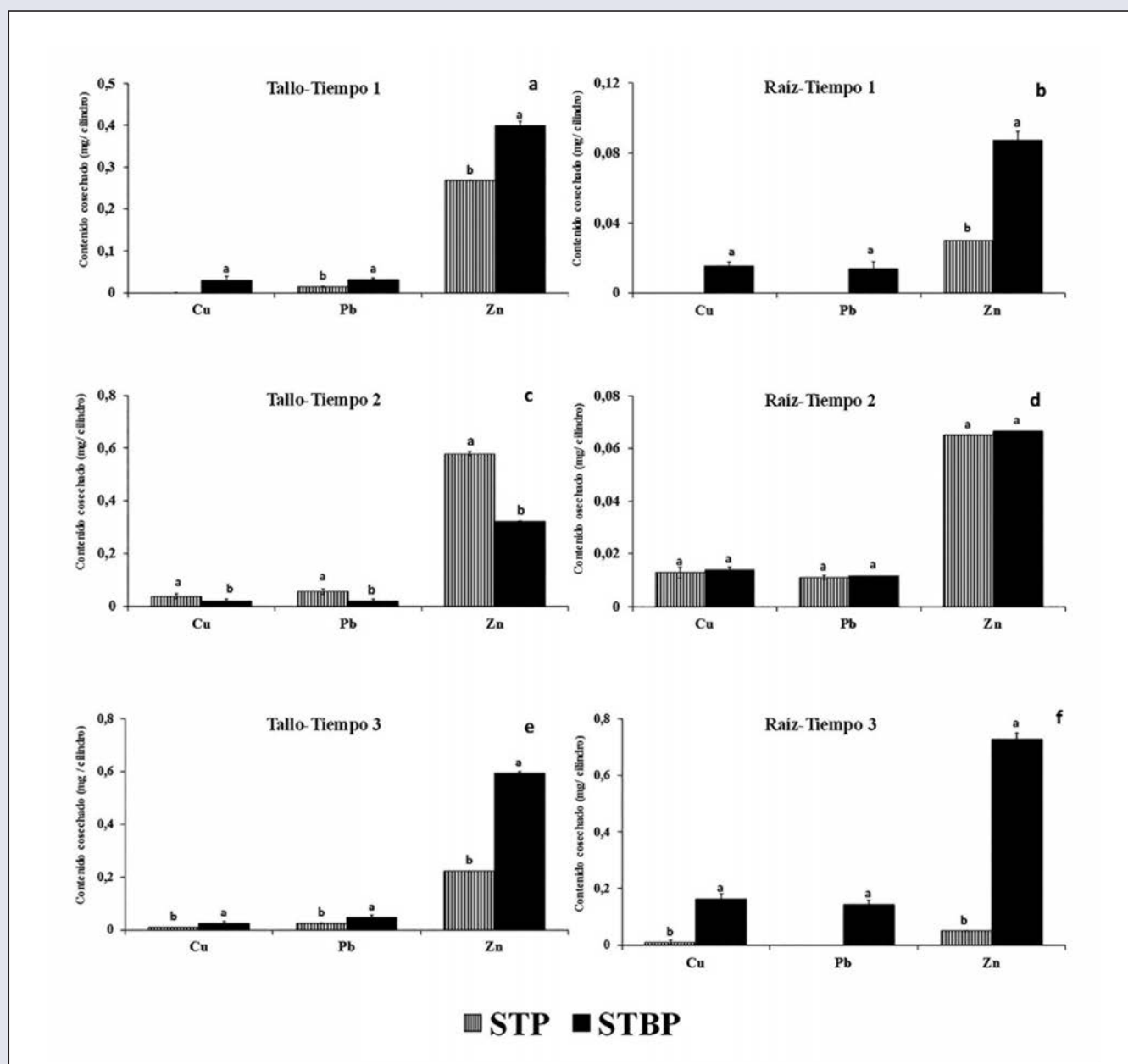


Figura 6. Contenidos cosechados de Cu, Pb y Zn y determinación de metales en tejidos vegetales. Para cada fila, las letras diferentes en diferentes muestras significan diferencias significativas (n = 3, prueba t de Student: P < 0.05). Las barras de error representan la desviación estándar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarenga, P., Farto, M., Mourinha, C., Palma, P. 2016. Beneficial Use of Dewatered and Composted Sewage Sludge as Soil Amendments: Behaviour of Metals in Soils and Their Uptake by Plants. *Waste Biomass Valori.* 7: 1189-1201.
2. Anawar, H.M., Akter, F., Solaiman, Z.M., Strezov, V. 2015. Biochar: An Emerging Panacea for Remediation of Soil Contaminants from Mining, Industry and Sewage Wastes. *Pedosphere.* 25: 654-665.
3. Asensio, V., Vega, F.A., Andrade, M.L., Covelo, E.F. 2011. Tree vegetation to improve physico-chemical properties in bare mine soils. *Fresen Environ Bull.* 20: 3295-3303.
4. Baker, A.J.M., Brooks, R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements e a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery.* 1: 81-126.
5. Beesley, L., Marmiroli, M. 2011. The immobilisation and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. *Environ Pollut.* 159: 474-480.
6. Busuioc, G., Elekes, C.C., Stihl, C., Iordache, S., Ciulei, S.C. 2011. The bioaccumulation and translocation of Fe, Zn, and Cu in species of mushrooms from *Russula* genus. *Environ Sci Pollut Res.* 18: 890-896.
7. Camps, M.A., Madinabeitia, Z., Hortalá, M.A., Macías-García, F., Virgel, S., Macías, F. 2008. Extractability and leachability of heavy metals in Technosols prepared from mixtures of unconsolidated wastes. *Waste Manage.* 28: 2653-2666.
8. Chandra, R., Prusty, B.A.K., Azeez, P.A. 2014. Spatial variability and temporal changes in the trace metal content of soils: implications for mine restoration plan. *Environ Monit Assess.* 186: 3661-3671.
9. Cui, H., Fan, Y., Fang, G., Zhang, H., Su, B., Zhou, J. 2016. Leachability, availability and bioaccessibility of Cu and Cd in a contaminated soil treated with apatite, lime and charcoal: A five-year field experiment. *Ecotox Environ Saf.* 134: 148-155.
10. Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. 1995. Remediation of Contaminated Soils and Sludges by Green Plants. In: R.E. Hinchee, J.L. Means, D.R. Burris (Eds.), *Bioremediation of Inorganics.* Columbus, OH. Battelle Press.
11. Dai, Z., Zhang, X., Tang, C., Muhammad, N., Wu, J., Brookes, P.C., Xu, J. 2017. Potential role of biochars in decreasing soil acidification - A critical review. *Sci Total Environ.* 581-582: 601-611.
12. FAO. 2007. Base referencial mundial del recurso suelo. Un marco conceptual para clasificación, correlación y comunicación internacional. Roma. Italia.
13. Fellet, G., Marchiol, L., Delle Vedove, G., Peressotti, A. 2011. Application of biochar on mine tailings: Effects and perspectives for land reclamation. *Chemosphere.* 83: 1262-1267.
14. Forján, R., Asensio, V., Rodríguez-Vila, A., Covelo, E.F. 2016b. Contributions of a compost-biochar mixture to the metal sorption capacity of a mine tailing. *Environ Sci Pollut Res.* 23: 2595-2602.
15. Forján, R., Asensio, V., Rodríguez-Vila, A., Covelo, E.F. 2016a. Contribution of waste and biochar amendment to the sorption of metals in a copper mine tailing. *Catena.* 137: 120-125.
16. Fowles, M. 2007. Black carbon sequestration as an alternative to bioenergy. *Biomass Bioenerg.* 31: 426-432.
17. González-González, A., Cuadros, F., Ruiz-Celma, A., López-Rodríguez, F. 2013. Energy-environmental benefits and economic feasibility of anaerobic codigestion of Iberian pig slaughter house and tomato industry wastes in Extremadura (Spain). *Bioresour Technol.* 136: 109-116.
18. Hendershot, W.H., Duquett, M. 1986. A simple barium chloride method for determining cation exchange capacity and exchangeable cations. *Soil Sci Soc Am J.* 50: 605- 608.
19. Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., Van Vark, W. 2000. Soil analysis procedures using 0,01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 3: 1299-1396.
20. IGME. 2004. Manual de restauración de terrenos y evaluación de impactos ambientales en minería. Ministerio de Educación y Ciencia. España.
21. Kammann, C.I., Schmidt, H.P., Messerschmidt, N., Linsel, S., Steffens, D., Müller, C., Kyoro, H.W., Conte, P., Joseph, S. 2015. Plant growth improvement mediated by nitrate capture in co-composted biochar. *Sci Rep.* 5: 11080.
22. Karer, J., Wawra, A., Zehetner, F., Dunst, G., Wagner, M., Pavel, P.B., Puschenreiter, M., Friesl-Hanl, W., Soja, G. 2015. Effects of Biochars and Compost Mixtures and Inorganic Additives on Immobilisation of Heavy Metals in Contaminated Soils. *Water Air Soil Pollut.* 226: 342.
23. Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, Ch., Shileve, S., Clemente, R., Monterroso, C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environ Exp Bot.* 67: 243-259.
24. Macías, F. 2004. Recuperación dos solos degradados, reutilización de residuos e secuestro de carbono. Unha alternativa integral de mellora da calidade ambiental (in Galego). *Recursos Rurais.* 1: 49-56.
25. Macías, F., Bao, M., Macías-García, F., Camps-Arbestain, M. 2007. Valorización biogeoquímica de residuos por medio de la elaboración de tecnosoles con diferentes aplicaciones ambientales. *Agua Residuos.* 5: 12-25.
26. Nouri, J., Khorasani, N., Lorestani, B., Karami, M., Hassani, A.H., Yousefi, N. 2009. Accumulation of heavy metals in soil and uptake by plant species. *Environ Earth Sci.* 59: 315-323.
27. Peijnenburg, W.J.G., Jager, T. 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicol Environ Saf.* 56: 63-77.
28. Pérez-Otero, A. 1992. Caracterización de los suelos de mina e impactos medioambientales de la explotación de sulfuros metálicos de Arinteiro (A Coruña). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España.
29. Prapagdee, S., Piyatiratitivorakul, S., Petsom, A., Tawintueung, N. 2014. Application of Biochar for Enhancing Cadmium and Zinc Phytostabilization in *Vigna radiata* L. Cultivation. *Water Air Soil Pollut.* 225: 2233.
30. Puga, A.P., Melo, L.C.A., de Abreu, C.A., Coscione, A.R., Paz-Ferreiro, J. 2016. Leaching and fractionation of heavy metals in mining soils amended with biochar. *Soil Tillage Res.* 164: 25-33.
31. Puga, A.P., Abreu, C.A., Melo, L.C.A., Beesley, L. 2015. Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. *J Environ Manage.* 159: 86-93. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.036.
32. Rascioa, N., Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180: 169-181.
33. Yao, F.X., Macías, F., Virgel, S., Blanco, F., Jiang, X., Camps-Arbestain, M. 2009. Chemical changes in heavy metals in the leachates from Technosols. *Chemosphere.* 77: 29-35.

PARASITISMOS Y PARASITOSIS INTESITNALES EN ANIMALES DE PARQUE ZOOLOGICO: ESTUDIO COMPARATIVO 1994/2017

Iago Dacruz Pérez¹; Antonio Acuña Rodríguez²; M^a Cristina Arias Fernández¹; Alejandro Pamies Castellanos¹.

¹ Laboratorio de Parasitología. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología, Universidade de Vigo.

² Director Veterinario del Parque Zoológico de A Madroa, Vigo-Zoo.

Palabras clave: parásito, hospedador, Epizootia, Zoonosis; Sanidad Animal

INTRODUCCIÓN

El interés por coleccionar animales se remonta a las antiguas civilizaciones china y egipcia, cuando la gente con importancia social creaba colecciones privadas de animales exóticos vivos con el fin de mostrar su riqueza. De este interés surgió en 1664 el primer parque zoológico del mundo, la *Ménagerie Royale de Versailles* (casa real de fieras de Versailles) creado por Luis Le Vau para Luis XIV. Sin embargo, fue destruido en 1793 en tiempos de la Revolución francesa. (Collados, 1997). El primer zoológico moderno fue el Zoológico de Viena, inaugurado en 1765, y tras este se abrieron otros muchos, hasta el punto de que en todas o casi todas las ciudades importantes hay un zoológico de mayor o menor tamaño. Con el paso del tiempo, los zoológicos se han convertido en centros de exposición de animales exóticos y de una gran variedad de actividades dirigidas a la enseñanza, divulgación, y estudio científico. El zoológico de Londres fue el primero en el que comenzaron a realizarse estudios científicos.

En la actualidad, los animales de un parque zoológico viven en condiciones reguladas. Esta regulación está contemplada en. El Reglamento (CE) n° 338/97 97 del Consejo Europeo de 9 de diciembre de 1996, (DOCE del 3/3/97) y en la Directiva 1999/22/CE, (DOCE de 29 de marzo de 1999), En España existe la Ley 31/2003 de 27 de Octubre, BOE N° 258 de 28 de octubre de 2003. Sin embargo, ese control no vuelve al animal inmune a los distintos problemas de sanidad. Dentro del campo de la Sanidad Animal cabe destacar la relevancia de las enfermedades causadas por parásitos, y de forma particular por su incidencia en nuestro medio, las parasitosis producidas por los parásitos intestinales.

Los enteroparásitos son aquellos parásitos que se pueden encontrar en el intestino de sus hospedadores. Un índice elevado de parasitosis intestinales revela una marcada deficiencia de sanidad e higiene (Biagi, 1962). Es evidente que resulta imprescindible el control de todas las enfermedades causadas por enteroparásitos. Dicho “control” generalmente implica la supresión de cargas parasitarias en los animales, por debajo del nivel al cual puedan empezar a producirse manifestaciones clínicas y la manera más eficaz y económica es la elaboración de un calendario semestral o anual de desparasitación estratégica basada en diagnósticos coproparasitológicos.

Desde 1994, nuestro grupo investigador, viene realizando análisis de Coprología parasitarias con muestras de los animales del Parque Zoológico Vigo-Zoo (A Madroa Vigo). Después de todos estos años de trabajo, nos hemos planteado comparar los primeros resultados obtenidos en 1994 con los actuales, de 2017 y así reflejar hasta qué punto, la adopción de las medidas reguladoras establecidas en España en 2003, contribuye a la disminución de la incidencia de enteroparásitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El análisis coprológico sirve para diagnosticar parásitos cuya localización sea fundamentalmente intestinal, bien sea en la luz del intestino, fijados a su mucosa de diversos modos, dentro de la misma o en las venas mesentéricas. De cualquier manera, las larvas, huevos o quistes resultantes de la reproducción, han de salir a la luz intestinal para ser arrastrados por la materia fecal y proseguir su ciclo evolutivo.

En el momento de la recogida de las muestras se procedió con el mayor cuidado posible para evitar las contaminaciones por organismos que no provengan de las heces y puedan dificultar o impedir el correcto análisis. De forma inmediata, se llevó a cabo un análisis macroscópico en el que se aprecia la consistencia de las heces según la escala de Bristol y se establece la presencia o ausencia de proglótides de Cestodos, parásitos enteros, sangre, moco u otros elementos anormales. A continuación, las muestras se almacenaron en botes estériles de polietileno siguiendo el protocolo habitual. Una vez en el laboratorio se guardaron a 4 °C para su posterior análisis, y de cada bote se realizó una réplica que se homogeneizó con formalina 10% en una proporción de 1/3 para conseguir la fijación de las muestras.

Una vez fijadas, se realizó el examen microscópico. Por este examen podremos encontrar pequeños Helmintos, adultos, sus huevos y larvas, trofozoítos y quistes de Protozoos; así como Pseudoparásitos: células muertas del organismo, células epiteliales, glóbulos rojos, objetos inertes (cristales) hongos, células vegetales, gránulos de almidón y polen, que pueden confundirse con quistes y huevos, así como fibras vegetales o pelos de plantas y animales que producen confusión con larvas de Nematodos. Especial mención merecen los Ácaros microscópicos.

Realizamos dos métodos de concentración: la técnica de sedimentación con formalina-acetato de etilo (método de Ritchie modificado) y la técnica de flotación con una solución saturada de sulfato de zinc. Ambas técnicas permiten concentrar las formas parasitarias presentes en la muestra fecal aumentando la probabilidad de que sean detectadas. Para la realización de estas técnicas, y como paso común en ambas, se filtró la muestra que había sido fijada anteriormente con formalina 10% mediante el dispositivo Para-Pak® Macro-CON® (Meridian Bioscience). A continuación se introdujeron 2,5 mL del filtrado en tubos Falcon de 10 mL y se centrifugan en las siguientes condiciones (10 min x 500g/ 1750 rpm en centrífuga). Después de esta centrifugación se desecha el sobrenadante y con los sedimentos de ambos tubos, se realizan las técnicas de sedimentación y flotación.

COPROCULTIVO

El coprocultivo que es absolutamente necesario para determinar la naturaleza de la flora fúngica y bacteriana fecal, para la Paarasitología no es más que un complemento, a veces necesario. En este caso, el interés del coprocultivo en Parasitología reside en la identificación de ciertos parásitos, mediante la observación de los estadios evolutivos. En el caso

de los Nematodos, se aplica a aquellos capaces de llevar a cabo una evolución larvaria en el medio externo. En condiciones favorables, los huevos eclosionan liberando larvas rabditoides (L1 y L2) siendo la larva L2 la que se transforma en larva L3 filariforme que es la fase infectante para el hospedador. Una vez realizadas las técnicas anteriores, en aquellos sedimentos en los que detectamos la presencia de huevos de estrongídeos, se procedió a hacer un coprocultivo

Método Cuantitativo de Mc Master-Cadwell. Se utiliza para saber el número de huevos/g de heces en las infecciones por Helmintos, dato fundamental para saber el grado de infección y, por lo mismo, la dosis de medicamento que debe recibir el animal parasitado. Una vez realizado este método, el número de huevos/g de heces se calcula, empleando la cámara de McMaster, y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{nºhuevos/gramo} = (A+B)/2 \times 100$$

Siendo A el número de huevos de una celdilla de la cámara y B el número de huevos de la otra celdilla

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Analizamos un total de 222 muestras fecales, 110 en 1994 y 112 en 2017, de mamíferos, reptiles, équidos y aves, del Parque Zoológico Vigo-Zoo.

Las especies fueron las siguientes. **Mamíferos:** *Ursus arctos*, *Lynx rufus*, *Lynx lynx*, *Lama guanicoe*, *Lemur catta*, *Potos flavus*, *Oryx dammah*, *Pecari tajacu*, *Panthera tigris*, *Cervus elaphus*, *Panthera leo*, *Genetta genetta* y *Canis lupus signatus*, **Reptiles:** *Pogona vitticeps*, *Lampropeltis hondurensis*, *Tiliqua scincoides*, *Gerrhosaurus major*, *Corallus hortulanus*, *Madagascarophis citrinus*, *Chelonoidis carbonaria*, *Testudo horsfieldii*, *Python molurus bivittatus*, *Boa constrictor*, *Lampropeltis gettulus* y *Epicrates cenchria cenchria*. **Équidos:** *Equus ferus caballus* (Caballo); *Equus ferus caballus* (Pony); *Equus africanus asinus* y *Equus quagga burchellii*. **Aves:** *Dromaius novaehollandiae*.

Realizamos 4 análisis por muestra, lo que supone un total de 888 análisis. El número de casos positivos en 1994 fue 98,18% y en este año de 2017 40,70%, lo que supone una disminución de la prevalencia de la parasitación, de un 57,48%.

Los resultados del número de parásitos encontrados según el grupo taxonómico (gráfico nº 1) demuestran que aparecen más parásitos y géneros de parásitos en 1994 (4 géneros de Protozoos, 20 de Nematodos y 2 de Cestodos) que en 2017 (1 género de Protozoos y 10 géneros de Nematodos). Todos los parásitos son de Ciclo biológico directo (hospedador-suelo-

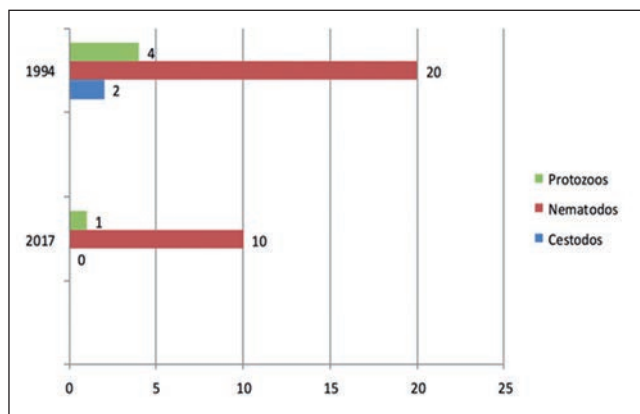


Gráfico 1. Número de parásitos encontrados

hospedador). Aunque no hemos realizado estudios de relación sexo, edad con el grado de parasitación, hemos obtenido resultados bastante similares a los de Vadlejš et al. (2015). Si consideramos los resultados por hospedadores, también nuestros resultados se asemejan, sin grandes diferencias los obtenidos por otros autores: Fiorini et al. (2014) en *Boa constrictor*; Cucchi et al. (2016) en *Lama glama*; García (2007) y Springer y Kappeler (2016) en lémures de Madagascar (*Lemur catta*) y en general en todas las encuestas epidemiológicas en animales de Parque Zoológico (Lim et al., 2008).

En los dos años estudiados, los Nematodos supusieron el grupo más abundante. Dentro de este grupo cabe destacar las especies *Bayliascaris transfuga* parásito de los osos (*Ursus arctos*) y *Toxascaris leonina*, parásito de los félidos salvajes, por tratarse de parásitos zoonóticos: Ambas especies aparecen en los análisis de 1994 y de 2017 y suponen un riesgo para la salud humana. El hombre es un hospedador accidental, esto significa que si se infecta con huevos embrionados, la larva que surge del huevo, migra por el cuerpo dando lugar a lo que se denomina infección por *larva migrans*.

Nuestro resultados, son muy similares a los encontrados por Sato et al. (2004) y Xue et al. (2014). Sin embargo no hemos encontrado *Bayliascaris* en el kinkajou (*Potos flavus*) como Tokiwa et al. (2016). En estos animales encontramos ácaros adultos y huevos. Se trata de un parasitismo espúreo, El kinkajou, tenía una dermatitis por ácaros y al lamerse y rascarse, los ácaros entraron por vía bucal en el aparato digestivo. Estos ácaros son resistentes a los procesos digestivos del hospedador y por eso estaban vivos en las heces. De la misma forma, los huevos que aparecían eran viables.

En cuanto al tipo de asociaciones parasitarias (gráfico nº 2) comprobamos que en 1994 aparecieron tres tipos de

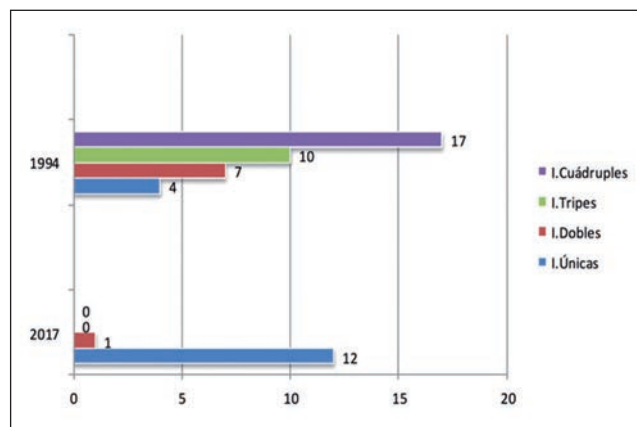


Gráfico 2. Tipos de Asociaciones parasitarias

asociaciones parasitarias. El mayor número eran infecciones cuádruples, seguidas de las triples y por último las dobles. Las infecciones únicas eran las menos frecuentes. Sin embargo, en 2017, sólo hubo una asociación parasitaria que era doble. Todas las demás eran infecciones únicas. No podemos comparar estos resultados con los de otros autores, porque los trabajos que normalmente se realizan en este campo, se limitan a comprobar la presencia o ausencia de los parásitos.

En el gráfico nº 3, se exponen los resultados de las técnicas de diagnóstico. En todos los casos, la técnica de sedimentación fue el método con el que se obtuvo un mayor número de casos positivos. Este resultado concuerda con los ya encontrados en los libros de referencia sobre diagnóstico de enfermedades parasitarias intestinales en animales (Campillo, 1999); (Sloss et al., 1994) y (Soulsby, 1987).

El examen microscópico directo resultó positivo en el caso de la infección por *Bayliascaris transfuga* en los osos. Debido

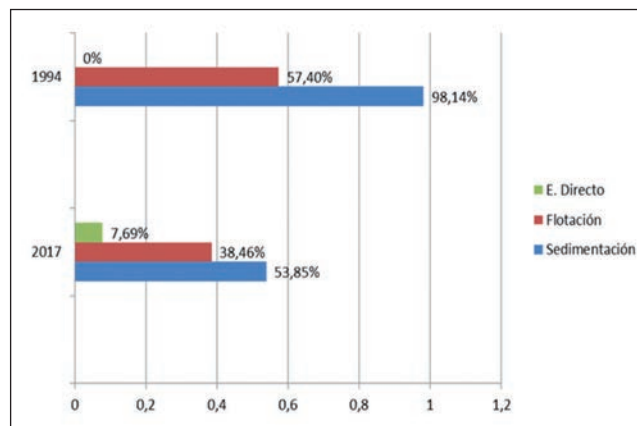
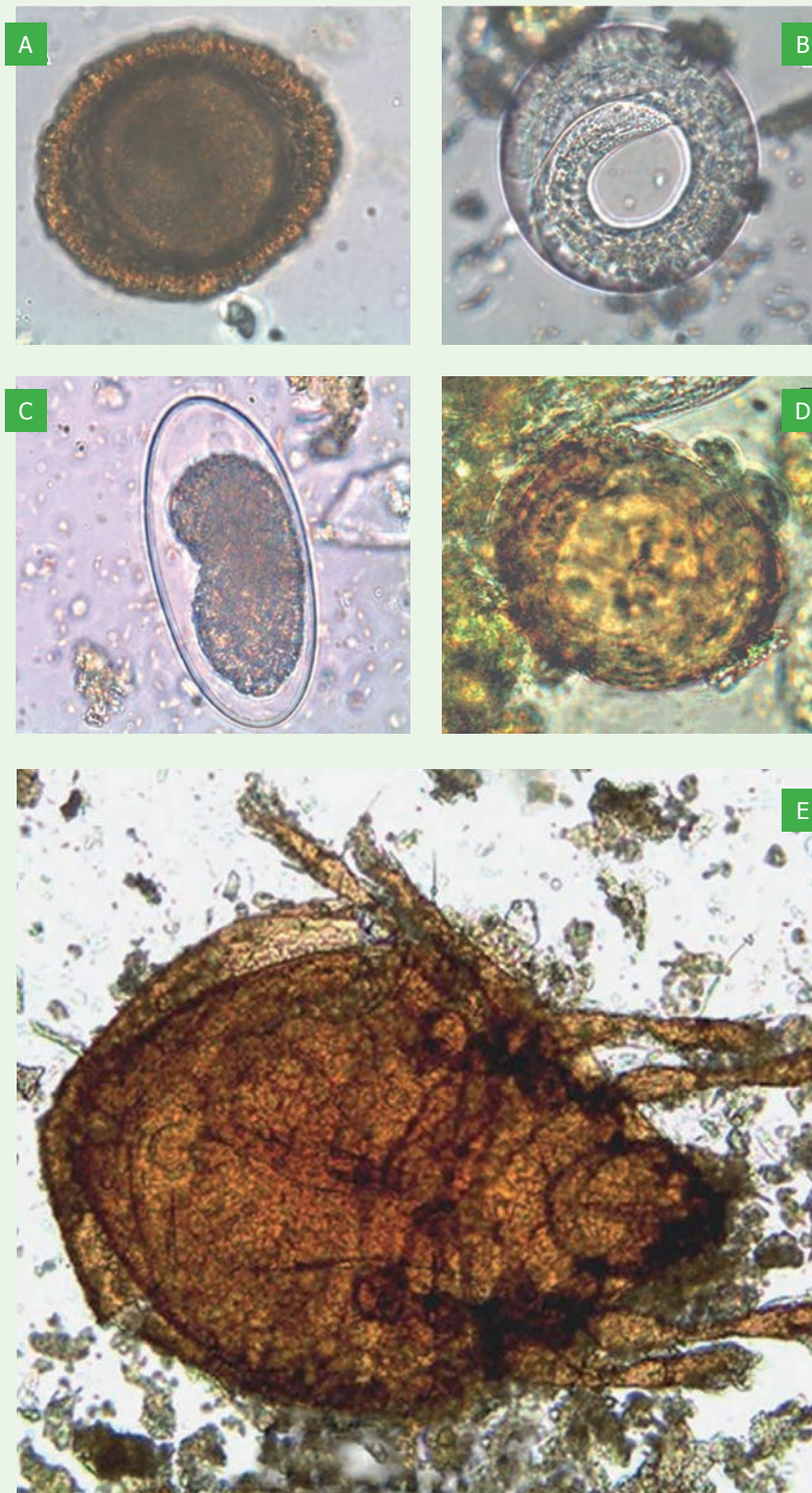


Gráfico 3. Resultado de las Técnicas de diagnóstico



Figuras: A. huevo de Bayliascaris transfuga; B. huevo de Toxascaris leonina con larva en su interior, C. huevo de Ancylostoma sp; D. huevo de Ascaris sp; E. Ácaro adulto

a la gran cantidad de huevos encontrados en este examen, así como en los análisis de concentración por flotación y sedimentación, se procedió a realizar un examen cuantitativo. Tras este examen se comprobó que el número de huevos/g de heces era 3.326, y que por lo tanto se trataba de una infección moderada (entre 1.000 y 5.000 g/h). Se administró, según las pautas establecidas, el antiparasitario NEXGARD (Afloxolaner). A los 12 días se repitieron los análisis de heces (sedimentación, flotación y cuantitativo). Volvieron a aparecer huevos de *Bayliascaris transfuga*, pero en este caso el resultado del análisis cuantitativo fue 780h/g, lo que se corresponde con una infección ligera (hasta 1.000 h/g). Después de un segundo tratamiento, los resultados de los análisis coprológicos de concentración fueron negativos, por lo que no se realizó el examen cuantitativo.

En los coprocultivos de los huevos de strongílidos encontramos larvas L₃ filariformes (39); larvas L₃ de vida libre (19); larvas L₃ de 13 células y machos adultos de vida libre (5). De las 39 larvas filariformes, 26 pertenecían a la Familia *Cyathostominae*; 5 a *Craterostomum acudicaudatum*; 8 a *Gyalcephalus capitatus* y 2 a *Triodontophorys spp.* Todas ellas de vida parasitaria.

CONCLUSIONES:

Por las condiciones medioambientales, no se puede eliminar totalmente la presencia de parásitos intestinales, todos ellos de ciclo biológico directo, en los grupos de población analizados, ni evitar el hecho de que en determinadas ocasiones aparezcan brotes puntuales de infecciones moderadas. Sin embargo, ante estos resultados, es evidente que el cumplimiento de las medidas sanitarias establecidas en la Ley 31/2003 de 27 de octubre, en base a la normativa europea disminuye el grado de infección, situándolo en el nivel de “sanitariamente permisible”. Es prioritario el control de los parásitos zoonóticos.

La aparición, de diferentes tipos de larvas y algunos adultos de vida libre en los coprocultivos nos demuestra que los ciclos biológicos de los strongílidos en general, tanto los de vida libre como los de vida parasitaria, se mantienen perfectamente en las condiciones medioambientales del Parque.

NORMATIVAS

Reglamento (CE) N° 338/97 del Consejo Europeo de 9 de diciembre de 1996, DOCE del 3/3/97, relativo a la protección de especies de la fauna y la flora silvestres mediante el control de su comercio, p: 61/1 – 61/69

Directiva 1999/22/CE del Consejo Europeo relativa al

mantenimiento de los animales salvajes en los parques zoológicos, DOCE de 29 de marzo de 1999. P: 24-26

Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal. Jefatura del Estado «BOE» núm. 99, de 25 de abril de 2003 Referencia: BOE-A-2003-8510 TEXTO CONSOLIDADO Última modificación: 21 de julio de 2015

Ley 31/2003 de 27 de Octubre, BOE N° 258 de 28 de octubre de 2003, sobre conservación de la fauna silvestre en parques zoológicos

BIBLIOGRAFÍA

1. Biagi, F. (1962). Estado actual del uso de antihelmínticos en programas de control de las parasitosis intestinales. *Rev Biol Trop.* 10: 117-122.
2. Campillo, M. (1999). Parasitosis del aparato digestivo. En: Campillo, M., Rojo, F. A. *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw Hill-Interamericana, pp. 195-259.
3. Collados Gustavo Sario (1997) El Rol de los Zoológicos Contemporáneos. Tesis Doctoral. Facultad de Arquitectura, Urbanismo y Paisaje de la Universidad Central de Chile. Santiago de Chile, Chile.
4. Cucchi, M. C., Marcoppido, G., Dekker, A., Fondevila, M., Fuente, Gde L., Morici, G., Cravero, S. (2016). Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) from locations at different altitude in Argentina. *Zootaxa.* 406: 49-56.
5. Fiorini, L. C., Craveiro, A. B., Mendes, M. C., Chiesorin Neto, L., Silveira, R. D. (2014). Morphological and molecular identification of ticks infesting *Boa constrictor* (Squamata, Boidae) in Manaus (Central Brazilian Amazon). *Rev Bras Parasitol Vet.* 23: 539-542.
6. García, L. S. (2007). Diagnostic medial parasitology. *Shock.* 27: 707-708.
7. Irwin, M. T., Raharison, J. (2009). A review of the endoparasites of the lemurs of Madagascar. *Malagaspy Nature.* 2: 66-93.
8. Lim, Y. A. L., Ngui, R., Shukri, J., Rohela, M., Mat Naim, H. R. (2008). Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet Parasitol.* 157: 154-159.
9. Sato, H., Matsuo, K., Osanai, A., Kamiya, H., Akao, N., Owaki, S., Furuoka, H. (2004). Larva migrans by *Baylisascaris Transfuga*: fatal neurological diseases in mongolian Jirds, but not in mice. (2004). *J Parasitol.* 90: 774-781.
10. Sloss, M. G., Kemp, R. L., Zajac, A. M (1994). *Veterinary clinical parasitology*. Iowa: Iowa State University Press.
11. Soulsby, E. J. L. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. México D. F.: Interamericana.
12. Springer, A., Kappeler, P. M. (2016). Intestinal parasite communities of six sympatric lemur species at Kirindy Forest, Madagascar. *Primate Biol.* 3: 51-63.
13. Tokiwa, T., Sugiyama, H., Taira, K., Yoshikawa, Y., Une, Y. (2016). Prevalence of *Baylisascaris Roundworm* in Captive Kinkajous in Japan. *J Parasitol.* 102: 293-294.
14. Vadlejch, J., Kotrba, R., Čadková, Z., Růžicková, A., Langrová, I. (2015). Effects of age, sex, lactation and social dominance on faecal egg count patterns of gastrointestinal nematodes in farmed eland (*Taurotragus oryx*). *Prev Vet Med.* 121: 265-272.
15. Xue, L. M., Chai, J. B., Guo, Y. N., Zhang, L. P., Li, L. (2014). Further studies on *Toxascaris leonina* (Linstow, 1902) (Ascaridida: Ascarididae) from *Felis lynx* (Linnaeus) and *Panthera leo* (Linnaeus) (Carnivora: Felidae). *Acta Parasitol.* 60: 146-153.a

ISLAS CÍES, PATRIMONIO NATURAL.

INFLUENCIA DE LA EXPOSICIÓN OCEÁNICA EN LA ECOLOGÍA DE LOS ORGANISMOS SÉSILES DEL INTERMAREAL ROCOSO:

1. PATRONES ESPACIALES QUE DEFINEN LOS LÍMITES DE LA ZONACIÓN VERTICAL.

Jesús Souza Troncoso¹, Jeffrey A. Sibaja-Cordero².

¹ Catedrático de Zoología. Director del Centro Singular Marino de la Universidad de Vigo -ECIMAT-

² Profesor Titular de Zoología, Universidad de Costa Rica.

JUSTIFICACIÓN GENERAL

La importancia del Archipiélago de Cíes como Patrimonio Natural es incuestionable, físicamente actúa como una gran barrera protectora de la Ría de Vigo, atenuando los efectos de los temporales llegados del oeste del Océano Atlántico, y proporcionando abrigo y protección a innumerables especies de organismos.

Son muchos los trabajos publicados sobre las Islas Cíes, tanto en los ambientes terrestre como marino, sin embargo, había un biotopo del ambiente marino que era poco conocido, la zona intermareal rocosa en su conjunto, desde el supra litoral donde solamente llegan las salpicaduras del agua de mar hasta el medio litoral inferior.

Esta pequeña franja de nuestro litoral, ya fue estudiada en experimentos puntuales para conocer la distribución de algunas especies, sin embargo no se había estudiado en su totalidad, de una forma global en todo el perímetro de las Islas. Así, cabe esperar que la cara más protegida del lado que da a la ría sea muy distinta al lado más expuesto al mar abierto ya que esta última sufre las inclemencias de los temporales atlánticos, por lo tanto las adaptaciones a la hora de colonizar estos ambientes son distintas dependiendo del lado de la Isla en que se encuentren los organismos.

Teniendo en cuenta esta falta de conocimiento en uno de los enclaves más emblemáticos de Galicia, nos hemos planteado describir la distribución vertical y horizontal de los grandes grupos de organismos sésiles (líquenes, algas e invertebrados), presentes a lo largo de la línea de costa rocosa intermareal de las Islas Cíes.

Para alcanzar estos objetivos, hemos muestreado, durante la bajamar de las mareas vivas del 28 de febrero y 14 de marzo de 2009, la costa rocosa de las Islas Sur (San Martiño) y Norte (Monteagudo y Faro) del Parque Nacional Islas Cíes, N.W. de España.

Los objetivos específicos que quisimos lograr fueron, determinar la altura promedio sobre el nivel de marea baja, a la cual logran ubicarse los grupos de organismos en intermareal rocoso; estimar la cobertura de estos organismos en las paredes rocosas y determinar el efecto de la exposición oceánica sobre los organismos sésiles, comparando la altura y la cobertura de estos entre las caras Oeste de las Islas (exposición extrema) contra las caras Este (protegidas).

A modo de poder ordenar la gran cantidad de información obtenida vamos a dividir nuestros resultados en dos artículos, el primero, el que nos ocupa, nos introducirá en los patrones espaciales generales de distribución y el segundo, que se

publicará en un número posterior de esta revista, nos adentraremos en el conocimiento de los límites superior e inferior de la distribución vertical de los organismos.

RESUMEN

Los muestreos se llevaron a cabo alrededor de toda la costa intermareal de las Islas Cíes (NW España) con el objetivo de determinar la variación de la ocupación del espacio, basado en perfiles de zonación vertical de organismos en relación con la influencia del Océano Atlántico.

La costa occidental es muy batida presentando fuerte oleaje y, la costa oriental está protegida. Muchas especies coexisten en un espacio intermareal limitante, así, en la protegida, las spp. presentan una distribución en mosaico y, por el contrario, en los acantilados de la cara oeste los organismos estaban representados por pocas especies. En la cara oeste, el límite intermareal superior de distribución se elevó por el aumento de la humedad causada por las salpicaduras. Las técnicas multivariantes detectaron diferencias en las comunidades entre expuestas y abrigadas, así como entre las dos islas principales.

La distribución de especies en la zona intermareal se relacionó con la característica geomorfológica particular de la costa, como calas, puntos o acantilados expuestos. Cuatro diferentes patrones intermareales de paisaje de zonación vertical fueron representados por cada cara de las islas. Las algas, *Asparagopsis armata* y *Bifurcaria bifurcata*, caracterizaron la isla norte protegida. *Pelvetica canaliculata* y *Fucus spiralis* tuvieron una mayor presencia en el lado protegido de la Isla del Sur. Las fucáceas estaban ausentes en la orilla batida. Los líquenes, *Verrucaria maura* y *Caloplaca marina*, y el cinturón *Rhodophyta* tenía un límite superior de distribución en los lados expuestos de la isla del norte. La roca desnuda y la fase incrustante de *Mastocarpus stellatus* presentaron una mayor presencia en el lado expuesto de la isla del sur.

INTRODUCCIÓN

Los patrones de zonación vertical de los organismos intermareales son causados, en general, por los efectos del estrés físico y las interacciones bióticas (Connell, 1972; Menge et al., 2010).

Varios niveles o conjuntos de organismos han sido descritos y delimitados en función de las especies dominantes (Chapman, 1974). Así, el litoral superior se caracteriza por los moluscos (*LITTORINIDAE*), la costa media está definida por organismos sésiles como percebes y mejillones, y el litoral inferior está

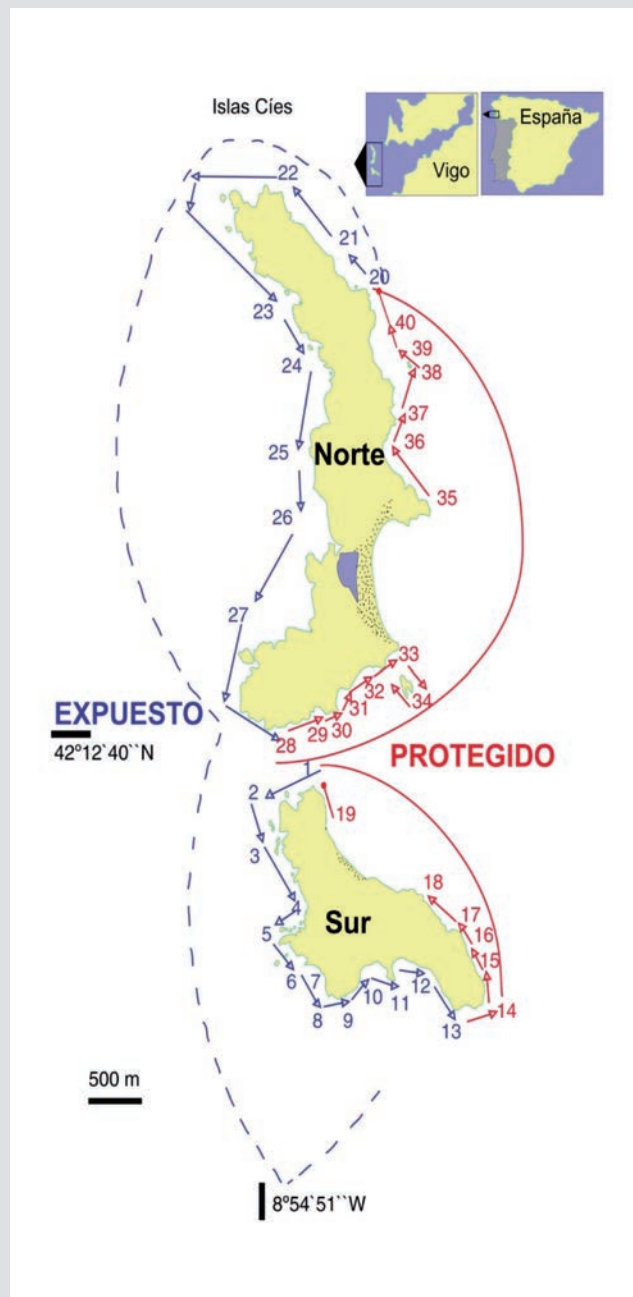


Figura 1. Localización de las secciones en la costa rocosa de las Islas Cíes (Parque Nacional de las Islas Atlánticas). Clasificación del grado de exposición basada en Acuña-Castroviejo et al. (1982). Los transectos efectuados con el barco están representados por flechas.

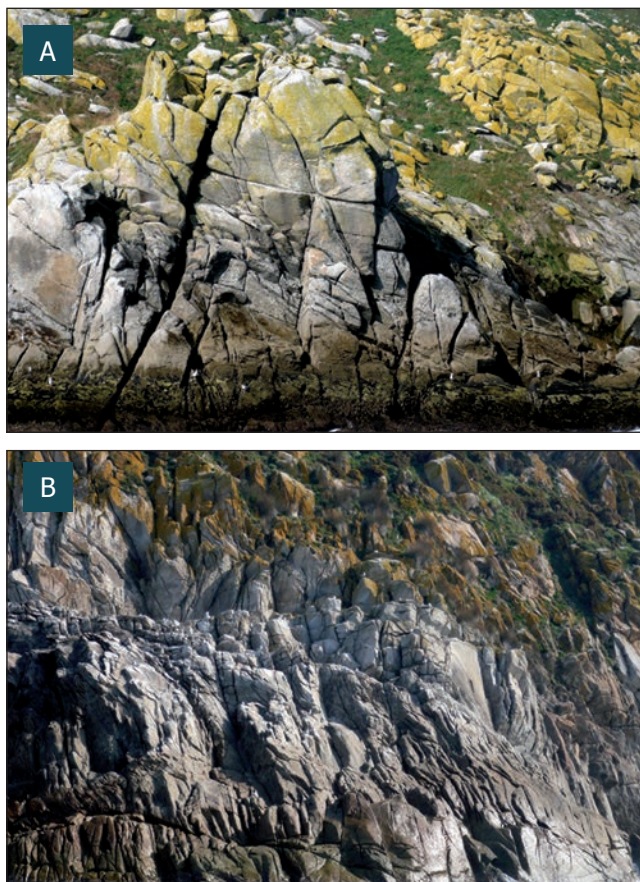


Figura 2 A) y B). ¿Dónde está *Larus*? En todos los transectos fotografiados se podrían observar ejemplares de la gaviota patiamarilla, *Larus cachinnans* Pallas, 1811. Su altura (aprox. 35 cm.) fue utilizada para calibrar la escala de las alturas del intermareal rocoso.

dominado por algas (Ellis, 2003). Las causas principales de las diferencias entre estas comunidades son la exposición a las olas, el transporte de larvas, el suministro de alimentos y la heterogeneidad espacial (Menge *et al.*, 1997; Schiel, 2004). Además, el asentamiento de las fases larvares depende del tipo de roca (Fischer, 1981). Estos factores pueden cambiar en su intensidad por la geomorfología costera de plataformas rocosas y acantilados (Bird, 2008). La fauna de la costa rocosa templada presenta especies verdaderamente marinas en la zona baja del intermareal y especies semi-terrestres en la supralitoral (Ellis, 2003). Tres cuartas partes de la costa del planeta se compone de acantilados y sustratos rocosos en general; sin embargo, la mayoría de los estudios de ecología intermareal se desarrollaron en plataformas costeras caracterizadas por el muestreo en zonas con una accesibilidad y condiciones seguras para los investigadores (Little y Kitching, 1996; Bird, 2008). La costa gallega es principalmente

rocosa y los acantilados dominan la costa (Pérez-Cirera, 1978; Vilas-Paz *et al.*, 2005). Por esta razón, pocos estudios se realizaron en las paredes rocosas de Galicia expuestas al oleaje (Niell, 1977, 1978; Olabarria *et al.*, 2009). Pérez-Cirera (1975) realiza una descripción básica de la distribución vertical de organismos en el norte de Galicia. Las zonas limitrofes, como pueden ser las costas rocosas de la costa norte de Portugal presentan agrupaciones de organismos similares (Araújo *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006).

Las Rías Baixas son valles tectónicos inundados (deCastro *et al.*, 2000); en la parte más externa de las rías se sitúan islas con acantilados intermareales y orillas rocosas (Vilas-Paz *et al.*, 2005). Las comunidades bentónicas de estas islas apenas han sido estudiadas (Acuña-Castroviejo, 1984; Niell, 1977; Besteiro-Rodríguez *et al.*, 2004) y la zonación vertical de los organismos intermareales son por lo tanto desconocidas.

De este modo, se describe la zonación vertical de organismos sésiles (algas, líquenes, mejillones y percebes) a lo largo de la costa rocosa de las dos islas principales de las Islas Cíes. El objetivo de este primer trabajo es comprobar si los perfiles de zonación vertical difieren en presencia, posición sobre la roca y dominancia de especies según la exposición oceánica y posición geográfica dentro del Parque Nacional de las Islas Cíes.

LOCALIZACIÓN DE LAS ISLAS CÍES

La Ría de Vigo está situada en la costa atlántica de España, que es el límite entre los regímenes subpolar y templado del sistema de afloramiento costero del Atlántico Norte Oriental. El afloramiento estacional ocurre de abril a octubre. La Ría de Vigo está parcialmente encerrada en su parte más externa por tres islas naturales, las Islas Cíes, que proporcionan protección hacia el interior de la ría. (Figura 1). Estas islas tienen el estatus de Parques Naturales Gallegos desde 1980, y la de Parque Nacional desde 2002 (de Castro *et al.*, 2000; Costas *et al.*, 2002; Bernárdez *et al.*, 2006; Diz *et al.*, 2006).

La profundidad máxima al sur de las Islas Cíes es de 53 m y en la entrada norte es de 30 m. Frente a la costa oeste de las Islas Cíes, el fondo está cerca de los 100 m (García-García *et al.*, 2005). La amplitud de las mareas es de 2 a 3 m durante las mareas muertas y primaverales, como en la mayoría de las Rías Gallegas (de Castro *et al.*, 2000). Las dos islas del norte, I. Norte e I. del Medio, también conocida como Isla del Faro, que para simplificar a partir de ahora llamaremos Isla Norte (Figura 1), están conectadas en el margen oriental con un sistema de barrera de arena de 1 km de longitud (Playa de Rodas), que confina una laguna poco profunda (Costas *et al.*, 2002). Las

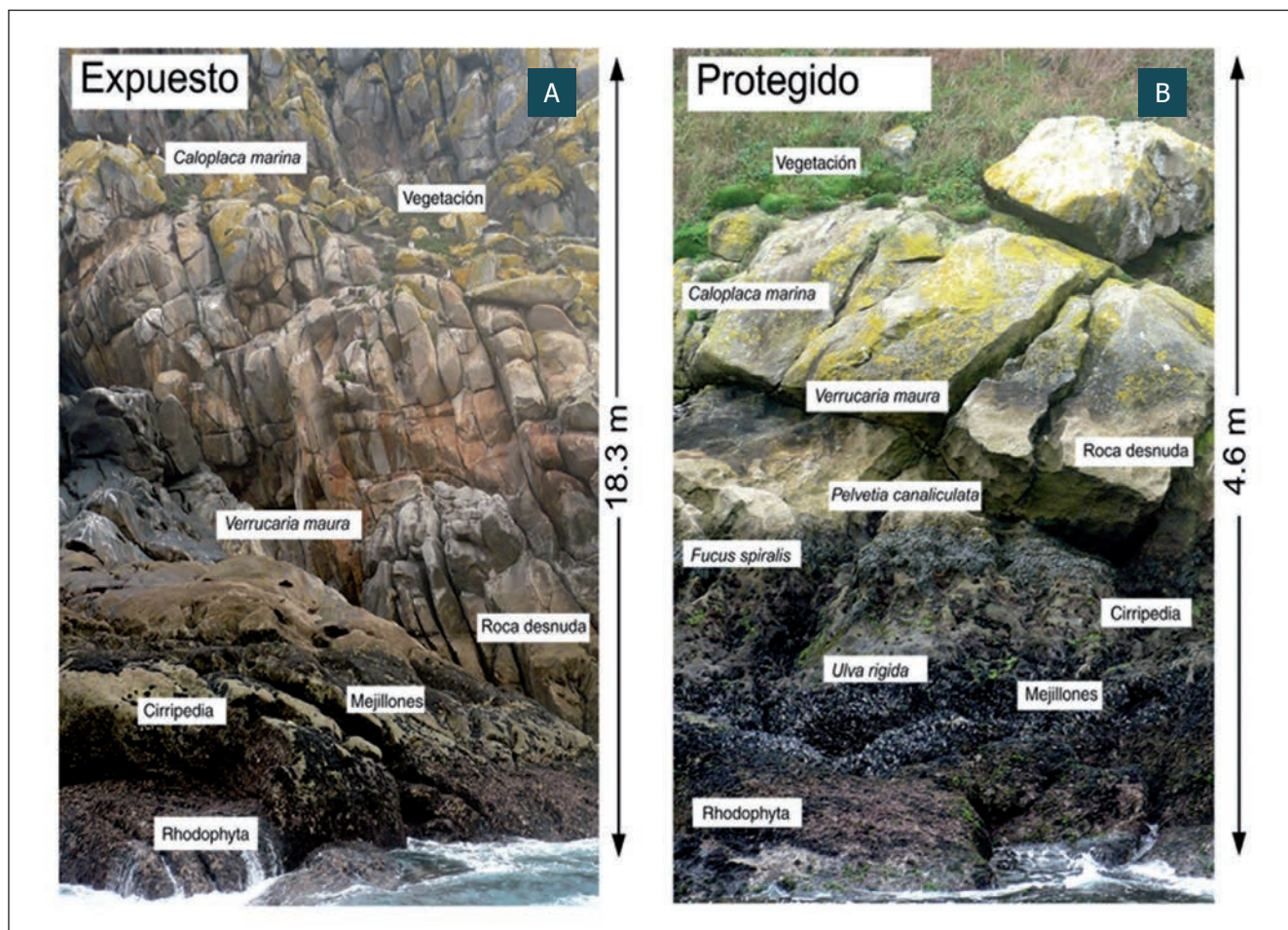


Figura 3. Zonación vertical de los organismos sésiles en la costa rocosa de las Islas Cíes. A) Zona expuesta. B) Zona protegida. En la zona protegida de la influencia oceánica, se observa un mayor número de bandas de organismos en un menor espacio vertical.

paredes verticales de las Islas Cíes están formadas por rocas graníticas (García-García *et al.*, 2005; Vilas-Paz *et al.*, 2005). Alrededor del 20% de la superficie emergida corresponde a pronunciados acantilados (Acuña-Castroviejo *et al.*, 1984). El lado occidental de las Islas Cíes interrumpe la propagación de las olas producidas durante las tormentas. Estas olas tienen una altura de 7 m y 16 s de periodo (Queralt *et al.*, 2002). En la Figura 1, los sitios 14 a 19 y 29 a 40 reciben olas de baja energía y los sitios 1 a 13 y 20 a 28 representan una costa alta batida por las olas (expuesta directamente a la influencia oceánica); esta clasificación sigue a la de Acuña-Castroviejo *et al.* (1982) y Queralt *et al.* (2002) en sus estudios del submareal y del patrón de ola respectivamente.

METODOLOGÍA GENERAL

La costa rocosa de las islas del sur y del norte del Parque Nacional de las Islas Cíes (NW de España) fue muestreada

en la bajamar de primavera, los días 28 de febrero y 14 de marzo de 2009 respectivamente. La costa alrededor de las islas se dividió en 40 secciones (Figura 1); Esas secciones fueron fotografiadas desde la embarcación tipo planeadora, Ctenoplana, perteneciente al grupo de Adaptaciones de Animales Marinos de la Universidad de Vigo (ADAM). En cada sección, se tomaron varias fotografías con una cámara digital. Se tomaron un total de 482 imágenes, cada una desde un punto independiente de la pared de la costa rocosa. Los encuadres abarcaban la pared de roca desde el bajo nivel del mar hasta la línea de vegetación vascular. Se utilizó la altura (~35 cm) de la gaviota *Larus cachinnans*, capturada en el primer plano de cada imagen (Figura 2), para calibrar la escala espacial de las imágenes y convertir las coordenadas x-y de los píxeles en una escala métrica.

En Sibaja-Cordero, 2008; Sibaja-Cordero & Troncoso, 2011 y Troncoso & Sibaja-Cordero, 2011 se describe con todo detalle

la metodología utilizada para el tratamiento de las imágenes y para los análisis estadísticos.

RESULTADOS

La figura 3 básicamente resume el perfil vertical que podemos encontrar en la costa expuesta y protegida del Parque Nacional Islas Cíes. En general, los primeros centímetros del submareal presentaron varias especies de algas rojas (*RHODOPHYTA*). El predominio de especies dentro de esta franja del intermareal varía entre la costa expuesta o protegida. Por ejemplo, *Asparagopsis armata* formó parches densos en la cara protegida de ambas islas y las algas verde (*CHLOROPHYTA*) se encontraron principalmente en parches en el infralitoral protegido.

Los mejillones y percebes están presentes por encima de la franja de algas. Por encima de estas bandas y en las costas expuestas, hay una franja intermitente de roca desnuda; en las caras protegidas, encontramos un cinturón de algas fucáceas justo debajo de esta franja de roca desnuda. *Asparagopsis armata* y *Bifurcaria bifurcata* se encontraban principalmente en la costa protegida de ambas islas. Estas especies ocupan una posición más alta en la zona intermareal de la costa protegida de la isla norte. La zona alta de las orillas expuestas

o protegidas presentó el líquen negro, *Verrucaria maura* y el líquen naranja, *Caloplaca marina*. La costa abrigada presentó más complejidad en el perfil vertical, es decir, había más especies y un mosaico más diversificado de bandas y parches de organismos.

Los límites en la distribución vertical de la mayoría de los organismos tienden a situarse en las zonas más altas en las caras expuestas, como pueden ser los cinturones de *RHODOPHYTA*, mejillones, percebes, líquenes y vegetación vascular (Figura 4). Además, la anchura de los cinturones de especies, estaba más comprimida en la costa protegida de ambas islas (Figura 4).

El análisis clúster mostró dos grupos principales de zonación vertical, sobre todo debido a las diferencias en la exposición del océano (Figura 5a). La ordenación del PCoA mostró un patrón similar, con las secciones de costa protegida en un lado de la representación gráfica, y secciones de la costa expuesta en el lado opuesto (Figura 5b). El grupo central (Figura 5a) presentó perfiles de ambas condiciones de exposición al océano. Las secciones 14, 21, 28, 29 y 40 (Figura 6) son áreas de transición entre la condición totalmente expuesta y la protegida. Las secciones expuestas 9, 10 y 11, se agruparon con las secciones protegidas; la ordenación PCoA mostró el

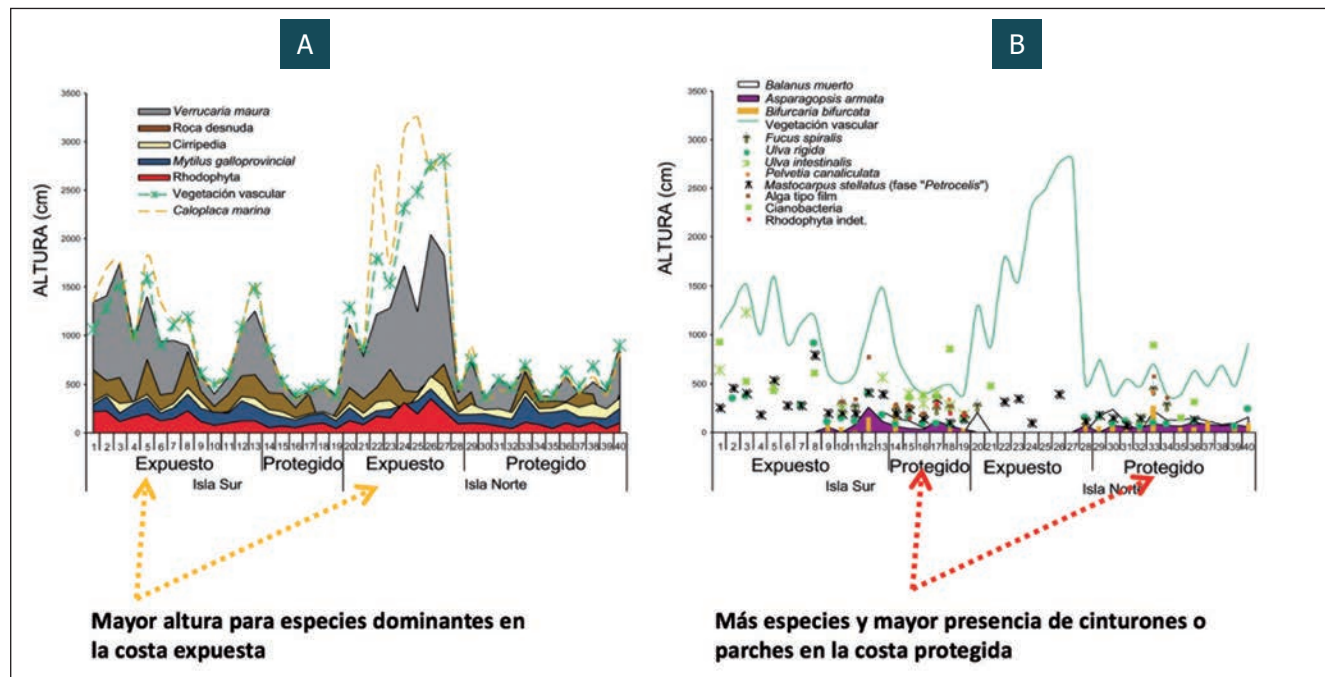


Figura 4. Zonación vertical de los organismos sésiles. Media de altura tomada en marea baja con sus límites de distribución superior e inferior para cada una de las secciones de costa rocosa de las Islas Cíes (1 a 40). A) Organismos con distribución en bandas. B) Organismos con distribución en parches.

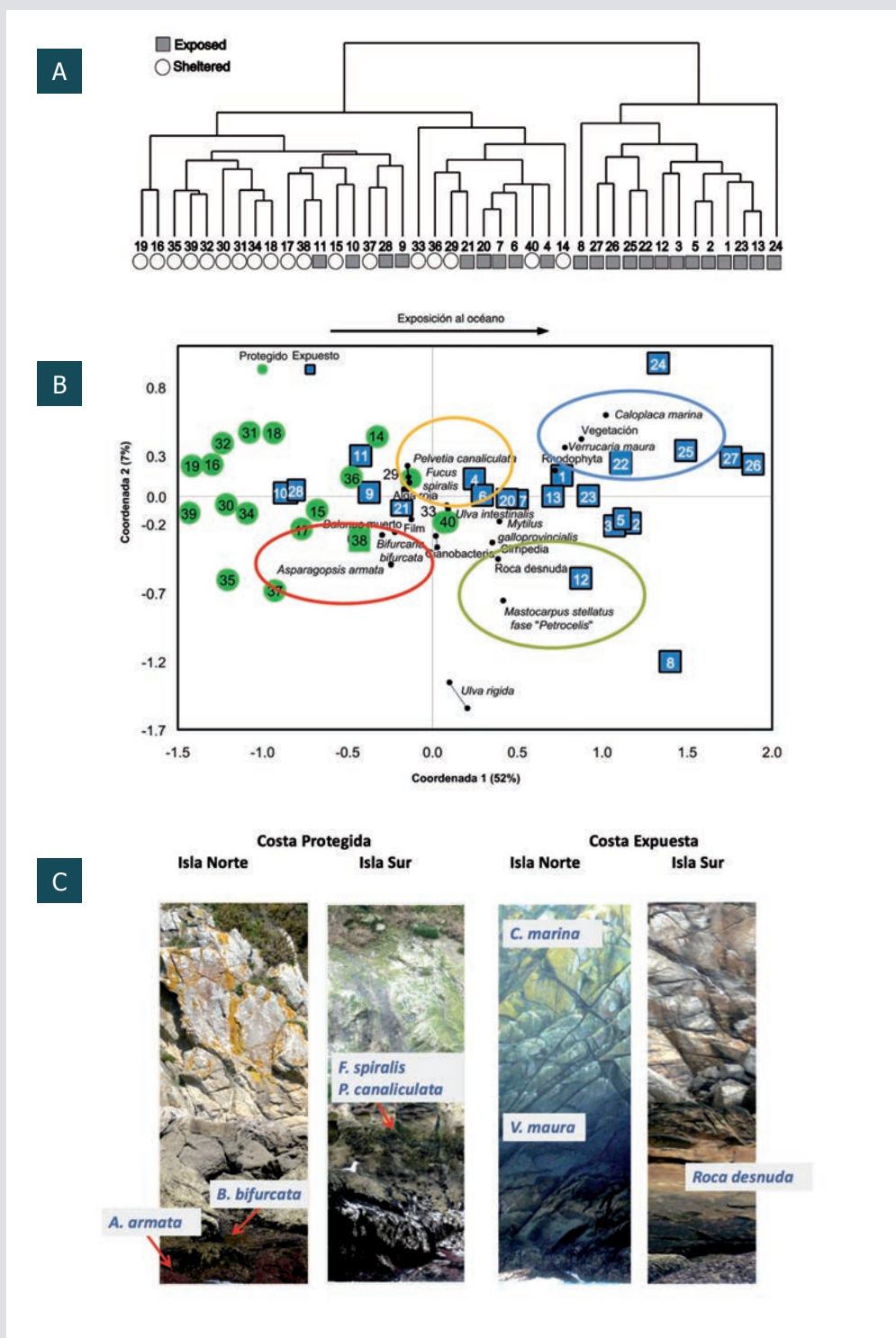


Figura 5. A) Análisis clúster. B) Análisis de Coordenadas Principales, ambas basadas en una matriz de distancias Euclídeas de la media de altura de los organismos en la costa rocosa. C) *A. armata* y *B. bifurcata* caracterizan la costa protegida norte; *P. canaliculata* y *F. spiralis* caracterizan la costa protegida sur; los líquenes, *V. maura* y *C. marina* y la banda de rodofitas tiene su límite superior más alto en la costa expuesta norte; la roca desnuda y la franja de *Mastocarpus stellatus* tienen mayor presencia y ocupan una posición más alta en la costa expuesta sur.

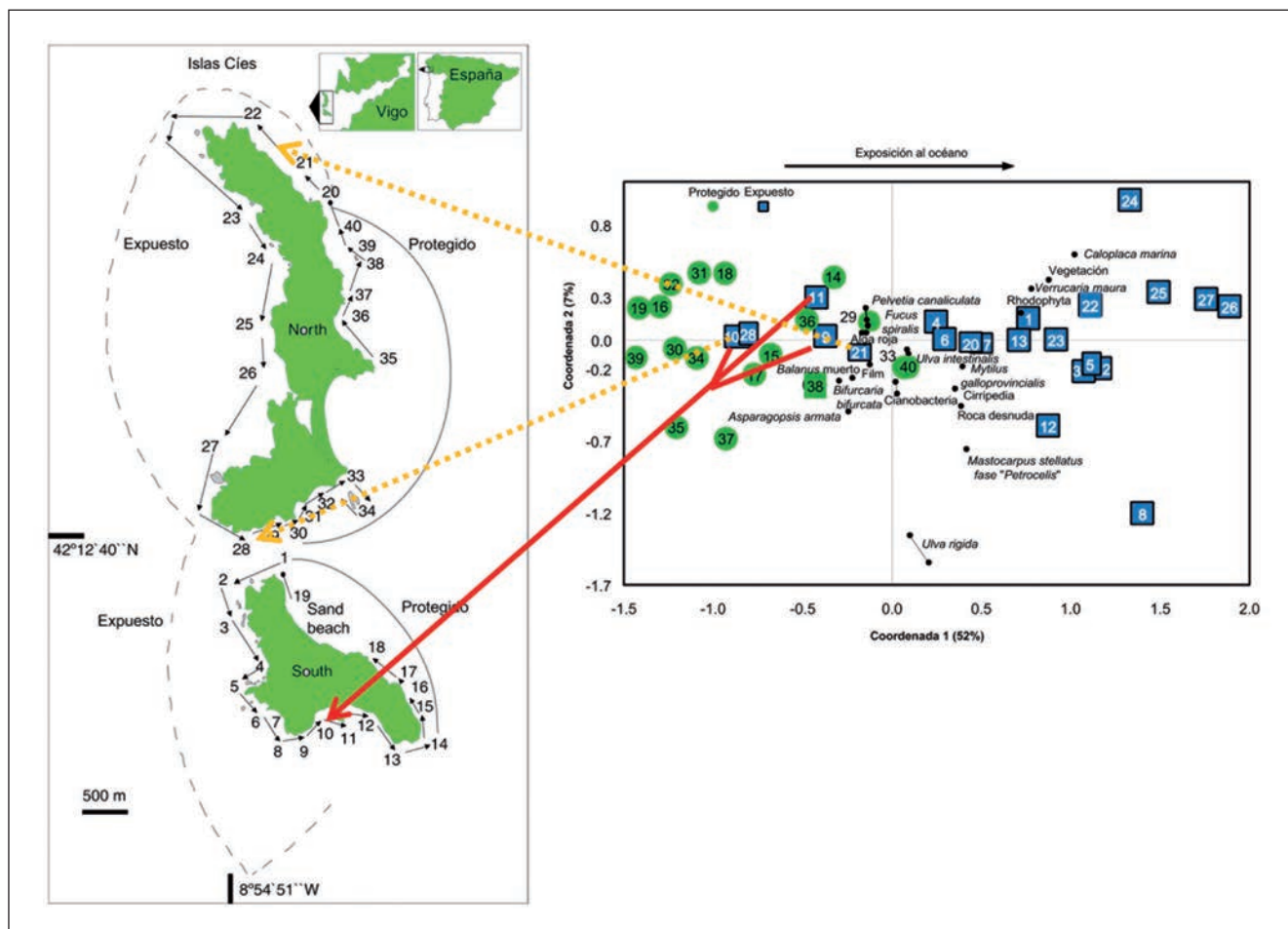


Figura 6. Ordenación PCoA y ubicación en el mapa. Enseada de Concela: Sitios 9-11 protegidos del viento durante el invierno. Sitios 21 y 28 representan zonas de transición del tipo de influencia oceánica.

mismo patrón (Figura 5B). Estas secciones se encuentran en una pequeña ensenada costera llamada Enseada de Concela situada en la isla sur (Figura 6). El límite intermareal superior de los organismos fue menor en estos sitios (Figura 4A; B), lo que indica un menor grado de exposición al Océano Atlántico. Las secciones 33 y 36 fueron mejor ordenadas en el PCoA por su condición protegida que en el análisis clúster (Figura 5A; B).

El análisis ANOSIM mostró que la exposición al océano fue un factor significativo en la determinación de diferentes patrones de zonación vertical de organismos sésiles ($R = 0,55$, $p < 0,0001$). La ordenación de los organismos en el PCoA (Figura 5B) muestra que los invertebrados, algas rojas y líquenes tenían mayores límites de distribución vertical en la orilla expuesta (Figura 5C). Por otra parte, *A. armata*, *B. bifurcata*, *Fucus spiralis* y *Pelvetia canaliculata* estaban

presentes principalmente en la costa protegida (Figuras 4; 5B; C). La segunda coordenada en el PCoA (Figura 5B) mostró una ligera separación de secciones (perfiles verticales) de acuerdo a la isla en la que se encuentran. Esta tendencia espacial se corrobora con el test ANOSIM ($p = 0,037$), pero el grado de diferencia es bajo ($R = 0,13$). Los perfiles en la Figura 4 revela que *B. bifurcata* ocurre en más secciones en la isla norte. Por otra parte, las algas *P. canaliculata* y *F. spiralis* mostraron una ordenación positiva en la segunda coordenada, lo que sugiere que estas algas están asociadas principalmente con la cara protegida de la isla sur, alcanzando en esa zona su altura más alta en el intermareal; de hecho, ambas especies estaban presentes en más secciones en esta isla (Figura 4).

La característica principal compartida entre las zonas expuestas era el límite superior de la distribución vertical de la banda de RHODOPHYTA y el líquen negro *V. maura*, siendo

este límite más alto en la isla norte, así como los del líquen *C. marina* y la vegetación vascular (Figura 4), en el PCoA este grupo ocupaba posiciones cerca de las secciones más expuestas del norte (Figura 5B). *Petrocelis*, la fase incrustante de *Mastocarpus stellatus* y la franja de roca desnuda tenían su límite superior más alto de distribución vertical en las secciones 2, 3, 5, 8 y 12 de la cara expuesta de la isla sur (Figuras 4 y 5).

DISCUSIÓN

La comunidad de organismos encontrada en esta época del año en las Islas Cíes y su patrón de zonificación vertical, fueron similares en su posición relativa y en la dominancia de las especies en el intertidal de las costas rocosas templadas descritas para Gran Bretaña (Little y Smith, 1980; Little y Mettam, 1994, Mettam, 1994).

Este patrón de aumento de la distribución vertical de las especies intertidales en las zonas con alta exposición al oleaje que encontramos en la costa rocosa de Islas Cíes, se ha reportado también en otras áreas intertidales; se trata de un patrón que se repite en otras zonas rocosas intermareales del planeta (Underwood, 1981). En la costa expuesta de ambas islas, las especies que se asientan en la parte alta del intermareal forman grandes franjas. Como era de esperar, las técnicas multivariantes indicaron separaciones claras entre las costas intermareales expuestas y protegidas. Los perfiles verticales de las orillas expuestas y abrigadas presentaron diferencias en las agrupaciones de especies, pe. las algas erectas y foliares estuvieron presentes principalmente en la costa protegida. Otra diferencia entre costa expuesta y protegida fue que la altura más alta en la presencia de especies se produce en la pared de roca expuesta.

La distribución vertical de las especies litorales en la costa protegida de Islas Cíes presentó similitudes con zonas del norte de Portugal (Araújo *et al.*, 2005). Las olas, al no alcanzar los niveles altos del intermareal reduce el asentamiento de las especies en el norte del país vecino (Araújo *et al.*, 2005). En nuestro caso, más organismos marinos ocurrieron en el intertidal de la costa abrigada de las Islas Cíes. La comunidad era más compleja en la cara protegida de la isla sur con más especies sésiles coexistentes en las paredes de roca. El litoral medio y alto de la cara protegida de la isla del sur contenía varios parches de algas, líquenes y biofilms bacterianos que en las otras caras de las islas. De igual manera, Wallenstein *et al.* (2008) encontró, para las islas de las Azores, que la asociación entre los organismos y la altura en la que se ubican, difiere geográficamente entre las islas.

Los posibles cambios en otras especies intermareales pueden relacionarse con disturbios puntuales como herbivorismo o fuerte oleaje, que reducen la productividad de las especies más dominantes (Menge y Farrel, 1989). En las Islas Cíes, los patrones de oleaje influyen en la comunidad intertidal, a diferencia de lo que pasa en las islas Azores, donde la exposición a las olas es un factor secundario en la regulación de la zonificación vertical. Las dos islas del Archipiélago de las Azores, estudiadas por Wallenstein *et al.* (2008) no presentaron hábitats protegidos. Por otra parte, existe cierta variación entre las islas de Santa María y São Miguel del Archipiélago de Azores (Wallenstein *et al.*, 2008); este patrón es similar al encontrado en nuestro estudio. En las Islas Cíes, la cara de las islas con el mismo grado de exposición mostró ligeras diferencias estructurales en los perfiles de zonación vertical. Los accidentes geográficos como bahías, puntas o calas fueron abundantes y la influencia del viento y la luz solar varía entre los sitios (Vilas-Paz *et al.*, 2005). De esta manera, existen diversos micro hábitats en las Islas Cíes que influyen en la composición de las especies, y a su vez, en la altura de estas en el intertidal. La heterogeneidad espacial en Islas Cíes parece ser un factor crucial en la determinación de las comunidades costeras rocosas, hecho este encontrado también por Wilding *et al.* (2010) para Escocia, Reino Unido y Kostylev *et al.* (2005) para Hong Kong.

El viento dominante en las Islas Cíes proviene del norte en verano y del sudoeste en invierno (Vilas-Paz *et al.*, 2005). En general, los vientos también contribuyen en las orillas rocosas a crear fuerte oleaje (Little y Kitching, 1996). La cara oriental de las Islas Cíes estaba protegida de las olas y los fuertes vientos durante todo el año. Los sitios 20 (Faro do Peito) a 22 (Punta do Cabalo) en la isla norte fueron directamente expuestos a los vientos en verano y esto podría explicar por qué las algas fucáceas estaban prácticamente ausentes. Otro factor que puede explicar la reducción de la población de fucáceas en los sitios 21 a 22 es que en octubre una corriente de salida de la Ría de Vigo con alta turbulencia de agua alcanzó la boca norte de la ría, muy cerca de la orilla de la isla norte del Archipiélago de Cíes (Souto *et al.*, 2001). Los perfiles costeros protegidos fueron evidentes desde el sitio 14 (Faro do Bicos) al sitio 19 (Punta Pau de Bandeira) con alta presencia de algas fucáceas. Niell (1977) encontró que en Galicia, *P. canaliculatus* se encuentra en las costas batidas y azotadas por el viento. De hecho, Jones y Demetropoulos (1968) indicaron que *Fucus spiralis* no es tolerante a las fuertes condiciones hidrodinámicas. Las fucáceas ocurren en la cara expuesta de la isla sur, pero en los sitios 10 y 11 en la Enseada de Concela, que es una cala protegida de las olas y los vientos del suroeste en invierno. Las salpicaduras producidas por el

oleaje en la cara norte, puede ayudar al asentamiento de algunos organismos intertidales en las zonas más altas en los acantilados rocosos (Little y Kitching, 1996). El líquen, *V. maura*, alcanza niveles más altos desde el sitio expuesto 24 (Punta do Chancelos) hasta 27 (Punta do Príncipe) en la isla norte. Por otra parte, el líquen naranja en su mayoría terrestre, *C. marina* y la vegetación vascular se encontraban 24 m por encima del límite de marea baja en esta sección de la costa. A esta altura, plantas vasculares como *Armenia* y *Crithmum* crecen como alfombras dispersas y pueden tolerar las elevadas salinidades que allí se encuentran (Vilas-Paz *et al.*, 2005). La humedad alta producida por las salpicaduras con efecto spray en las caras expuestas de las Islas Cíes, aumentó el asentamiento de varias especies oportunistas en la parte más alta del intermareal. Los parches de *Ulva intestinalis*, cianobacterias y *M. stellatus* ocurren más arriba en estas caras del Archipiélago. En la costa intertidal muy expuesta de la Ría de Corme y Laxe (Niell, 1978), la franja de algas rojas y la banda de mejillones está presente desde el nivel de marea baja hasta los 3 m de altura, lo que concuerda con nuestros resultados para las Islas Cíes. Por encima de la marca de 3 a 4,5 m, Niell (*opus cit.*) también encontró percebes y el líquen negro, *V. maura*. En la cara expuesta de las Islas Cíes, este líquen negro puede, sin embargo, alcanzar la marca de 15 m por encima del nivel de marea baja en la mayoría de los sitios. En la Ría de Corme e Laxe, el líquen naranja, *C. marina*, se encuentra entre 4,5 y 6,5 m; y en la cara expuesta de las Islas Cíes se distribuye siempre por encima de 10 m de altura. El perfil vertical de distribución de los organismos intermareales en la Ría de Camariñas (Niell, 1978), es también similar al encontrado por nosotros en la cara expuesta de las Islas Cíes, siendo ambos sitios caracterizados por la presencia tanto de *V. maura* como de mejillones en niveles intertidales más altos, característica ésta no encontrada en otras zonas del intermareal rocoso estudiadas.

CONCLUSIONES Y LÍNEA FUTURA

En el momento del muestreo, en cada una de las caras de la isla, se encontraron cuatro diferentes patrones de zonificación vertical. Las algas, *A. armata* y *B. bifurcata* caracterizaron la cara protegida de la Isla Norte. Por otro lado, *P. canaliculata* y *F. spiralis* tuvieron una mayor presencia en el lado protegido de la Isla Sur. En los lados expuestos de la Isla Norte, los líquenes, *V. maura* y *C. marina* y la franja de RHODOPHYTA, presentaron sus límites de distribución superior en zonas muy altas del intermareal. La roca desnuda y la fase incrustante de *M. Stellatus* estuvieron bien representadas en el lado expuesto de la Isla Sur. El fuerte oleaje y los vientos dominantes fueron

posiblemente los factores condicionantes de la estructura de la comunidad. Por otra parte, las zonas de transición, los accidentes geográficos y la pendiente de la orilla, también pudieron contribuir a explicar las diferencias tanto en la distribución de la comunidad como su ubicación en una determinada altura del intertidal rocoso.

Los resultados presentados en este artículo caracterizan la distribución espacial de los principales organismos intermareales de sustratos duros, aportando datos de su ubicación en altura para todo el perímetro litoral de las Islas Cíes, los muestreos se realizaron en una determinada época del año, y por lo tanto deben ser tratados como lo que es, una "foto" de la distribución de los organismos en este periodo temporal. Son necesarios futuros trabajos en las demás épocas del año para poder conocer la variabilidad de los organismos en un ambiente tan dinámico como pueden ser las costas rocosas.

REFERENCIAS

1. Acuña-Castroviejo R, Durán-Neira C, Rodríguez-Solórzano M, Sanjuán-López A (1984). Campañas de estudio del macrobentos infralitoral rocoso en el parque natural de las islas Cíes (NW de España). II. Actas IV Simp. Ibér. Estud. Benthos Mar., 1: 287-305.
2. Araújo R, Bárbara I, Sousa-Pinto I, Quintino V (2005). Spatial variability of intertidal rocky shore assemblages in the northwest coast of Portugal. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 64: 658-670.
3. Bernárdez P, Francés G, Prego R (2006). Benthic-pelagic coupling and postdepositional processes as revealed by the distribution of opal in sediments: The case of the Ría de Vigo (NW Iberian Peninsula). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 68: 271-281.
4. Besteiro-Rodríguez MC (2004). Evaluación del Impacto en las comunidades y especies de interés comercial y ecológico en las zonas costeras. Periodo Primavera. 2003. Informe Final. Programa Nacional: Acción Urgente Prestige-Recursos Naturales. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Galicia.
5. Bird E (2008). Coastal geomorphology: an introduction. 2ª ed. John Wiley and Sons. West Sussex, England. p. 411.
6. Chapman ARO (1974). The Ecology of Macroscopic Marine Algae. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 5: 65-80.
7. Clarke KR, Warwick RM (1994). Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. Bourne, England, p. 144.
8. Connell JH (1972). Community interactions on marine rocky intertidal shores. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 3: 169-192.
9. Costas S, Alejo I, Alcántara-Carrión J (2000). Human Influence on the Evolution of Islas Cíes Sand Barrier (NW Spain). In: EUROCOAST (ed). Littoral 2002, The Changing Coast. EUROCOAST/EUCC. Porto, Portugal. pp. 283-287.
10. de Castro M, Gómez-Gesteira M, Prego R, Taboada JJ, Montero P, Herbello P, Pérez-Villar V (2000). Wind and Tidal Influence on Water Circulation in a Galician Ría (NW Spain). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 51: 161-176.
11. Diz P, Francés G, Rosón G (2006). Effects of contrasting upwelling-downwelling on benthic foraminiferal distribution in the Ría de Vigo (NW Spain). *J. Mar. Syst.*, 60: 1-18.
12. Ellis DV (2003). Rocky shore intertidal zonation as a means of monitoring and assessing shoreline diversity recovery. *Mar. Poll. Bull.*, 46: 305-307.
13. Fischer R (1981). Bioerosion of basalt of the Pacific coast of Costa Rica. *Senckenb. Mar.*, 13: 1-41.
14. García-García A, García-Gil S, Vilas F (2005). Quaternary evolution of the Ría de Vigo, Spain. *Mar. Geol.*, 220: 153-179.
15. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.*, 4: 1-9.
16. Jones WE, Demetropoulos A (1968). Exposure to wave action: measurements of an important ecological parameter on rocky shores on Anglesey. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 2: 46-63.
17. Kostylev VE, Erlandsson J, Ming MY, Williams GA (2005). The relative importance of habitat complexity and surface area in assessing biodiversity: Fractal application on rocky shores. *Ecol. Complexity*, 2: 272-286.
18. Legendre P, Gallagher ED (2001). Ecologically meaningful transformations for ordinations of species data. *Oecologia*, 129: 271-280.
19. Little C, Kitching JA (1996). The Biology of Rocky Shores. Oxford, England. p. 240.
20. Little C, Mettam C (1994). Rocky shore zonation in the Rance tidal power basin. *Biol. J. Linnean Soc.*, 51: 169-182.
21. Little C, Smith LP (1980). Vertical Zonation on Rocky Shores in the Severn Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 11: 651-669.
22. Menge BA (1976). Organization of the New England Rocky Intertidal Community: Role of Predation, Competition, and Environmental Heterogeneity. *Ecol. Monogr.*, 46: 355-393.
23. Menge BA, Daley BA, Wheeler PA, Dahlhoff E, Sanford E, Strub PT (1997). Benthic-pelagic links and rocky intertidal communities: Bottom-up effects on top-down control? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 14530-14535.
24. Menge BA, Farrell TM (1989). Community structure and interaction webs in shallow marine hard-bottom communities: test of an environmental stress model. *Adv. Ecol. Res.*, 19: 189-262.
25. Menge BA, Foley MM, Pamplin J, Murphy G, Pennington C (2010). Supply-side ecology, barnacle recruitment, and rocky intertidal community dynamics: Do settlement surface and limpet disturbance matter? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 392: 160-175.
26. Mettam C (1994). Intertidal zonation of animals and plants on rocky shores in the Bristol Channel and Severn Estuary-the northern shores. *Biol. J. Linnean Soc.*, 51: 123-147.
27. Niell FX (1977). Distribución y zonación de las algas bentónicas en las facies rocosas del sistema intermareal de las Rías Bajas Gallegas. *Invest. Pesq.*, 41: 219-237.
28. Niell FX (1978). Catálogo florístico y fenológico de las algas superiores y cianofíceas bentónicas de las Rías Bajas Gallegas. *Invest. Pesq.*, 42: 365-400.
29. Olabarria C, Rodil IF, Incera M, Troncoso JS (2009). Limited impact of *Sargassum muticum* on native algal assemblages from rocky intertidal shores. *Mar. Environ. Res.*, 67: 153-158.
30. Pereira SG, Lima FP, Queiroz NC, Ribeiro PA, Santos AM (2006). Biogeographic patterns of intertidal macroinvertebrates and their association with macroalgae distribution along the Portuguese coast. *Hydrobiologia*, 555: 185-192.
31. Pérez-Cirera JL (1975). Notas sobre la vegetación ficológica bentónica de la Ría de Cedeira (NO. de España). *Anales Inst. Bot. Cavanilles*, 32: 161-171.
32. Pérez-Cirera JL (1978). Notas sobre la vegetación bentónica del litoral de la Península Ibérica. I. Las comunidades de *Ceramium shuttleworthianum* (Kütz.) Rabenh. y *Callithamnion granulatum* (Ducluz.) C. Ag. de zonas batidas del Atlántico. *Anales Inst. Bot. Cavanilles*, 35: 5-28.
33. Queralt S, Rodríguez-Fernández N, Bernabeu AM, Rey D, Vilas F (2002). Características morfo-sedimentarias de las playas de la Ría de Vigo: influencia de las condiciones hidrodinámicas. *Geogaceta*, 32: 211-214.
34. Quinn GP, Keough MJ (2003). Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge Univ., Cambridge. p. 537.
35. Schiel DR (2004). The structure and replenishment of rocky shore intertidal communities and biogeographic comparisons. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 300: 309-342.
36. Sibaja-Cordero JA (2008). Vertical zonation in the rocky intertidal at Cocos Island (Isla del Coco), Costa Rica: A comparison with other tropical locations. *Rev. Biol. Trop.*, 56 (2): 171-187.
37. Sibaja-Cordero JA & Troncoso, JS (2011). Upper and lower limits of rocky shore organisms at different spatial scales and wave exposure (Islas Cíes, NW Spain). *Thalassas*, 27 (1): 81-100.
38. Souto C, Fariña-Busto L, Alvarez E, Rodríguez I (2001). Wind and tide current prediction using a 3D finite difference model in the Ría de Vigo (NW Spain). *Sci. Mar.*, 65 (Suppl 1): 269-276.

39. Troncoso, JS & Sibaja-Cordero JA (2011). Spatial pattern of vertical zonation of rocky shore organisms and the influence of ocean exposure at the Islas Cíes (NW Spain). *Journal of Oceanography and Marine Science*, Vol. 2(2): 23-31.
40. Underwood AJ (1981). Structure of a rocky intertidal community in New South Wales: patterns of vertical distribution and seasonal changes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 51: 57-85.
41. Vilas-Paz A, Gamallo-Liste B, Framil-Barreiro J, Bonache-López J, Sanz-Ochoa K, Lois-Silva M, Toubes-Porto M (2005). Atlantic Islands of Galicia National Terrestrial-Maritime Park. Galicia. Visitor's Guide. Autonomous Body for National Parks. Galicia. p. 303.
42. Wallenstein FFMM, Neto AI (2006). Intertidal rocky shore biotopes of the Azores: a quantitative approach. *Helgol. Mar. Res.*, 60: 196-206.
43. Wallenstein FM, Neto AI, Álvaro NV, Santos CI (2008). Algae-based biotopes of the Azores (Portugal): spatial and seasonal variation. *Aquat. Ecol.*, 42: 547-559.
44. Wilding TA, Palmer EJJ, Polunin NVC (2010). Comparison of three methods for quantifying topographic complexity on rocky shores. *Mar. Environ. Res.*, 69: 143-151.

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE DOBLE TINCIÓN PARA LA DEMOSTRACIÓN SIMULTÁNEA DE ASTROCITOS Y MICROGLÍA EN BULBO OLFATIVO

A. Ardid de Cabo, P. Molist.

Área de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidade de Vigo. 36310. Vigo. pmolist@uvigo.es

RESUMEN

Este trabajo se centra en la técnica de marcaje de células gliales (astrocitos y microglía) procedentes de bulbos olfativos humanos. Para el caso de los astrocitos se utilizó el método inmunocitoquímico con el anticuerpo anti-GFAP (proteína gliofibrilar ácida), sabiendo que en estas células se encuentra una gran cantidad de esta proteína. Sin embargo, la tinción de la microglía se realizó usando dos tipos de lectinas: *Lycopersicon esculentum* (TL) y *Ricinus communis* (RCA-I). Mediante esta técnica se mejoró la diferenciación cromática de las células gliales en comparación con el método de Villacampa *et al.* (2013).

ABSTRACT

This paper focuses on the marking technique of glial cells (astrocytes and microglia) obtained from human olfactory bulbs. For the case of astrocytes it was applied the conventional method of staining with anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein). These kind of cells contain a large amount of this protein. However, for the case of microglia, staining was performed using two different types of lectins: *Lycopersicon esculentum* (TL) and *Ricinus communis* (RCA-I). In this process it was improved the chromatic differentiation of glial cells in comparison with the method of Villacampa *et al.* (2013).

INTRODUCCIÓN

Rudolf Vichow descubrió la glía en 1859 y la describió como una especie de pegamento que mantenía unido las neuronas, considerándola, por tanto, células meramente de soporte. Sin embargo, Virchow no distinguía entre los diferentes tipos de

células gliales. El desarrollo de nuevas técnicas de tinción permitió a Pío del Río Hortela (1918, 1920), un discípulo de Santiago Ramón y Cajal, encontrar tres tipos de células: microglía, astrocitos y oligodendrocitos. Con la excepción de algunos subtipos nuevos esta clasificación ha sido mantenida hasta la actualidad (Krebs *et al.*, 2014).

A pesar de que los científicos sabían que las neuronas representaban el 15% de los elementos celulares frente al 85% de glía, estas últimas permanecieron ajenas a la investigación hasta los años 90, cuando los estudios sobre la función de los distintos tipos celulares crecieron de manera exponencial. En esta última década la idea de que un subtipo de astrocito pueda intervenir en el procesamiento de información va ganando terreno (Krebs, 2014).

Otro descubrimiento importante con respecto a las células gliales fue encontrar una implicación de la microglía y los astrocitos en numerosas neuropatologías (Fields, 2014). Derivado de esta relación, se le llamó reactividad glial a los cambios morfológicos y funcionales que sufren estos dos tipos celulares ante cualquier anomalía en el sistema nervioso (Gómez & Nieto, 2008; Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

En este sentido un método de doble tinción para poder distinguir ambos tipos celulares en la misma sección de tejido, sería de gran utilidad para estudiar los cambios morfológicos que sufren los astrocitos y la microglía ante cualquier daño del sistema nervioso.

En el estudio de Castellano *et al.* (1991) se describe una técnica de doble tinción para la demostración simultánea de astrocitos y microglía en secciones de cerebro, utilizando por una parte una técnica histoenzimática para las células microgliales e inmunohistoquímica para astrocitos. El avance en las técnicas

TABLA 1. COMPARACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE LOS DOS MÉTODOS DE DOBLE TINCIÓN

MÉTODO VILLACAMPA ET AL. (2013)	MÉTODO DISEÑADO EN ESTE ESTUDIO
Cortes criostato en OS o desparafinado	Desparafinado
Lavados TBS 0,05 M 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05M 3 x 10 min
Bloqueo EPBS 10 min	Preincubación en BSA 1% 1h
Lavados TBST 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05M 3 x 10 min
Bloqueo unión con BBS 1 h	-
Incubar Ac 1° anti-GFAP 1:1800 en BBS toda la noche 4 °C	Incubar Ac 1ª anti-GFAP 1:1000 en TBS 0,05M toda la noche 4°C
Lavados TBST 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05M 3 x 10 min
Incubar Ac 2° antirabbit-Ig biotinilado en BBS 1:500 1 h	Incubar Ac 2ª antirabbit-Ig fosfatasa alcalina (AP) 1:75 1h
Lavados TBST 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05M 3 x 10 min
Incubar estreptavidina peroxidasa de rábano picante en BBS 1:500 1 h	-
Lavados TBST 3 x 10 min	-
Revelado con DAB sulfato níquel 3 min	Tampón de tinción 2 x 45 min
-	Incubar con tampón de revelado (oscuridad) (2 h, 30, 20, 15, 10, 7, 5 min)
Lavados TB 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05 M 3 x 10 min
Bloqueo EPBS 10 min	Inactivación peroxidasa 30 min
Lavados TBS 0,05M 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05 M 3 x 10 min
-	Preincubación en BSA 1% 1 h
Incubar lectina TL biotinilada en TBST 1:150 toda la noche 4 °C	Incubar lectina TL o RCA-I biotiniladas en TBS 0,05 M (12 µg/mL y 10 µg/mL respectivamente) toda la noche 4 °C
Lavados TBST 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05 M 3 x 10 min
Incubar estreptavidina peroxidasa de rábano picante en TBST 1 h	Incubar con ABC-kit (complejo avidina-biotina peroxidasa) 1:100 1 h
Lavados TBS 0,05M 3 x 10 min	Lavados TBS 0,05 M 3 x 10 min
Lavados TB 3 x 10 min	-
Revelado DAB 3 min	Revelado DAB en TBS 0,05 M 5 min
-	Lavados TBS 0,05 M 3 x 10 min
Lavado en agua destilada 3 min	Lavado en agua destilada 3 min
Contrateñir con azul de toluidina 1 min	-
Lavado en agua destilada 1 min	-
Deshidratar: H ₂ O _d , 50°, 70°, 90° e 3 x 100° (10 min cada uno)	Deshidratar: 70°, 80°, 96°, 100° (10 min cada uno)
Diferenciar con 1-butanol 1 min	-
Sumergir en xilol 2 x 2 min	Sumergir en xilol 2 x 5 min
Montar DPX 24 h	Montar DPX 24 h

histoquímicas usando lectinas presentaba ventajas con respecto a los marcadores enzimáticos (Almonda *et al.*, 2013). Así que Villacampa *et al.* (2013) diseñaron un método de doble tinción que combina la técnica inmunohistoquímica usando anticuerpos GFAP para detectar astrocitos, con el uso de la lectina de tomate específica para la microglía.

Por lo general, en las enfermedades neurodegenerativas se produce una afectación de distintas áreas cerebrales, provocando un deterioro cognitivo y funcional progresivo y asociándose con alteraciones claras de las estructuras nerviosas, entre las que se encuentra el bulbo olfativo (Ruan *et al.*, 2012).

El método diseñado en este trabajo se basa en la técnica descrita previamente por Villacampa *et al.* (2013) pero su finalidad era tratar de optimizar el sistema de revelado para conseguir una diferencia cromática mayor entre ambos tipos celulares. De esta manera se podría mejorar la calidad de la imagen y en consecuencia ayudaría a estudios cuantitativos posteriores.

MATERIAL

El tejido sometido a ensayo fueron bulbos olfativos humanos proporcionados por el Biobanco del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI) y cedidos por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Meixoeiro y, por la Fundación Centro de Investigación en Enfermedades Neurológicas (CIEN) en colaboración con el Instituto de Salud, Carlos III de Madrid.

La realización de este experimento se ajustó fielmente al convenio de concesión de muestras y permisos éticos para una correcta manipulación de muestras humanas. Estando recogidas en el *Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el*

que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos; publicado en el BOE del 5 de julio de 2014. En este decreto se contempla una modificación recogida en la Orden SSI/2057/2014, del 29 de octubre, mediante las que se modifican los anexos III, IV y V de dicho decreto.

La dificultad para la obtención de muestras nos obligó a reducir el tamaño muestral a $n=2$, pero la doble tinción se llevó a cabo no sólo en los bulbos olfativos sino también en el pedúnculo y porción más rostral de la corteza.

MÉTODO

Los tejidos fueron fijados en formaldehído al 10% durante dos días para posteriormente lavarlos en agua corriente una hora y deshidratarlos para su inclusión en parafina siguiendo el procedimiento convencional (Kiernan, 2008). Cortes de $8\mu\text{m}$ de espesor se procesaron con las dos técnicas que se describen en la tabla 1. Por un lado se siguió fielmente la técnica descrita por Villacampa *et al.* (2013) para comprobar la aplicación de la técnica en este tejido; y por otro, se utilizó la técnica diseñada por nosotras. En ambos casos la demostración simultánea de ambos tipos celulares se consigue mediante una técnica en dos pasos (Fig. 1): a) incubación inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-GFAP que tiñe los filamentos intermedios de los astrocitos y, b) incubación histoquímica con lectinas biotiniladas. En este caso se usaron la lectina de tomate (TL o LEL) que reconoce específicamente residuos de poli-N-acetilactosamina (oligómeros de N-acetilglucosamina) localizados en la membrana plasmática y citoplasma de la microglía (Villacampa *et al.*, 2013), o la lectina *Ricinus communis* (RCA-I) que reconoce preferentemente residuos de galactosa terminal y/o N-acetilgalactosamina.

MÉTODO DISEÑADO EN ESTE ESTUDIO

Los pasos que se siguen en este método se esquematizan en la tabla 1. En primer lugar se realiza el desparafinado e hidratación de las muestras, como es habitual mediante baños en xilol y en alcoholes de graduación decreciente respectivamente.

Una vez hidratadas las muestras se inicia la primera etapa del proceso para la identificación de astrocitos.

1. Tres lavados de 10 minutos cada uno en tampón tris salino (TBS) 0,05 M.

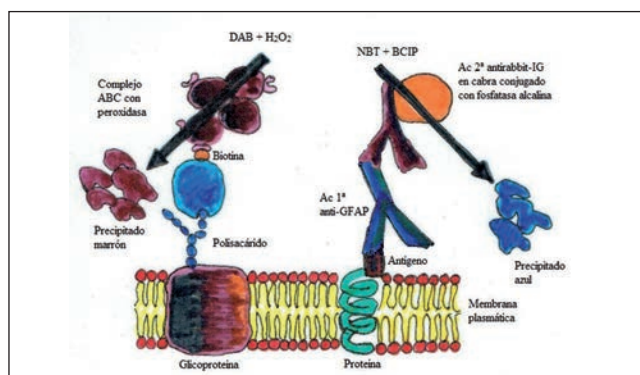


Figura 1. Representación de la disposición de las moléculas utilizadas en el método diseñado en este estudio. A la izquierda se esquematiza la tinción de la microglía y a la derecha la tinción de los astrocitos (Modificado de Molist *et al.*, 2011).

2. Se realiza una preincubación durante 1 hora en albúmina de suero bovino (BSA) al 1%. Esta solución de bloqueo tiene como finalidad saturar lugares donde se podría unir el anticuerpo de forma no específica.
3. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS 0,05 M.
4. Incubación con la inmunoglobulina anti-GFAP de conejo durante toda la noche a 4 °C y una concentración de 1:1000.
5. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS 0,05 M.
6. Incubación con un anticuerpo secundario que reconozca el primario. En este caso el anticuerpo es una Ig de cabra anticonejo y está marcado con la enzima fosfatasa alcalina. El tiempo de incubación es de 1 hora a una concentración de 1:75.
7. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS 0,05 M.
8. Tampón de tinción 2x 45 minutos (Tabla 2). Básicamente este tampón aporta un medio muy básico, sales y levamisol que ayudarán a la adaptación del tejido para el siguiente paso.

TABLA 2. COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE TINCIÓN PARA LA POSTERIOR VISUALIZACIÓN DE LOS ASTROCITOS.

COMPUESTO	CANTIDAD PARA 2 mL
Tris 1 M pH 9,5	222 µL
NaCl 5 M	44 µL
MgCl ₂ 1 M	100 µL
Levamisol	0,5 mg
Agua destilada	1950 µL

9. Por último, las muestras se incuban con tampón de revelado (Tabla 3) en oscuridad. Para conseguir el tiempo de revelado óptimo se probaron los siguientes tiempos: 2 horas, 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 7 minutos y 5 minutos. Este tampón se compone por tampón de tinción al que se ha añadido el sustrato y las sales de diazonio. En este caso la fosfatasa alcalina se revela mediante la incubación de las secciones con el sustrato 5-bromo, 4-cloro, 3 indol-phosphate (BCIP) marcado con cloruro de 4-nitroazul tetrazolio (NBT)

TABLA 3. COMPOSICIÓN DEL TAMPÓN DE REVELADO PARA EL MARCAJE DE ASTROCITOS.

COMPUESTO	CANTIDAD PARA 4 mL
Tris 1 M pH 9,5	400 µL
NaCl 5 M	80 µL
MgCl ₂ 1 M	200 µL
Levamisole	1,92 mg
Agua destilada	3300 µL
NBT/BCIP	40 µL

produciendo un precipitado violeta-negro cuando el fosfato es hidrolizado por la fosfatasa alcalina (Esteban *et al.*, 2009).

Para iniciar el proceso de identificación de microglía se debe empezar por:

10. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS 0,05 M.
11. Inactivación de la peroxidasa endógena mediante peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 30 minutos.
12. Preincubación durante 1 hora en BSA al 1%.
13. Incubación con la lectina biotinilada durante toda la noche a 4 °C. En este estudio se emplearon dos tipos de lectinas: la lectina de tomate (TL), cuya concentración óptima resultó ser 12 µg/mL. Se realizaron pruebas con concentraciones que variaban entre 12-20 µg/mL. La otra lectina era la *Ricinus communis* (RCA-I) (Vector Laboratories) a una concentración de 10 µg/mL (Núñez, 2014).
14. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS 0,05 M.
15. Incubación con el complejo enzimático avidina-biotina-peroxidasa (ABC), el cual se une a la lectina marcada con biotina a una concentración de 1:100 durante 1 hora.
16. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBS 0,05 M.
17. Para la visualización de la lectina se realiza un proceso de revelado de exactamente 5 minutos. Usando la diaminobenzidina (DAB) y el peróxido de hidrógeno se obtiene un precipitado de color marrón.
18. Dos lavados de 5 minutos en TBS 0,05 M.

Finalmente se lleva a cabo la deshidratación de las muestras en alcoholes de graduación ascendente y en xilol para su montaje y observación al microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procedimiento de doble tinción descrito anteriormente se repite en todas las muestras analizadas tanto en lo referente a los distintos pacientes como a las diferentes áreas de estudio, esto es, bulbo olfativo, pedúnculo y corteza rostral.

ANÁLISIS DEL MÉTODO DISEÑADO EN ESTE ESTUDIO

Las principales variables a las que se sometió el protocolo diseñado son: el tiempo de revelado de la fosfatasa alcalina para demostración de astrocitos y la utilización de dos lectinas para visualización de la microglía.

1. Tiempos de revelado

Inicialmente el tiempo de revelado aplicado fue de dos horas en oscuridad (comunicación personal). Sin embargo se observa una tinción excesivamente recargada que dificultaba la apreciación de las características morfológicas de los astrocitos (Fig. 2A). A pesar de que este tiempo da lugar a un marcaje más intenso de las células, aparece también una tinción de fondo que distorsiona la imagen. Para ello se probaron tiempos considerablemente inferiores que variaban entre 5 y 30 minutos. Entre estos tiempos de revelado no había diferencias significativas (Fig. 2B, 2C, 2D).

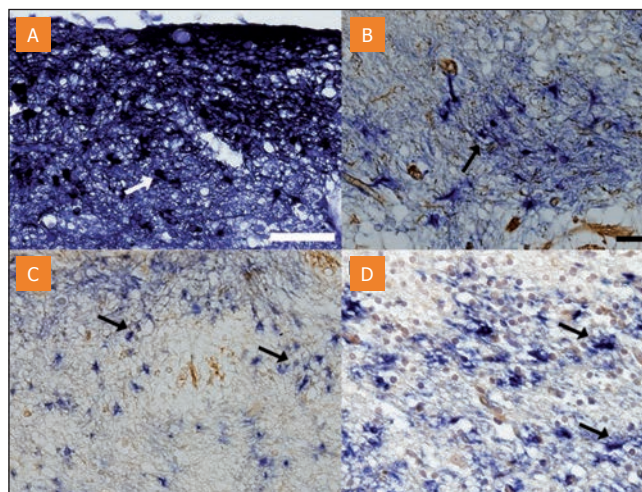


Figura 2. Imágenes de bulbos olfativos con distintos tiempos de revelado para astrocitos. (A) Tiempo de 2 horas. (B) Tiempo 15 minutos. (C) Tiempo 5 minutos. (D) Tiempo 20 minutos. Astrocitos (flechas). Barra de escala A, B, C y D: 50 μ m.

2. Uso de lectinas

Como ya se comentó anteriormente este trabajo está basado en el método de Villacampa *et al.* (2013) que usa la lectina de tomate para el marcaje de la microglía. Sin embargo, se probó si el método funcionaba con otra lectina, la RCA-I, descrita previamente en tejido nervioso (Haude & Korr, 1993), con el fin de observar si había diferencias significativas. Los resultados se muestran en la figura 3 en donde se puede observar un resultado similar tanto con la TL (Fig. 3A) como con la RCA-I (Fig. 3B). Mientras que la TL tiene afinidad por la N-acetilactosamina formada por unidades Gal β 1-4GlcNAc (galactosa-N-acetilglucosamina) o alternativamente por GalNAc β 1-4GlcNAc (N-acetilgalactosamina-N-acetilglucosamina) (Stanley & Cummings, 2009), RCA-I tiene afinidad por la galactosa y N-acetilgalactosamina (Esteban *et al.*, 2009). La diferencia que se puede resaltar es la distinta concentración a la que se tienen que usar, siendo de 12 μ g/mL para TL y 10 μ g/mL para RCA-I. Por tanto, teniendo en cuenta la concentración ambas lectinas se pueden usar indistintamente.

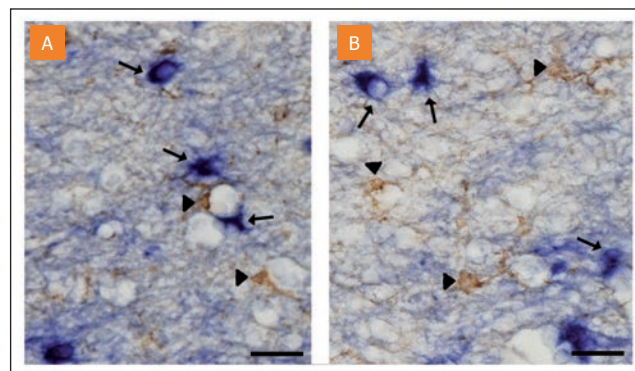


Figura 3. Imagen de la doble tinción con dos tipos de lectinas. (A) Doble tinción con la lectina TL. (B) Doble tinción con la lectina RCA-I. Astrocitos (flechas) y microglía (cabeza de flecha). Barra de escalas A y B: 20 μ m.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

El método diseñado en este trabajo presenta algunas ventajas cromáticas con respecto al descrito por Villacampa *et al.* (2013). La principal diferencia de este método con respecto al de Villacampa *et al.* (2013) se centra en el uso de un anticuerpo secundario unido a la enzima fosfatasa alcalina que obliga al uso de un revelador diferente con respecto al habitualmente usado en las técnicas inmunohistoquímicas.

En el método de Villacampa *et al.* (2013) se usa como cromógeno la diamino bencidina (DAB) con y sin sulfato de

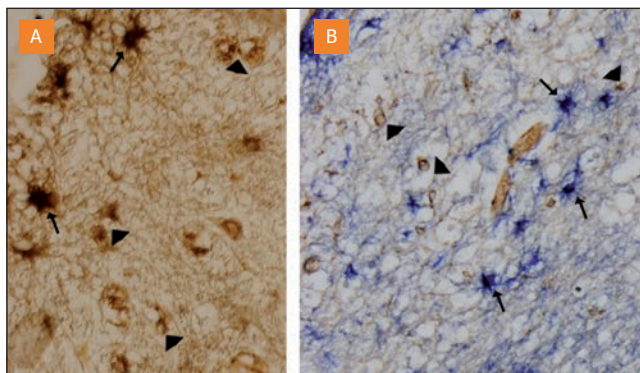


Figura 4. Imágenes de la doble tinción empleando las dos técnicas. (A) Método de Villacampa et al. (2013) realizado en este trabajo en bulbos olfativos. (B) Método diseñado en este estudio. Astrocitos (flechas) y microglía (cabeza de flecha). Barra de escala A: 20 μ m; B: 30 μ m.

amonio níquel, se obtiene, de esta manera, una doble tinción de distintas tonalidades de marrón. Siendo más intenso el marcaje de astrocitos (DAB + sulfato de amonio níquel) que el de la microglía (solo DAB) (Fig. 4A). Sin embargo, derivado del uso de dos cromógenos distintos, los colores resultantes en el método diseñado por nosotras son el marrón para microglía (DAB) y violeta-negro para astrocitos (4-cloro-1-naftol), de manera que es fácil distinguir ambos tipos celulares (Fig. 4B).

Resultados similares con respecto a las diferencias cromáticas entre los dos tipos celulares fueron obtenidos por Castellano et al. (1991). Pero en este caso, se usaron técnicas histoenzimológicas en lugar del uso de lectinas para el marcaje de la microglía.

LEGISLACIÓN

- España. Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio. Boletín Oficial del Estado, 5 de julio de 2014. 163: 52716-52763.
- España. Orden SSI/2057/2014, de 29 de octubre. Boletín Oficial del Estado, 5 de noviembre de 2014. 268: 90536-9053.

BIBLIOGRAFÍA

1. Almolda, B., González, B., Castellano, B. (2013). Microglia detection by enzymatic histochemistry. Joseph-Venero Eds. 22: 243-258.
2. Castellano, B., González, B., Jensen, MB., Pedersen, EB., Finsen, BR., Zimmer, J. (1991). A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. J. Histochem. Cytochem. 39: 561-568.
3. Del Río Hortega P. (1918). Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglia y el tejido conjuntivo. Trab. Lab. Invest. Biol. 15: 367-378.
4. Del Río Hortega P. (1920). Estudios sobre la neuroglia. La microglia y su transformación en células en bastoncito y cuerpos granulosos. Trab. Lab. Invest. Biol. 18: 37-82.
5. Esteban Ruiz, F.J., Calvo González, A., Montuenga Badía, L. (2009). Técnicas en histología y biología celular. Barcelona, España: Elsevier Masson. 4: 95-117.
6. Fields, RD. (2014). El cerebro oculto. Cuadernos Mente y Cerebro 8: 10-17.
7. Gómez, D., Nieto, M. (2008). Glía reactiva. Mente y Cerebro 32: 78-87.
8. Hauke, C., Korr, H. 1993. RCA-I lectin histochemistry after trypsinisation enables the identification of microglial cells in thin paraffin sections of the mouse brain. J. Neurosci. Methods 50: 273-277.
9. Kiernan, JA. (2008). Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice, 4ª ed., Scion Publishing Ltd., Oxford.
10. Krebs, C., Hüttmann, K., Steinhäuser, C. (2014) Células de la glía. Cuadernos Mente y Cerebro 8: 4-9.
11. Molist, P., Garcés, AM., Megías, M. (2011). Identificación de glicoconjugados para la determinación funcional del mucus. En: García, JM., Olabarria, C., Pérez, S., Rolán-Álvarez, E., Rosón, G. Eds). Métodos y técnicas en investigación marina. Madrid: Tecnos, pp.76.
12. Núñez Rodríguez, E. (2014). Puesta a punto de marcadores celulares para el estudio morfológico del bulbo olfativo humano. Trabajo Fin de Grado. Universidade de Vigo, Vigo, España.
13. Ruan, Y., Zheng, X.Y., Zhang, HL., Zhu, W., Zhu, J. (2012). Olfactory dysfunctions in neurodegenerative disorders. J. Neurosci. Res. 90: 1693-1700.
14. Serrano-Pozo, A., Mielke, ML., Gómez-Isla, E., Betensky, RA., Growdon, JH., Frosch, MP., Hyman, BT. (2011). Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 179: 1373-1384.
15. Stanley, P., Cummings, R.D. (2009). Structures common to different glycans. En: Varki, A., Cummings, RD., Esko, JD, Freeze HH., Stanley, P., Bertozzi, CR., Hart, GW., Etzler, ME. (Eds). Essentials of Glycobiology. New York: Cold Spring Harbor, pp.175-198.
16. Villacampa, N., Almolda, B., González, B., Castellano, B. (2013). Tomato lectin histochemistry for microglial visualization. En: Joseph, B., Venero, JL. (Eds). Microglia: Methods and protocols. New York: Human press, pp. 261-278.

EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD Y LA BIOACCESIBILIDAD DEL COMPLEJO SELENIO – MERCURIO EN EL MÚSCULO DEL ATÚN. POSIBLES EFECTOS CITOTÓXICOS DEL CONSUMO SOBRE LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS IN VITRO.

J. Lago, M. Atanassova, A. G. Cabado, J.M. Vieites

Área de I+D+i, ANFACO-CECOPECA, Vigo (Pontevedra)

INTRODUCCIÓN

Este trabajo está vinculado a la ejecución técnica del proyecto SELATUN: MINIMIZACIÓN DE LA PROBLEMÁTICA DEL MERCURIO Y VALORIZACIÓN DEL ATÚN COMO ALIMENTO SALUDABLE, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad en el año 2014 en la convocatoria Retos de la Sociedad. En este ámbito se trata de recopilar información en relación a la problemática del mercurio en el atún, así como de evaluar procedimientos para minimizar o neutralizar el riesgo de ingesta de mercurio asociado a los productos del atún. Además, el proyecto aborda la relación entre el consumo de atún y la aparición de patologías cancerígenas y neurológicas de elevada incidencia en la población actual. En conjunto, se trata de obtener evidencias científicas para una adecuada valoración riesgo/beneficio de los productos de este pescado, cuya imagen ha sido perjudicada injustificadamente en muchos medios, en base a una interpretación alarmista de las recomendaciones dirigidas a sectores especialmente sensibles a la exposición al mercurio, como las mujeres embarazadas y los niños. Una interpretación errónea de este tipo de recomendaciones puede dar lugar a la disminución en el consumo de un alimento saludable que aporta beneficios a la población.

En la actualidad, cuando se realiza la evaluación de riesgo de cualquier contaminante, no se tienen en cuenta los procesos que condicionan la llegada de dicho contaminante a la circulación sistémica y a los órganos diana donde ejerce su efecto. Por ello, las etapas de digestión, absorción y metabolismo en el organismo deberían de ser consideradas en la evaluación del riesgo/beneficio asociado a la ingesta de un compuesto.

El número de estudios sobre alimentos llevados a cabo *in vivo*, son muy escasos, por ello se diseñan estudios *in vitro* que permiten analizar un elevado número de muestras y una vez validados, generan datos precisos y reproducibles sin las restricciones éticas que conllevan los estudios realizados sobre organismos vivos.

En este contexto, la bioaccesibilidad corresponde a la fracción de un compuesto, nutriente o contaminante que puede liberarse del alimento o solubilizarse durante su paso por el tracto gastrointestinal. Esto se ve afectado por distintos factores como el tipo y la composición del alimento, las condiciones del tracto gastrointestinal y las circunstancias fisiológicas del consumidor.

Por otro lado, no todo el contenido de un compuesto, nutriente o contaminante presente en la dieta va a ser eficientemente absorbido ni refleja lo que queda disponible en el cuerpo. En este sentido, la biodisponibilidad representa la fracción ingerida en los alimentos que puede ser absorbida y alcanza la circulación sistémica. La biodisponibilidad puede verse afectada, entre otros factores, por los constituyentes del alimento, las preparaciones culinarias así como la situación fisiológica del consumidor.

Los estudios de biodisponibilidad *in vitro* simulan la absorción intestinal mediante el uso de líneas celulares. Para ello se emplea habitualmente la línea celular Caco-2, establecida a partir de un carcinoma de colon humano. Esta línea celular, se diferencia en enterocitos intestinales a partir de la segunda semana en cultivo y se establecen cultivos en monocapa celular que simula el epitelio intestinal. Para ello, se cultivan mediante un sistema que permite una comunicación de las

células, tanto en su lado apical como en su lado basolateral, simulando lo que ocurre *in vivo*. A este modelo se le pueden incorporar células secretoras de moco, similares a células de goblet, que actúan como barrera para la absorción de los contaminantes y su llegada a la circulación sistémica (Vázquez *et al.*, 2013).

La combinación de una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* y de un modelo de epitelio intestinal para emular la absorción se ha evidenciado útil para predecir la biodisponibilidad *in vivo* de numerosos nutrientes, fármacos y otros compuestos. En este contexto, en el proyecto Selatún, se han utilizado modelos para estudiar la bioaccesibilidad del mercurio (Hg), metil mercurio (MeHg) y selenio (Se), así como su absorción intestinal mediante cultivos celulares.

El efecto de la dieta sobre la salud se está estudiando intensamente en los últimos años, cada vez a un nivel más profundo. Se ha establecido claramente la importancia de las interacciones entre los nutrientes recibidos a través de la dieta, sus niveles y el estado de salud general (Díu Uriarte, 2012). Ha sido ampliamente demostrado el papel del Se y sus formas orgánicas (se conocen alrededor de 35 selenoproteínas distintas hasta la fecha) en el desarrollo adecuado del organismo, músculos y tejido conectivo así como ante la aparición de patologías como la artritis, disminución en la respuesta inmunitaria normal, funciones modificadas de los tiroides (hipotiroidismo) y cáncer (Rayman, 2000). De tal forma, ha sido previamente estudiada la función que ejerce el Se y las consecuencias de su deficiencia en pacientes con cáncer de piel, hígado, próstata/ovarios y pulmón (Rayman, 2000; Daniel *et al.*, 2011; Mahoney *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015; Jaing *et al.*, 2014). Por otro lado, varios de los citados estudios han proporcionado evidencia científica del efecto positivo contra el desarrollo del cáncer que podría tener la aportación dietética de Se a través del consumo frecuente de pescado (Daniel *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). En el presente proyecto se ha planteado el estudio del efecto anti cancerígeno (citotóxico) *in vitro* de las muestras de atún digeridas para permitir la cuantificación de este último y profundizar en el conocimiento de las interacciones entre los nutrientes que podrían aportar beneficios a pacientes con cáncer.

METODOLOGIA

1. Selección y digestión de las muestras

La digestión *in vitro* de las muestras seleccionadas se realizó mediante el protocolo de simulación *in vitro* de la digestión humana desarrollado en los trabajos de Versantvoort y

colaboradores (Versantvoort *et al.*, 2005, Oomen *et al.*, 2004) y adaptado a muestras de atún.

Brevemente, se preparan las soluciones digestivas: saliva, jugo gástrico, duodenal y biliar, se ajustan los correspondientes pHs de cada jugo y se esterilizan.

A continuación se llevó a cabo el muestreo de los distintos ejemplares de atún y se realizaron los experimentos de digestión *in vitro*:

- Trituración y homogenización de la correspondiente muestra de atún.
- Adición de saliva e incubación a 37 °C en agitación.
- Adición de jugo gástrico e incubación a 37 °C en agitación
- Por último incubación con jugo duodenal, jugo biliar y bicarbonato sódico.
- Centrifugación y recogida del sobrenadante.

El cálculo de la bioaccesibilidad se lleva a cabo aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = \frac{\text{contenido después de la digestión}}{\text{contenido inicial}} \times 100$$

El sobrenadante obtenido tras la digestión *in vitro* debe ser acondicionado para su empleo sobre los cultivos celulares. Para ello es necesario desactivar las enzimas, agregar glucosa y ajustar la osmolaridad y pH; por último se deben esterilizar las muestras.

2. Estudios de biodisponibilidad empleando el modelo celular Caco-2.

La estimación de la biodisponibilidad se obtiene tras la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Bioaccesibilidad} = \frac{\text{contenido basal}}{\text{contenido apical}} \times 100$$

La integridad de la monocapa de células Caco-2 para la realización correcta de los experimentos con enterocitos diferenciados, se verifica midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), mediante el equipo Millicell® ERS-2 (Sistema de Resistencia Eléctrica). El empleo de cultivos de Caco-2 presenta la limitación de que no contienen ausencia de capa de mucus presente en el epitelio intestinal. Esta

situación se puede corregir mediante el empleo de co-cultivos de células Caco-2 y células que segregan moco. La línea celular HT29-MTX (similares a células de goblet) procede del colon y se diferencia en células muco-secretoras. El uso de cocultivos de Caco-2 y HT29 permite incorporar al modelo los dos tipos celulares más importantes en el epitelio; esto representa al epitelio intestinal humano de forma más precisa.

3. Estudios de toxicidad *in vitro* sobre líneas cancerígenas humanas

Con el propósito de determinar el posible efecto citotóxico de las muestras de digestión *in vitro* a partir de atún cocido al vapor a 81°C en placas de 96 pocillos sobre líneas celulares de cáncer de próstata e hígado, se han elaborado digeridos gástricos a partir de las muestras de atún cocido (replicas n=4). El perfil nutricional de las muestras de digerido gástrico simulado *in vitro* se ha sometido a análisis fisicoquímico y nutricional (humedad, proteína, grasa, perfil en ácidos grasos, hidratos de carbono, mercurio y selenio mineral, así como metilmercurio). Para la determinación de los parámetros nutricionales y físico-químicos se ha procedido a la concentración de las muestras mediante liofilización debido a la dilución elevada a la que se somete la matriz alimentaria durante el proceso de digestión y los distintos límites de detección de los correspondientes métodos analíticos.

Con las muestras digeridas se han realizado los ensayos de determinación del efecto citotóxico *in vitro* sobre la correspondiente línea celular (todas las líneas empleadas se detallan más abajo en este punto de la Metodología). A continuación se han adicionado concentraciones variadas de la muestra (estéril), determinando los límites de concentración y los parámetros cuantitativos del efecto sobre el crecimiento de la línea celular. Se han determinado de tal forma varios parámetros de las distintas líneas celulares *in vitro*: viabilidad celular mediante tinción con el colorante vital Alamar Blue, disrupción del potencial mitocondrial y cuantificación simultánea de 5 caspasas cuyo incremento en las células indica los principios de un proceso de apoptosis. Todos estos ensayos han sido realizados en dos líneas de cáncer de hígado (Hep G2 (ATCC HB-8086), SK-HEP-1 (ATCC HTB-52)) y de próstata (PC3 (ATCC CRL-1435), DU-145 (ATCC HTB-81)), así como en dos líneas de cáncer de riñón - FRhK-4 (ATCC CRL-1688) y HEK 293 (ATCC CRL-1573), empleadas como control "negativo", ya que su viabilidad no se vería afectada, según la bibliografía, por el tratamiento con las muestras de atún (Rayman, 2000; Key *et al.*, 2004; Renieri *et al.*, 2014). Se han ensayado varios tiempos de tratamiento de las células con la muestra en las condiciones óptimas de cultivo para cada línea celular - 2h, 4h, 6h, 24h, 48h y 72h. El ratio muestra / cultivo

celular empleado ha sido de 1/5, se han probado diluciones seriadas de la muestra en agua milliQ estéril de cara a poder cuantificar el efecto citotóxico en relación a la concentración de Selenio.

- Estimación de la viabilidad celular por el método de Alamar Blue

Este método se basa en la reducción por la actividad metabólica celular de la resazurina a resofurina. La resazurina es un colorante no fluorescente que se transforma en el colorante fluorescente intensamente rojo resofurina de manera cuantitativamente detectable; la cantidad de fluorescencia emitida es proporcional al número de células viables. Se observa efecto citotóxico estadísticamente significativo sobre este parámetro de los cultivos estudiados después de 48-72 h de tratamiento con la muestra.

- Estimación del efecto disruptor del potencial mitocondrial por coloración con JC-10.

Este parámetro se ha estimado mediante la coloración de las células cancerígenas tratadas con muestra con un colorante catiónico lipofílico (JC-10). Este compuesto cambia su rango de señal fluorescente emitida después de la formación de agregados en la mitocondria celular y el efecto se puede determinar cuantitativamente en función de la mayor o menor permeabilidad de la membrana celular. Después de la realización de este ensayo se ha observado de nuevo que los tiempos óptimos de tratamiento con las concentraciones de muestra seleccionados son de 48-72h.

- Estimación del efecto de estimulación de la secreción de las caspasas -2, -3, -6, -8 y -9.

La apoptosis o muerte celular programada es resultado de una serie de procesos bioquímicos internos a la célula de los eucariotas predeterminados genéticamente. Uno de los mecanismos implicados se realiza a través de la activación de un grupo de proteasas de cisteína internas denominadas caspasas (Figura 1).

Las caspasas están distribuidas en tres familias - la subfamilia de la caspasa 1 a la que pertenecen las caspasas -1, -4, -5, -11, -12 y -13, la subfamilia de la caspasa 3 a la que pertenecen las caspasas -3, -6, -7, -8 y -10 y, finalmente, la subfamilia de la caspasa 2, compuesta por las caspasas -2 y -9. Funcionalmente, algunas caspasas como la -2, la -8 y la -9 actúan como iniciadores o señales para iniciar el proceso de la síntesis de las demás enzimas implicadas en la apoptosis,

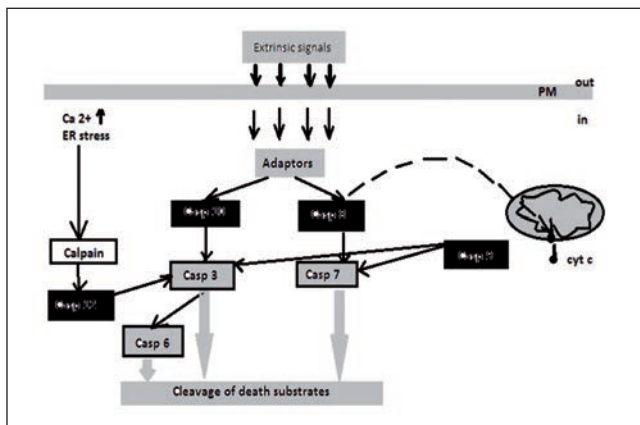


Figura1. Principales vías de acción de las caspasas en el proceso de muerte celular programada (según Vachova & Palkova, 2006)

mientras que otras tienen papel de efectores de la apoptosis. La caspasa -1 tiene un papel muy destacado en los procesos de la inflamación a través de la activación de las citocinas. El protocolo analítico empleado para la medida de las principales caspasas (-2, -3, -6, -8 y -9) implica la detección y la cuantificación fluorimétrica de la actividad de estas enzimas en el cultivo celular estudiado, proporcionando los distintos sustratos específicos para cada una de ellas.

RESULTADOS

1. Resultados de la bioaccesibilidad del mercurio

Los resultados obtenidos muestran que los porcentajes de bioaccesibilidad para el mercurio total se corresponden con valores del 24 %, mientras que para el selenio, los porcentajes de accesibilidad duplican a los del mercurio, alcanzando valores del 48 %.

2. Resultados de la biodisponibilidad del mercurio determinada en el modelo combinado celular de Caco-2 y HT29

En relación a los valores de biodisponibilidad, los resultados son preliminares. Se observa que utilizando cultivos de enterocitos se obtienen porcentajes de absorción de Hg o MeHg alrededor del 30 %, mientras que cuando se emplean cocultivos con células secretoras de mucus, los porcentajes de biodisponibilidad disminuyen a valores cercanos al 10 %. Estos resultados coinciden con resultados previos obtenidos por otros autores, que han propuesto que se produce una retención del mercurio en la capa de mucus depositada sobre el epitelio (Vázquez, 2013). Por otro lado, la absorción del Se empleando ambos cultivos celulares, es mayor con porcentajes superiores al 20 %.

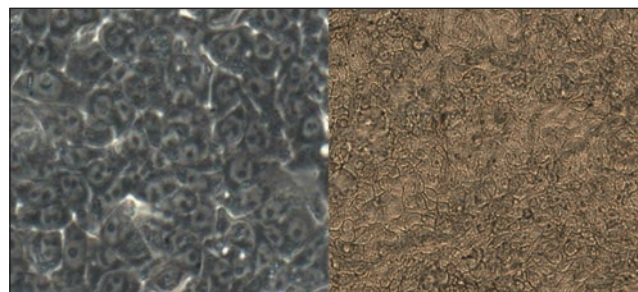


Figura 2: Células HT29 en cultivo, izquierda y HT29 en cocultivo con Caco-2 derecha

Por otro lado, se evaluó el efecto del cocinado sobre la biodisponibilidad del mercurio y metil mercurio comparando la biodisponibilidad de las distintas especies mercuriales presentes en digeridos de atún crudo y cocinado al vapor. Como se puede apreciar en las figuras 3 y 4, no se aprecian diferencias significativas entre la biodisponibilidad del mercurio o metil mercurio entre el atún crudo y el atún cocinado al vapor tras cuatro horas de exposición.

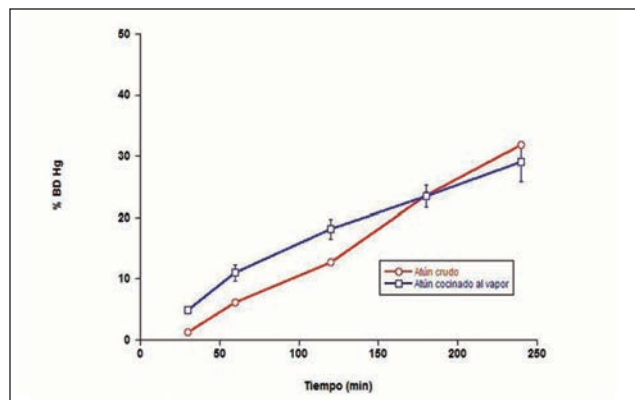


Figura 3: Porcentaje de biodisponibilidad del Hg en atún crudo y el atún cocinado al vapor, en función del tiempo de exposición.

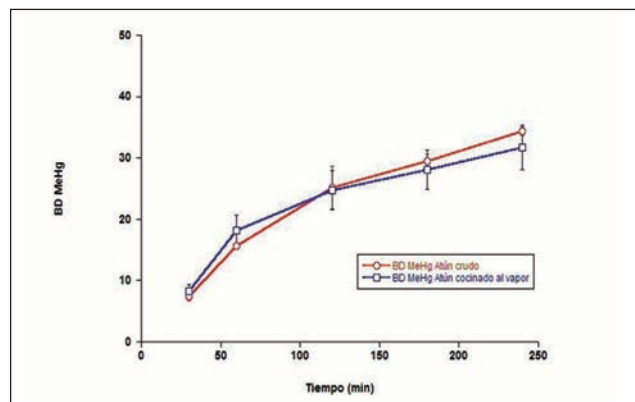


Figura 4: Biodisponibilidad (%) del MeHg en atún cocinado en función de la fracción bioaccesible, dopando con patrón de Hg.

El empleo de cocultivos de Caco-2 y HT29 permite obtener un modelo de epitelio más aproximado al epitelio intestinal. En primer lugar, se verificó el correcto crecimiento de las células Caco-2 en cocultivo con las HT29. Para ello se realizó una tinción diferencial con Alcian Blue y Fast-Red TR/Naphthol AS-MX. El Alcian blue tiñe el mucus secretado y localizado junto a las células HT29, mientras que el Fast Red tiñe las células Caco-2 que al diferenciarse a enterocitos expresan la enzima fosfatasa alcalina en el borde en cepillo (Chen, 2010).



Figura 5: Tinción diferencial de un cocultivo. Se aprecian las células secretoras de moco de color verde turquesa y las Caco 2 de color marrón naranja.

Los valores de TEER se ven afectados por la presencia de las células HT29, produciéndose un descenso en comparación con monocultivos de Caco-2. Esta disminución ha sido descrita previamente, (Vázquez, 2013), debido a una menor concentración de uniones fuertes (tight junctions) por la presencia de células HT29. En todo caso, en los cocultivos se alcanzan valores de TEER que garantizan la integridad de la monocapa.

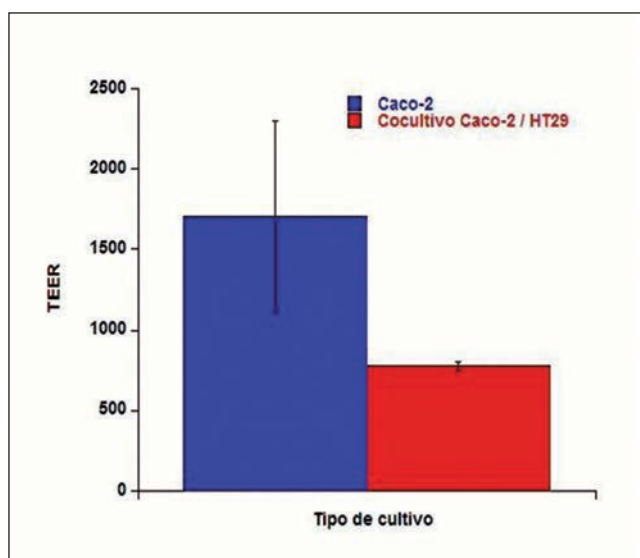


Figura 6: Comparación del TEER en monocapa de Caco-2 y cocultivo Caco-2 / HT29 realizados de manera simultánea.

A continuación se realizaron estudios de biodisponibilidad de Hg, MeHg y Se en estos cocultivos. En este caso se estudió la absorción tras un período de 4 horas, sin hacer cinética de absorción. Las células se expusieron a un digerido de atún cocido dopado con Hg, MeHg y/o Se. Si bien estos datos son preliminares, la presencia de Se parece disminuir la absorción de Hg o MeHg en el modelo epitelial empleado.

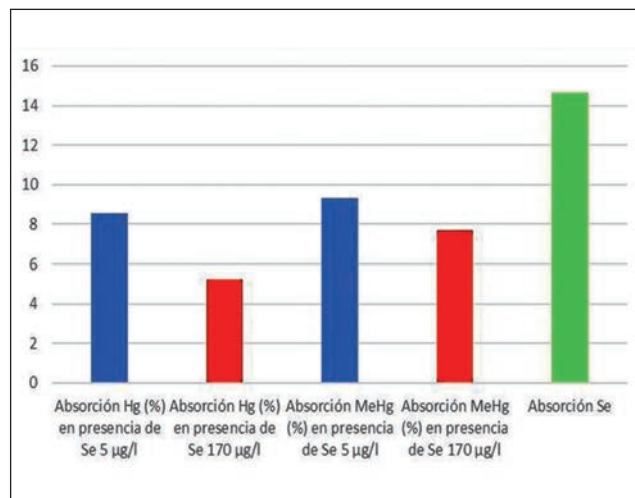


Figura7: Efecto de la presencia de selenio sobre la absorción de Hg y MeHg.

3. Resultados de la determinación del efecto citotóxico *in vitro* de las muestras de atún digerido

El aspecto normal (crecimiento en condiciones óptimas) bajo microscopio óptico de los cultivos celulares de las líneas de cáncer de próstata, hígado y riñón después de la optimización de los cultivos se puede apreciar en la figura 8.

- Estimación de la viabilidad celular por el método de Alamar Blue

A continuación (Figura 9) se presentan los resultados de la viabilidad celular obtenidos. Se observa efecto citotóxico estadísticamente significativo sobre este parámetro de los cultivos estudiados después de 48-72 h de tratamiento con la muestra. El efecto es mayor en el caso de la línea cancerígena de próstata en comparación con la línea de hígado.

- Estimación del efecto disruptor del potencial mitocondrial por coloración con JC-10

Después de la realización de este ensayo se ha observado de nuevo mayor efecto disruptor de la muestra de atún cocido

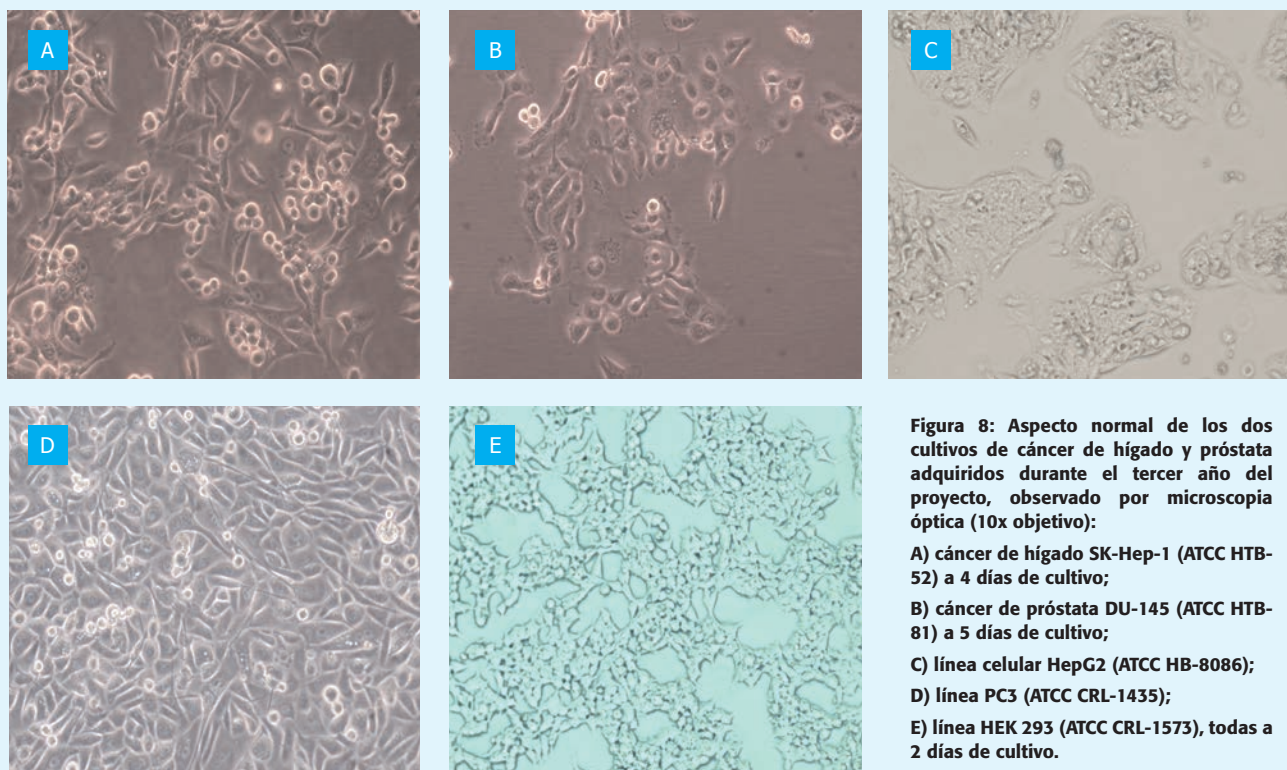


Figura 8: Aspecto normal de los dos cultivos de cáncer de hígado y próstata adquiridos durante el tercer año del proyecto, observado por microscopia óptica (10x objetivo):

- A) cáncer de hígado SK-Hep-1 (ATCC HTB-52) a 4 días de cultivo;
- B) cáncer de próstata DU-145 (ATCC HTB-81) a 5 días de cultivo;
- C) línea celular HepG2 (ATCC HB-8086);
- D) línea PC3 (ATCC CRL-1435);
- E) línea HEK 293 (ATCC CRL-1573), todas a 2 días de cultivo.

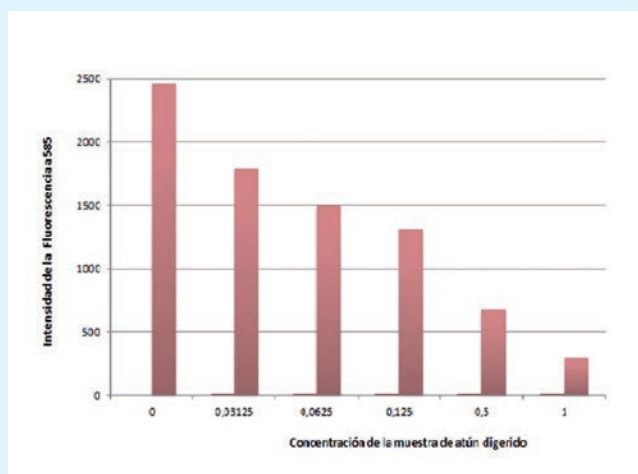


Figura 9. Viabilidad celular de la línea de cáncer de próstata PC3 (ATCC CRL-1435) en función de la concentración de la muestra (72h de tratamiento) según el método de Alamar Blue (Life Technologies)

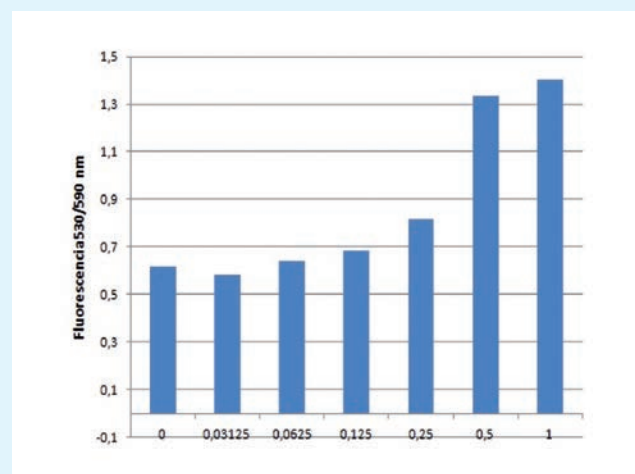


Figura 10: Efecto del digerido de atún sobre el potencial mitocondrial de la línea de cáncer de próstata PC3 (ATCC CRL-1435) en función de la concentración de la muestra (72h de tratamiento) por tinción con JC-10.

digerido sobre la línea de cáncer de próstata en comparación con la de hígado y tiempos óptimos de tratamiento con las concentraciones de muestra seleccionadas de 48-72h (Figura 10).

- Estimación del efecto sobre la iniciación de la apoptosis

Los ensayos de detección de los niveles de las caspasas en las muestras siguen en proceso, aunque en la figura inferior se pueden observar los resultados parciales para las concentraciones crecientes de las caspasas 2, 6 y 8, en comparación con las células no tratadas, después de 24 h de tratamiento con la muestra de digerido de atún.

CONCLUSIONES

En nuestra opinión, y teniendo en cuenta estos resultados, una correcta evaluación de riesgo de estos metales pesados, debería de tener en cuenta datos relevantes como el porcentaje de bioaccesibilidad y biodisponibilidad para dichos contaminantes. En este sentido, el efecto tóxico en el organismo humano depende de lo que éste absorba y la cantidad que llegue al sistema circulatorio. Los datos sugieren que la biodisponibilidad total de estos contaminantes es muy inferior a lo que cabría esperar. Por otro lado, es importante considerar el papel beneficioso del Se que, como se demuestra, se absorbe en mayor cantidad que el Hg o MeHg. Por lo tanto, además de la información disponible en la bibliografía y aunque estos datos pueden ser preliminares, la continuación de estudios de esta índole, deberían apoyar un aumento del límite legal para comercializar pescados susceptibles de contener Hg o MeHg.

Por otro lado, los resultados preliminares sobre la actividad citotóxica del consumo de atún demuestran un mayor efecto sobre las líneas de cáncer de próstata en comparación con las líneas de cáncer de hígado.

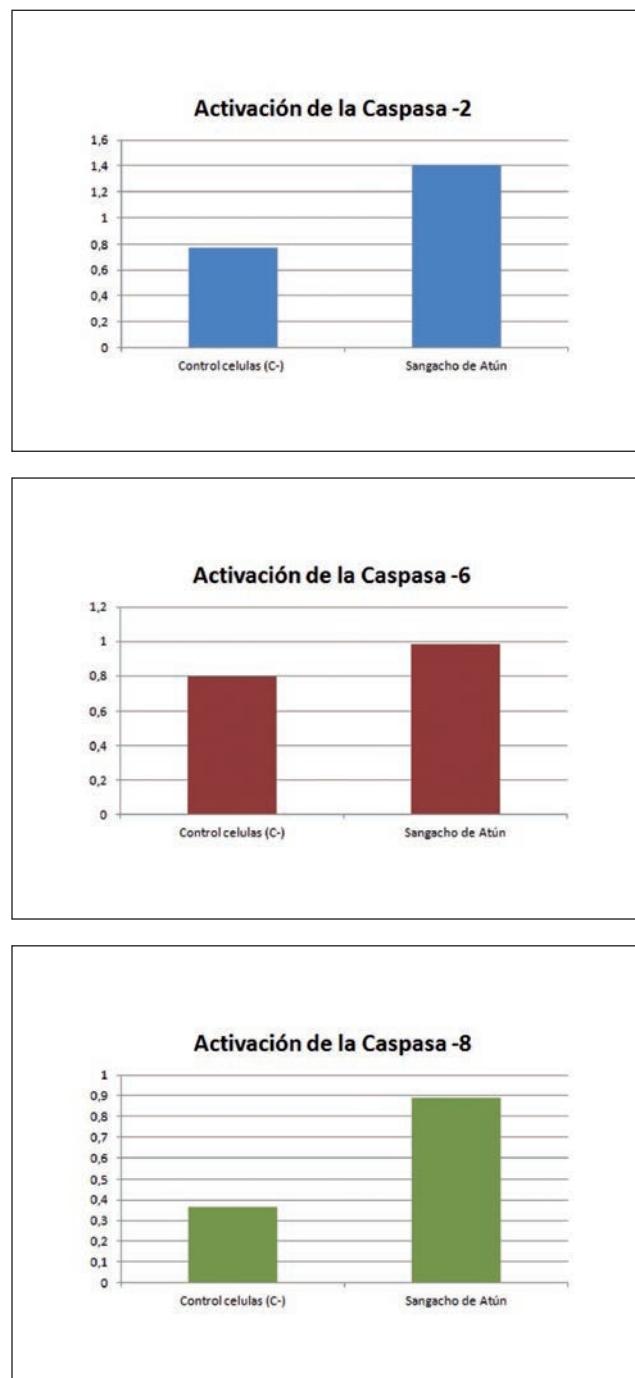


Figura 11. Efecto del digerido de atún (identificado como sangacho en esta gráfica) sobre las concentraciones de las caspasas -2, -6 y -8 de la línea de cáncer de próstata PC3 (ATCC CRL-1435) en función de la concentración de la muestra (24 h de tratamiento) (ApoTarget).

BIBLIOGRAFIA

1. Carolien, H.M. Versantvoort, A. Oomen, G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C. J.M., A. Sips, J.A.M.. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food (2005).. Food and Chemical Toxicology, 43 (1), 31-40.
2. Chen, X-M., Elisia, I., Kitts, D D. Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 61 (2010) 334-342
3. Daniel, C. R., Cross, A. J, Graubard, B. I., Hollenbeck, A. R., Park, Y., Sinha, R (2011) Prospective investigation of poultry and fish intake in relation to cancer risk. Cancer Prev Res Vol. 4 (11), pp. 1903-1911.
4. Dúo Uriarte (2012) La dieta como factor de riesgo y de protección frente al cáncer. Alimentación Nutrición y Salud, Vol. 19 (2).
5. Feyerabend, S, Feil, G., Krug, J., Kassen, A., Stenzl, A (2007) Cytotoxic effects of treosulfan on prostate cancer cell lines. Anticancer Res., Vol. 27, pp. 2403-2408.
6. Huang, R. X., Duan, Y. Y., Hu, J. A. (2015) Fish Intake and risk of liver cancer: a meta-analysis. PLOSOne, Vol. 10 (1):e0096102.
7. Jaing P. Y., Jiang, Z., Shen, K., Yue, Y (2014) fish Intake and ovarian cancer risk: a meta-analysis of 15 case-control and cohort studies. PLOSOne, Vol. 9 (4):e94601.
8. Key, T. J., Schatzkin, A., Willett, W. C., Allen, N. E., Spencer E. A. and Travis. R. C. (2004) Diet, nutrition and the prevention of cáncer. Public Health Nutrition: Vol. 7(1A), pp. 187-200.
9. Mahmoud, A M., El-Shemy H. A. (2012) Cytotoxic profiling of some compounds of natural origin against HepG2 liver cancer cell line in vitro. J Arid Land Studies, Vol. 22-1, pp. 191-194.
10. Mahoney, S., Arfuso, F., Rogers, P., Hisheh, S., Brown, D., Millward, M., Dharmarajan, A (2012) Cytotoxic effects of the novel isoflavone, phenoxodiol, on prostate cancer cell lines. J Biosci, Vol. 37 (1), pp. 73-84.
11. Nair, S. V. G., Hettihewa, M., Rupasinghe, H. P. V. (2014) Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by methanol leaf extract of Costus speciosus. BioMed Res Int., Vol. 2014, pp.1-10.
12. Oomen, G., Rempelberg, C. J. M., Van de Kamp, E., Pereboom, D. P. K. HDe Zwart, L. L., Sips, A. J. A. M.. Effect of Bile Type on the Bioaccessibility of Soil 80 Contaminants in an In vitro Digestion Model (2004). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 46(2), 183-188.
13. Rayman, M. P. (2000) The importance of selenium to human health. The Lancet, Vol. 356 (9225), pp. 233-241.
14. Renieri, E. A., Alegakis, A. K., Kiriakakis, M., Vinceti, M., Ozcagli, E., Wilks, M. F. and Tsatsakis, A. M. (2014) Cd, Pb and Hg Biomonitoring in Fish of the Mediterranean Region and Risk Estimations on Fish Consumption. A review. Toxics Vol. 2 (2014). pp. 417-442
15. Vachová, L., Palková, Z. Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts. Minireview. FEMS Yeast Res Vol. 7 (2007), pp. 12-21.
16. Vazquez, M., Calatayud M., Velez, D., Devesa, V. Intestinal transport of methylmercury and inorganic mercury in various models of Caco-2 and HT29-MTX cells. Toxicology 311 (2013) 147- 153
17. Zheng, J.-S., Hu, X., Zhao, Y., Yang, J., Li, D. (2013) Intake of fish and marine n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of breast cancer: meta-analysis of data from 21 independent prospective cohort studies. BMJ, Vol. 346: f3706.

TELEDETECCIÓN DE INCENDIOS FORESTALES CON SATÉLITES; MAPEADO ACTIVO Y GESTIÓN

Castro Miguel (1), Pérez Franco (2), Aguado Fernando (2), Yáñez Pablo (1)

Universidade de Vigo, Campus Universitario Lagoas Marcosende

1 Departamento de Ingeniería Mecánica

2 Departamento de Teoría de la Señal y Comunicaciones

RESUMEN

En este artículo se presenta una herramienta novedosa para la prevención, detección y mapeado de incendios forestales (que puede ser extendido y adaptado a cualquier otro tipo de desastre natural). Esta herramienta se obtiene a través de la sinergia de cuatro tecnologías: sensores infrarrojos para la detección inicial del incendio, satélite de tipo CubeSat para la transmisión temprana de señales de emergencia así como para dar cobertura de comunicación al resto de sistemas, UAVs para el mapeado de gran resolución del incendio y una herramienta informática de evaluación de la situación y toma de decisiones.

Palabras Clave: Incendio forestal, CubeSat, UAVs, sensores IR

ABSTRACT

This article presents an innovative tool for prevention, detection and mapping of wildland fires (which can be extended and adapted to any other type of natural disaster). This tool is obtained through the synergy of four technologies: infrared sensors for fire in-situ detection, CubeSat spacecraft for early warnings and communications coverage, UAVs for high-accuracy fire mapping and a situation assessment tool for the evaluation of the situation and decision making.

Keywords: Wildland-Fire, CubeSat, UAVs, IR Sensors

INTRODUCCIÓN

Los incendios forestales son procesos naturales que permiten la regeneración de nuestros bosques y son una parte esencial de los ecosistemas. En la actualidad, un incendio forestal se asocia directamente a un fenómeno catastrófico que arrasa

nuestros bosques y destruye la riqueza asociada a los mismos; esto se debe principalmente al abandono del medio rural y el éxodo de la población hacia las ciudades, dejando estos sin cuidado y a merced de las acciones humanas, ya sean involuntarias o premeditadas. Este tipo de catástrofe, además de arrasar grandes superficies de terreno, provoca muchas veces víctimas humanas [1], lo que los convierte en catástrofes sociales a la vez de naturales.

Los incendios forestales, son una de las mayores amenazas y desastres medioambientales que se producen anualmente en el territorio europeo. Aunque la forma más efectiva de combatir este desastre es a través de la prevención con políticas adecuadas de recuperación rural, una vez se produce, es necesario actuar de forma rápida y efectiva para minimizar los daños sobre el medioambiente.

El último informe emitido por el European Forest Fire Information System (EFFIS)[2] cifra la superficie quemada Europa durante el año 2015 en torno a 1 millón de hectáreas, siendo España uno de los países más afectado, con un total de 103200 hectáreas.

CONCEPTO

Con este trabajo se pretende desarrollar una herramienta eficaz para la detección, gestión y control de incendios forestales formada por un conjunto de sistemas que trabajando en equipo, proporcionan la información necesaria a los servicios de emergencia para que tomen las decisiones oportunas:

Sistema de detección terrestre (Ground Detection System **GDS**): formado por el conjunto de equipos encargados de la detección inicial del incendio forestal y su transmisión

al segmento espacio (satélite CubeSat). Los principales componentes que forman el GDS son:

- Unidad Pan&Tilt para la monitorización de la superficie forestal
- CPU para el procesamiento de datos y control del conjunto GDS
- Interfaz de comunicación
- Equipo de suministro de energía y estructura soporte

Sistema de comunicación espacial (Space Communication System **SCS**): proporciona el soporte de comunicaciones requerido para enviar los mensajes instantáneos de emergencia generados por el GDS. Este sistema está principalmente basado en un picosatélite del tipo CubeSat junto con una estación de tierra

Sistema de caracterización y retransmisión de UAV (UAV Characterization and Relay System **UCRS**): sistema formado por una flota de UAVs así como un centro de control de los mismos. El UCRS se encarga de la monitorización en tiempo real del incendio.

Centro de procesado de datos (Data Processing Center **DPC**): encargado de procesar toda la información recibida de los diferentes sistemas para realizar una predicción del comportamiento del incendio en tiempo real y proporcionar información a los servicios de emergencia y autoridades encargadas de realizar la extinción del mismo.

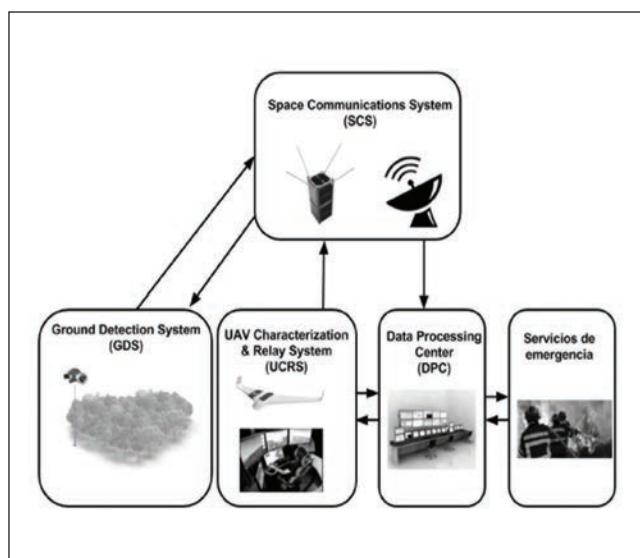


Figura 1. Esquema conceptual de la herramienta propuesta.

Todos estos sistemas entran en juego cuando se detecta un incendio dentro del área que se está controlando. En ese momento, comienza una secuencia de fases diferenciadas y que a continuación se desarrollan:

Detección del fuego: Esta fase se corresponde con la emisión de una alarma por parte del GDS asociada a la presencia de un incendio dentro del campo de control de los sensores terrestres de infrarrojos. El sistema GDS realiza además una estimación de la posición del fuego lo que permite al UCRS crear un plan de vuelo adaptado a la posición del foco. Los diferentes subsistemas que entran en juego en esta parte son:

- el GDS que detecta, localiza y envía la señal de alarma al SCS
- el SCS transmite la alarma al DPC
- el DPC se encarga de enviar la alarma a los agentes forestales y autoridades

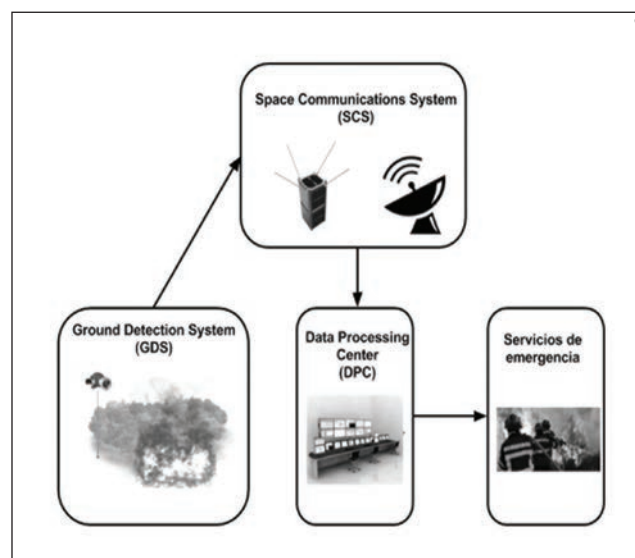


Figura 2. Subsistemas involucrados en la detección del fuego.

Confirmación de la alarma y localización exacta: una vez se recibe la alarma, los servicios de emergencia evalúan si se trata de una falsa alarma o si por lo contrario, se trata realmente de un incendio forestal. Esta fase implica el despegue de por lo menos una unidad UAV que tiene la tarea de volar sobre la supuesta zona donde se ha detectado la alarma para mapear de manera precisa el fuego. Los sistemas involucrados son:

- los diferentes servicios de emergencia y autoridades

- el DPC encargado de programar una misión para el vuelo del UAV
- el UCRS encargado del lanzamiento del UAV y de ordenarle la misión

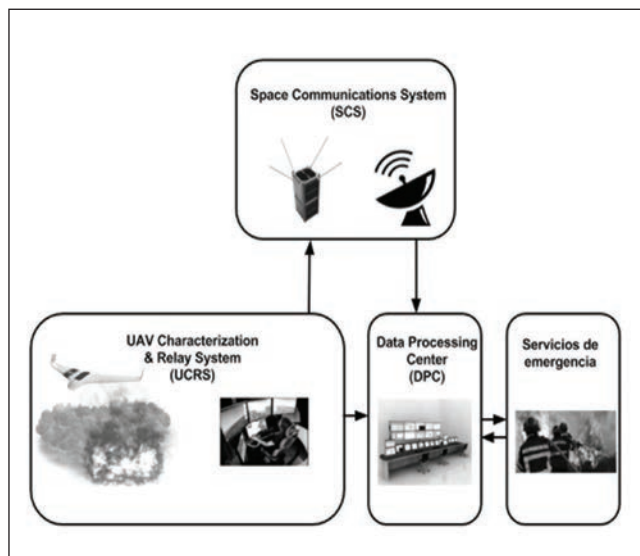


Figura 3. Subsistemas involucrados en la confirmación del incendio.

Monitorización del fuego: durante esta etapa se realiza un control continuo de la evolución del fuego a través de los UAVs. Esta información se envía al DPC que se encarga de procesarla y de predecir el comportamiento del fuego a corto plazo. Esta predicción se realiza en base a una serie de parámetros prefijados anteriormente. En el DPC, una vez realizada la predicción de comportamiento del fuego, se crea un plan de vuelo para los UAVs de forma que la monitorización del mismo sea lo más eficiente posible.

En esta fase entran en juego los siguientes sistemas:

- El UCRS encargado de coordinar los UAVs y ordenarles el plan de vuelo
- El DPC que se encargará de la recepción de la información relacionada con el fuego, predicción de su comportamiento a corto plazo y generación de los planes de vuelo.
- El SCS como enlace de comunicación entre los diferentes subsistemas.

Monitorización del área quemada: fase importante para el control de posibles reactivaciones de fuegos ya extintos. En esta fase intervienen todos los sistemas; los sensores infrarrojos realizan un barrido continuo del área quemada

para detectar posibles focos reactivados; los UAVs, se encargan de realizar barridos de toda la superficie quemada, proporcionando imágenes en tiempo real al DPC y a los servicios de emergencia; el SCS funciona como enlace entre los sistemas para agilizar las comunicaciones.

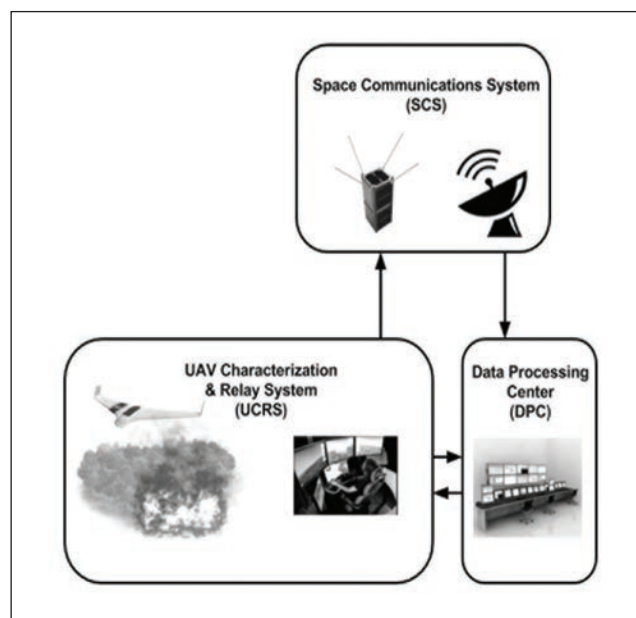


Figura 4. Subsistemas involucrados en la monitorización en tiempo real.

CONCLUSIONES

El aumento de la temperatura terrestre implica una serie de cambios en el clima global entre los que se encuentra el incremento del número de incendios, su gravedad e impacto [3]. La herramienta propuesta en las líneas precedentes permitirá a las autoridades competentes y servicios de emergencia atacar los incendios de forma inteligente, coordinando de forma eficaz sus recursos.

AGRADECIMIENTOS

La herramienta que aquí se presenta se está llevando a cabo dentro del proyecto FireRS SOE1/P4/E0437. El líder del proyecto, la Universidade de Vigo, y sus colaboradores, el Centre National de la Recherche Scientifique de LAAS (LAAS-CNRS) y la Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), agradecen la financiación recibida a través de fondos FEDER dentro del programa Interreg Sudoe.

BIBLIOGRAFÍA

1. Xavier D., Simeoni A., Xanthopoulos G., Rossa C., Ribeiro L., Pita L., Stipanicev D., Zinoviec A., Weber R., Dold J., Caballero D. 2009. Recent Forest Fire Related Accidents in Europe. JCR Scientific and technical Reports
2. San Miguel J., Durrant T., Boca R., Libertà G., Boccacci F., Di Leo M., López J., Schulte E. 2016. Forest Fires in Europe, Middle East and North Africa 2015
3. Flannigan M.D. 2000. Climate change and forest fires

UTILIZACIÓN DE UN EXTRACTO LIPÓFILO DE PIEL

DE CALAMAR GIGANTE (*DOSIDICUS GIGAS*) COMO FUENTE DE COMPONENTES CONSERVANTES DURANTE LA COMERCIALIZACIÓN DE ESPECIES MARINAS

Josafat Marina Ezquerro-Brauer¹, José M. Miranda², Marcos Trigo³, Jesús E. Chan-Higuera¹, Wilfrido Torres-Arreola¹, Jorge Barros-Velázquez², Santiago P. Aubourg³.

¹ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora (Hermosillo, Sonora, México)

² Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad de Santiago de Compostela (Lugo, España)

³ Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto de Investigaciones Marinas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) (Vigo, España)

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, existe un interés creciente en impulsar el consumo de productos marinos, basado en numerosos experimentos que han probado la eficacia de los alimentos de origen marino para combatir enfermedades tales como las coronarias, hipertensión, cáncer, obesidad, etc. En este sentido, las especies marinas son portadoras de importantes componentes para la dieta humana como proteínas con alto valor biológico (altos coeficientes de digestibilidad y disponibilidad), vitaminas liposolubles (A y D, especialmente), microelementos (I, F, Ca, Cu, Fe, Zn, Se, etc.) y ácidos grasos insaturados (especialmente los poliinsaturados de la serie $\omega 3$).

Sin embargo, la industria de alimentos marinos se enfrenta al problema de la disminución de las capturas de especies tradicionales como resultado de cambios drásticos de su disponibilidad, así como de limitaciones legales de su captura. Consecuentemente, esta industria otorga cada vez un interés mayor a fuentes nuevas y no convencionales que puedan proporcionar nuevos productos susceptibles de ser comercializados. Por ello, junto al desarrollo de la acuicultura, es de destacar el empleo de especies hasta ahora infravaloradas o infrautilizadas, así como el empleo de productos de desecho resultantes del procesamiento de especies comerciales.

Los productos de desecho de las especies marinas son porciones de su cuerpo que se eliminan antes de llegar al consumidor final al objeto de mejorar la calidad durante su conservación o procesamiento, reducir el peso durante el transporte, o bien aumentar el valor comercial del producto principal (Blanco *et al.*, 2007). Los productos de desecho

pueden incluir un gran número de subproductos como sangre, vísceras, cabezas, espinas, piel, etc., cuya eliminación podría significar una fuente importante para la reducción de la contaminación del medio ambiente. Con este fin, en años recientes se han llevado a cabo numerosos trabajos al objeto de utilizar tales productos de desecho con el fin de obtener cantidades relevantes de proteínas, lípidos y otros constituyentes minoritarios, como por ejemplo aquellos que hayan demostrado propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas o bien otro tipo de funcionalidad.

Las capturas de cefalópodos han incrementado gradualmente en la última década debido a una demanda creciente por parte del consumidor, así como a una expansión de las pesquerías a nuevos bancos y aguas más profundas. Los cefalópodos, y en particular los calamares, poseen una coloración adaptativa muy peculiar que les permite cambiar de color rápidamente y desarrollar situaciones de camuflaje y mimetismo (Mäthger *et al.*, 2009; Deravi *et al.*, 2014). Los responsables de estos cambios de coloración en piel y ojos son los llamados cromatóforos, que son células ubicadas en la dermis, y que incluyen sacos citoelásticos en cuyo interior se ubican los gránulos de pigmentos de distintas coloraciones (rojos, amarillos, marrón-negros, etc.).

Entre las distintas especies de calamares, el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es uno de los mayores cefalópodos y ha obtenido un interés económico creciente en muchos países como Chile, Perú, China, México y Japón, siendo exportado y consumido en numerosos países como los pertenecientes a la Comunidad Europea. Durante el procesamiento y

comercialización de esta especie se obtienen grandes cantidades de productos de desecho (hasta un 60% del peso total) tales como cabezas, vísceras, espinas, piel, aletas, tentáculos, etc. En relación con el aprovechamiento de la piel, la mayor parte de los esfuerzos se han centrado en la extracción y obtención de colágeno y gelatina. Sin embargo, el estudio de caracterización de pigmentos coloreados presentes en el cuerpo de diversos tipos de animales como insectos, crustáceos y los propios cefalópodos, revela la existencia de compuestos susceptibles de reflejar propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas (Branden y Decleir, 1976; Dontsov *et al.*, 1999).

PRESENTACIÓN DEL ESTUDIO

En este contexto, el presente estudio se planteó sobre la base de la posible obtención de componentes conservantes a partir de la piel de calamar gigante, como producto de desecho. Como es sabido por el consumidor, las especies marinas son altamente perecederas, por lo que existe un interés constante en la búsqueda de soluciones consistentes en la puesta en marcha de técnicas avanzadas que retrasen e inhiban, al menos parcialmente, el desarrollo de la alteración y pérdida de calidad de los productos marinos durante su procesamiento y/o conservación. Dado que los compuestos que se pretendían aislar son de tipo lipófilo, como medio extractor se partió de una disolución de ácido acético en etanol absoluto al 0.5%.

El estudio se desarrolló en tres fases sucesivas y complementarias. Una primera se centró en la caracterización del extracto de piel de calamar (EPC) (Aubourg *et al.*, 2016); para ello, se llevó a cabo un estudio de su solubilidad en distintos disolventes, un análisis de su espectro de absorción de ultravioleta-visible (UV-Vis) y de su radiación infrarroja según la transformación de Fourier (FT-IR), así como se analizó su toxicidad potencial. En una segunda fase, se estudió la habilidad potencial del EPC para inhibir el desarrollo de la oxidación lipídica (Aubourg *et al.*, 2016); para ello se aplicaron distintos ensayos clásicos (ABTS, captación de radicales del tipo ácido sulfónico-etilbenzotiazolín; ORAC, capacidad de absorción de radicales de oxígeno), así como se estudió el efecto que dicho extracto podía tener en un sistema modelo incluyendo un aceite marino sometido a oxidación acelerada (calentamiento a 50 °C durante 12 días). En la fase final, el EPC se incluyó en el hielo de refrigeración empleado durante la conservación (hasta 13 días) de dos tipos distintos de especies: merluza Europea (*Merluccius merluccius*) (Ezquerro-Brauer *et al.*, 2016) y caballa Atlántica (*Scombers scombrus*) (Ezquerro-Brauer *et al.*, 2017); para ello, el hielo empleado en ambos experimentos de conservación comercial fue preparado

a partir de una disolución acuosa de dicho extracto que se congeló y posteriormente se troceó al objeto de preparar el propio medio refrigerante.

Este estudio es un trabajo en colaboración entre componentes de tres grupos de investigación pertenecientes a tres instituciones distintas. Son, el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora (Hermosillo, Sonora, México), el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo, España) y el Departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC; Vigo, España).

CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE CALAMAR

El extracto exhibió un color amarillento, siendo su rendimiento de 8.8 ± 3.0 mg/g seco de piel, lo cual resulta ser aproximadamente un 1 % del peso de piel de calamar. Asimismo, un análisis del contenido en proteínas reflejó la ausencia de este constituyente en el extracto.

El análisis de solubilidad reflejó que el extracto no era soluble en acetona, éter etílico o cloroformo, pero sí en ácido sulfúrico acuoso al 77%, así como en metanol-2% HCl. Debido a la insolubilidad en disolventes orgánicos, la presencia de carotenoides fue descartada, pero debido a la solubilidad en el medio ácido acuoso, la presencia de melaninas fue también descartada. De acuerdo con estudios previos llevados a cabo en otros sistemas vivos, la alta solubilidad del extracto liofilizado en metanol ácido llevó a la conclusión de que los compuestos presentes podrían pertenecer al grupo de omocromos.

El espectro UV-Vis sugirió que el extracto contiene moléculas con deslocalización de electrones de tipo Π no compartidos, que absorben a 300-450 nm. El extracto reflejó dos máximos, a 422 y 369 nm, que son similares a los compuestos amarillentos previamente mencionados en la piel dorsal de sepia (*Sepia officinalis*) (Branden *et al.*, 1976) y en los ojos de camarón (*Mysis relicta*) (Dontsov *et al.*, 1999).

El espectro FT-IR del extracto exhibió las siguientes bandas de absorción máxima que se asociaron a los compuestos omocromos: i) una banda ancha a $3450-3050$ cm^{-1} , que indica una función carboxílica, así como vibraciones de alargamiento de los enlaces N-H y C-H; ii) una banda a $1500-1425$ cm^{-1} , que es característica de ácidos carboxílicos y de las vibraciones de flexión de los enlaces N-H y C-H; y iii) una banda a $1240-1050$ cm^{-1} , que indica vibraciones de alargamiento de los enlaces C-O y C-N. Asimismo, la muestra reflejó dos picos de

absorción a 1740 y 1670 cm^{-1} , correspondientes a vibraciones de flexión de los enlaces C=O de tipo carbometoxi y quinónico, respectivamente, que son típicos de compuestos omocrómicos del tipo xantomatina.

La información obtenida por los experimentos de solubilidad y espectroscópicos (UV-Vis y FT-IR) sugiere que los compuestos extraídos de la piel de calamar empleando ácido acético-etanol son compuestos del tipo omocromo.

Como última parte del estudio de caracterización, se analizó su potencial mutagénico. Para ello, dos tipos de cepas test de Salmonella (TA98 y TA100), con y sin bioactivación (S9), fueron expuestas a distintas concentraciones del EPC. La mutagenicidad ejercida por los extractos de piel de calamar fue considerada negativa sobre la base de que el número de colonias revertidas por placa no dobló el número de revertidas de forma espontánea.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los ensayos ABTS y ORAC son métodos empleados comúnmente para la determinación de la capacidad antioxidante de compuestos naturales provenientes de alimentos o sistemas biológicos en general. En el ensayo ABTS, el antioxidante facilita la reducción de un radical ABTS+• generado previamente por oxidación de ABTS por reacción con persulfato sódico. En el estudio presente, la reducción del radical ABTS+• por antioxidantes presentes en el EPC generó un valor de 13.2 $\mu\text{moles TE}$ (equivalentes trolox)/g extracto, empleando una concentración de extracto de piel de calamar de 2 mg/mL. Como resultado, se concluye que el EPC refleja actividad como antioxidante y opera bajo un mecanismo de transferencia de electrones que reduce los compuestos oxidantes. De forma similar, se aplicó el método ORAC, que indicó un valor de 15.4 $\mu\text{moles TE/g}$ extracto, a la misma concentración que en el caso del ensayo de ABTS (2 mg/mL). Como resultado, se presume que el EPC tendría capacidad para transferir átomos de hidrógeno, y por tanto resultaría interesante explotar su posibilidad de actuar como antioxidante.

Finalmente, se estudió la capacidad antioxidante del EPC en un sistema modelo consistente en un aceite marino comercial (aceite de hígado de bacalao, AHB) tratado térmicamente. Para ello, una disolución clorofórmica de AHB se mezcló con diferentes cantidades de extracto de EPC (0.0, 0.2, 0.5 y 1.0 % respecto al aceite; muestras T-0, T-1, T-2 y T-3, respectivamente). La mezcla se sometió a un calentamiento de 50 °C durante 12 días, llevándose a cabo tomas de muestra en los tiempos 0, 2, 6, 8 y 12 días. Los análisis llevados a cabo se

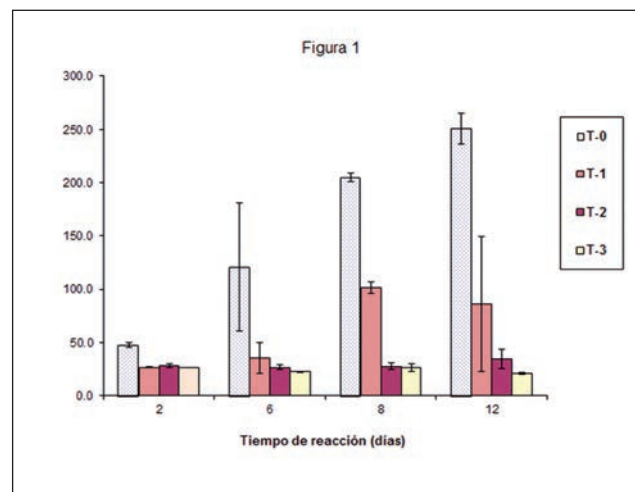


Figura 1: Determinación (tres replicados, n=3) del índice de peróxidos (meq. oxígeno activo/kg lípidos) en aceite marino sometido a oxidación acelerada en presencia de distintas concentraciones (T-0, T-1, T-2 y T-3) de extracto de piel de calamar.

enfocaron a la medida del desarrollo de la oxidación del aceite marino, de acuerdo con los siguientes índices: contenido en dienos y trienos conjugados, peróxidos (índice de peróxidos, IP) e índice del ácido tiobarbitúrico (TBA-i). Asimismo, se llevó a cabo el análisis de la composición de ácidos grasos con especial incidencia en el contenido en ácidos polinsaturados. Así, se estudió el llamado índice de polienos (IPol), consistente en la siguiente relación de contenidos de ácidos grasos: $(\text{C22:6}\omega3 + \text{C20:5}\omega3) / \text{C16:0}$.

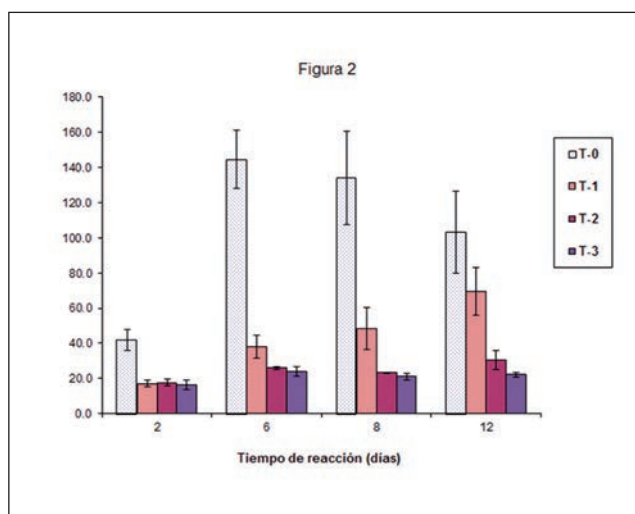


Figura 2: Determinación (tres replicados, n=3) del índice del ácido tiobarbitúrico en aceite marino sometido a oxidación acelerada en presencia de distintas concentraciones (T-0, T-1, T-2 y T-3) de extracto de piel de calamar.

Como resultado, se observó un descenso en el contenido en todos los índices de medida de la oxidación lipídica al aumentar la presencia del EPC en el medio de reacción. En las Figuras 1 y 2 se reflejan los resultados obtenidos para los índices de peróxidos y TBA, respectivamente. En ellas se constata cómo la presencia del EPC lleva a una inhibición fuerte de productos de oxidación tanto primaria (Figura 1) como secundaria (Figura 2); este efecto fue especialmente fuerte para las dos concentraciones mayores del extracto. Como resultado de esta inhibición del desarrollo de la oxidación lipídica, se pudo constatar una retención mayor del IPol. Así, a tiempo final de reacción (día 12), los valores obtenidos para el IPol fueron de 1.34, 1.47, 1.64 y 1.62, para las muestras T-0, T-1, T-2 y T-3, respectivamente. En base a las medidas de oxidación, se concluyó que la presencia en el sistema modelo de un valor de EPC igual o superior a 0.5% llevaba a una inhibición significativa de la oxidación del aceite marino en las condiciones de reacción.

APLICACIÓN DEL EXTRACTO DE PIEL DE CALAMAR EN PROCESOS COMERCIALES

Como última fase del estudio, se analizó la posibilidad de aprovechar la capacidad conservante del EPC de cara al procesamiento de pescado en condiciones comerciales. Para ello, se partió de hielo preparado a partir de una disolución acuosa de extracto de piel de calamar, procediéndose a su comparación con el empleo como control de hielo

preparado únicamente a partir de agua (hielo tradicional). Se estudiaron los cambios sensoriales, microbiológicos y químicos producidos en el pescado durante su conservación en refrigeración hasta 13 días. Las especies escogidas para esta parte del estudio fueron caballa Atlántica (*Scomber scombrus*) y merluza Europea (*Merluccius merluccius*). Ambas especies son de conocida importancia en la costa gallega, y representan dos prototipos de especies, siendo la primera una especie pelágica grasa, mientras que la segunda es una especie demersal magra. Como paso previo a cada uno de los experimentos con pescado, se llevó a cabo un estudio enfocado a optimizar la cantidad de EPC a utilizar, de manera que los atributos propios del pescado (olor, color, etc.) no se viesan modificados por la presencia del EPC en el hielo de conservación. Como resultado de esta optimización, se escogieron concentraciones de EPC lo suficientemente altas como para tener efecto conservante, pero garantizando la no interacción con los atributos típicos del pescado.

En lo que se refiere al experimento de conservación de caballa, se ensayaron tres concentraciones distintas de EPC (T-1, T-2 y T-3, orden creciente de contenido), cuyo efecto fue comparado con un control (T-0) correspondiente a hielo tradicional. Como resultado, se observó una inhibición de la actividad microbiana en el lote de pescado correspondiente a la mayor concentración de extracto (T-3) de acuerdo con la determinación de parámetros microbiológicos (presencia de microorganismos aerobios, psicrótrofos, Enterobacterias, proteolíticos y lipolíticos) y químicos (pH y trimetilamina,

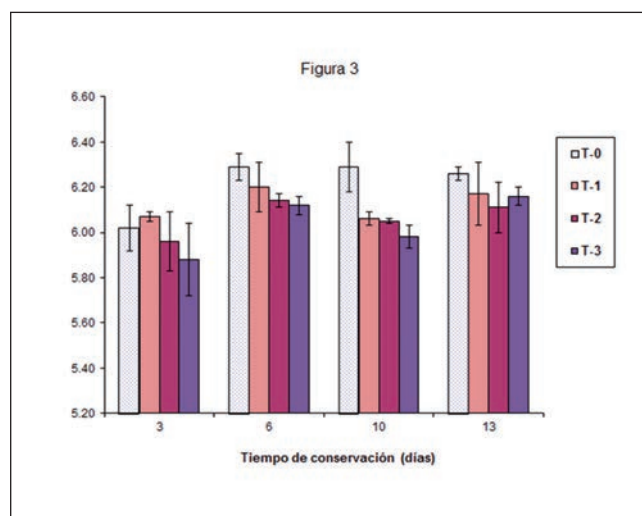


Figura 3: Determinación (tres replicados, n=3) del pH en músculo de caballa conservada en hielo incluyendo distintas concentraciones de extracto de piel de calamar.

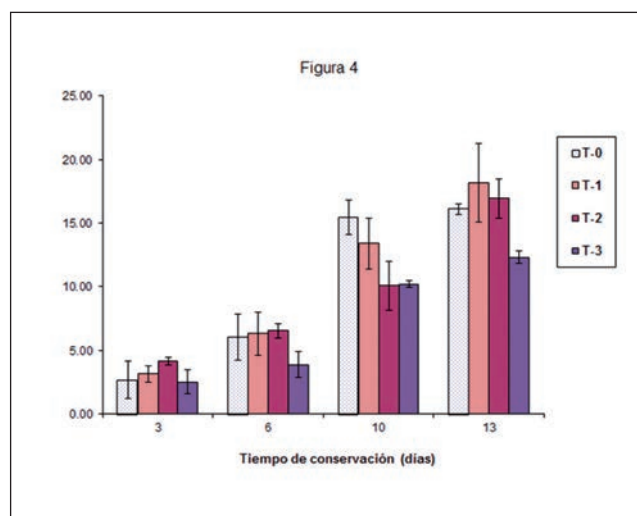


Figura 4: Determinación (tres replicados, n=3) del contenido en trimetilamina (mg N-TMA/kg músculo) en músculo de caballa conservada en hielo incluyendo distintas concentraciones de extracto de piel de calamar.

TMA). Asimismo, el pescado correspondiente a cualquiera de los lotes incluyendo EPC reflejó valores inferiores de microorganismos proteolíticos y pH que el control. Los resultados obtenidos en pH y TMA se encuentran reflejados en las Figuras 3 y 4, respectivamente. En estas figuras puede comprobarse cómo el pescado conservado en las condiciones de hielo incluyendo la mayor concentración del EPC refleja valores inferiores para ambos parámetros químicos. De acuerdo con los parámetros microbiológicos y químicos, el análisis sensorial reveló una extensión importante del tiempo de vida útil en caballa refrigerada en presencia de la mayor cantidad de EPC ensayada; así, los individuos pertenecientes a dicho lote fueron declarados aceptables después de 13 días de conservación, mientras que las muestras de los demás lotes no resultaron aceptables en ese tiempo de conservación.

En lo que se refiere a la conservación de merluza, únicamente se ensayaron dos concentraciones de EPC (T-1 y T-2), que fueron comparadas con las condiciones de hielo tradicional (T-0). Como resultado, se observó una inhibición importante de la actividad microbiana medida a través de la presencia de microorganismos aerobios, psicrótrofos, Enterobacterias y proteolíticos, así como de la medida de parámetros químicos relacionados con la actividad microbiana (pH y TMA) en merluza correspondiente a la mayor concentración de EPC. Asimismo, las muestras de pescado correspondientes a dicha condición (T-2) reflejaron una inhibición de la hidrólisis lipídica (formación de ácidos grasos libres; Figura 5), al ser comparados con las piezas de pescado correspondientes a la

condición control (T-0). En relación a la oxidación lipídica, el desarrollo de ésta fue relativamente bajo como corresponde a la conservación en refrigeración de una especie magra. Sin embargo, la determinación del IP reflejó una inhibición de la formación de productos de oxidación primaria en los individuos correspondientes al tratamiento incluyendo la mayor concentración del EPC (T-2; Figura 6). Finalmente, el análisis sensorial (piel, mucosidad, ojos, branquias, textura, olor externo, olor del músculo crudo y cocido, sabor) indicó un incremento del tiempo de vida útil de merluza refrigerada conservada en hielo incluyendo la mayor de las concentraciones ensayadas; así, las piezas conservadas en esta condición fueron consideradas aceptables para el consumo al final del experimento (día 13), mientras que los demás tipos de muestras no lo fueron.

CONCLUSIONES

Como resultado de este conjunto de experimentos, se ha comprobado que el EPC en ácido acético-etanol puede ser considerado como una fuente válida de componentes antioxidantes y antimicrobianos. De acuerdo con investigación previa llevada a cabo en otros tipos de sistemas vivos, los estudios de caracterización llevados a cabo en la primera fase justifican este efecto conservante como resultado de la presencia de compuestos lipófilos del tipo omocromos. Consiguientemente, la piel de calamar puede ser empleada de forma exitosa al objeto de obtener nuevos compuestos

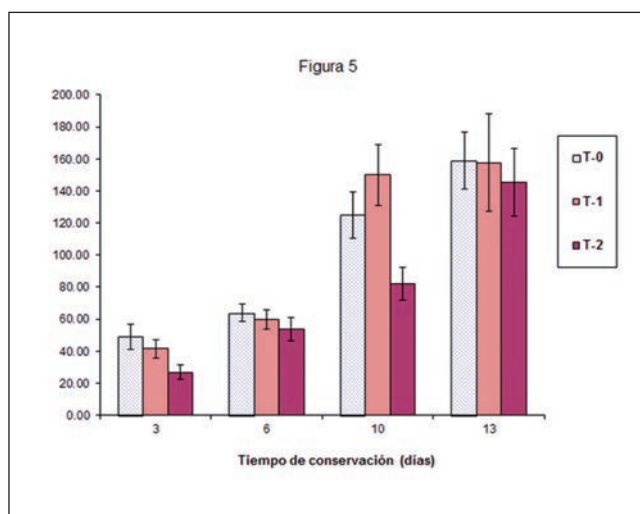


Figura 5: Determinación (tres replicados, n=3) del contenido en ácidos grasos libres (mg/kg músculo) en músculo de merluza conservada en hielo incluyendo distintas concentraciones de extracto de piel de calamar.

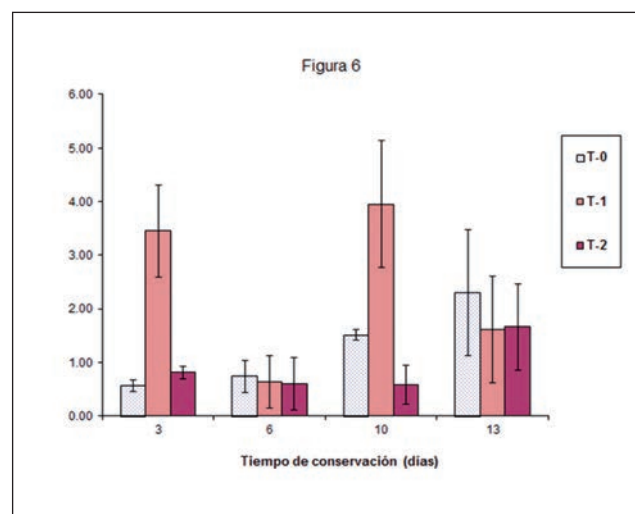


Figura 6: Determinación (tres replicados, n=3) del índice de peróxidos (meq. oxígeno activo/kg lípidos) en músculo de merluza conservada en hielo incluyendo distintas concentraciones de extracto de piel de calamar.

relacionados con las industrias de procesamiento y farmacéuticas, redundando en la sostenibilidad del medio ambiente y llevando a un mejor empleo los productos de desecho de la comercialización de calamar gigante.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento por la financiación recibida al CONACYT-Méjico (Proyecto 154046), al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, España) (Proyecto 2013-70E001) y a la Universidad de Sonora (Méjico) (USO31302163).

BIBLIOGRAFÍA REFERIDA

1. Aubourg, S. P., Torres-Arreola, W., Trigo, M., Ezquerro-Brauer, J. M. (2016). Partial characterization of jumbo squid skin pigment extract and its antioxidant potential in a marine oil system. *European Journal of Lipid Science and Technology* 118 1293-1304.
2. Blanco, M., Sotelo, C. G., Chapela, M^a J., Pérez-Martín, R. O. (2007). Towards sustainable and efficient use of fisheries research: present and future trends. *Trends in Food Science and Technology* 18, 29-36.
3. Branden, V.D.C., Declair, W. (1976). A study of the chromatophore pigments in the skin of the cephalopod *Sepia officinalis* L. *Biologisch Jaarboek Dodonaea* 44, 345-352.
4. Deravi, L.F., Magyar, A.P., Sheeny, S.P., Bell, G.R.R., Mäthger, L.M., Senft, S.L., Wardill, T.J., Lane, W.S., Kuzirian, A.M., Hanlon, R.T., Hu, E.L., Parker, K.K. (2014). The structure-function relationships of a natural nanoscale photonic device in cuttlefish chromatophores. *Journal of the Royal Society Interface* 11, 20130942.
5. Dontsov, A.E., Fedorovich, I.B., Lindström, M., Ostrovsky, M.A. (1999). Comparative study of spectral and antioxidant properties of pigments from the eyes of two *Mysis relicta* (Crustacea, Mysidacea) populations, with different light damage resistance. *Journal of Comparative Physiology B* 169, 157-164.
6. Ezquerro-Brauer, J. M., Miranda, J. M., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S. P. (2016). Effect of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract on the microbial activity in chilled mackerel (*Scomber scombrus*). *LWT-Food Science and Technology* 72, 134-140.
7. Ezquerro-Brauer, J. M., Miranda, J. M., Chan-Higuera, J., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S. P. (2017). New icing media for quality enhancement of chilled hake (*Merluccius merluccius*) using a jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin extract. *Journal of the Science of Food and Technology* 97, 3412-3419.
8. Mäthger, L.M., Denton, E.J., Marshall, N.J., Hanlon, R.T. (2009). Mechanisms and behavioural functions of structural coloration in cephalopods. *Journal of the Royal Society Interface* 6, S149-S163.

INTERACCIÓN ENTRE DOS ANILLOS DE YBaCuO

SUPERCONDUCTORES CON CORRIENTES I_A e I_B

G. Briones Galán, G. Domarco, L. Román

Departamento de Física Aplicada, Universidad de Vigo, As Lagoas s/n, 32004 Ourense, España

RESUMEN

En los sistemas acumuladores de energía, ésta es tanto mayor cuanto mayor es la corriente que circula por la bobina (o anillo), $\frac{1}{2} LI^2$. Para almacenamientos importantes necesitamos que las I sean elevadas. No sabemos qué pasa con las corrientes magnetizantes de los campos magnéticos durante una atracción y durante una repulsión. Si utilizamos una bobina, por la que pasa una corriente de I_a (amperios) enfrentada a otra bobina de I_b (amperios) no sabemos cómo afectan la atracción o repulsión magnéticas a esta corriente que circula por ellas. Esto sólo es posible si utilizamos corrientes libres en anillos o bobinas. Es decir los anillos deben albergar corrientes permanentes, o sea anillos superconductores. Para esto investigamos en qué condiciones, si de atracción o repulsión, podemos almacenar el máximo de energía.

FUNDAMENTOS

En un anillo superconductor en cuyo orificio existe un flujo magnético Φ , si se retira este flujo del orificio se genera una corriente eléctrica tal que se opone a la disminución del flujo y es capaz de regenerar en el orificio el flujo que existía inicialmente antes de ser retirado Φ .

Las corrientes en estos materiales tienen lugar sin ninguna resistencia óhmica.

Un circuito de corriente al ser atacado por un flujo magnético está sometido a la ley de Faraday-Lenz, y esto es lo que vamos a utilizar. Nos servimos de dos anillos superconductores (a) y (b) en los que hemos introducido sendas corrientes permanentes iniciales I_a e I_b .

Sea $\Phi_a(t)$ el flujo en el anillo (a), la ley de Faraday-Lenz dice que:

$$\Delta\Phi/\Delta t = -V = -RI \quad 1$$

Y puesto que $R=0$

$$\Delta\Phi/\Delta t = 0$$

Es decir $\Phi_a(t)=Cte$, no varía el flujo magnético Φ . Siendo Φ el flujo inicial que atraviesa el circuito de corriente.

El flujo magnético en el anillo (a) es siempre el flujo inicial, es decir $\Phi_a = L_a i_a$, donde L_a es la autoinductancia del anillo (a) e i_a la corriente inicial en el anillo (a).

Cada uno de estos anillos al ser atacado por un flujo magnético (ya sea aumentándolo o disminuyéndolo) genera en su interior una diferencia de potencial que da origen a una corriente suplementaria en el recorrido de su circuito que se opone al flujo atacante. i_a e i_b son las corrientes iniciales en (a) y (b), I_a e I_b son las corrientes finales en (a) y (b).

Cuando enfrentamos los dos anillos durante una **atracción** se suman los flujos (son del mismo signo). El flujo magnético que atraviesa (a) es $\Phi_a = L_a I_a$ y el flujo magnético que atraviesa (b) es $\Phi_b = L_b I_b$, pero el flujo de (b) que atraviesa (a) es MI_b , donde M es la inductancia mutua entre (a) y (b). Y ya que el flujo en un anillo superconductor no puede variar:

$$L_a i_a = L_a I_a + MI_b \quad 2$$

$$L_b i_b = L_b I_b + MI_a$$

Aquí vemos que durante una **atracción** magnética, la corriente final en (a) ($I_a < i_a$) es menor que su corriente inicial, lo mismo sucede en el anillo (b).

Mientras que en una **repulsión** los flujos son de signo distinto, y aquí se restan:

$$L_a i_a = L_a I_a - M I_b$$

$$L_b i_b = L_b I_b - M I_a$$

3

Aquí vemos que durante una **repulsión** magnética, la corriente final en (a) ($L_a > i_a$) es mayor que su corriente inicial, lo mismo sucede en el anillo (b).

De las ecuaciones (2) y (3) deducimos el valor de las corrientes finales en función de los parámetros iniciales.

VARIACIONES DE CORRIENTE DURANTE LA ATRACCIÓN (O REPULSIÓN)

Atracción: De las ecuaciones (2) despejando I_a e I_b tenemos

$$I_a = L_b(L_a i_a - M i_b) / (L_a L_b - M^2)$$

$$I_b = L_a(L_b i_b - M i_a) / (L_a L_b - M^2)$$

4

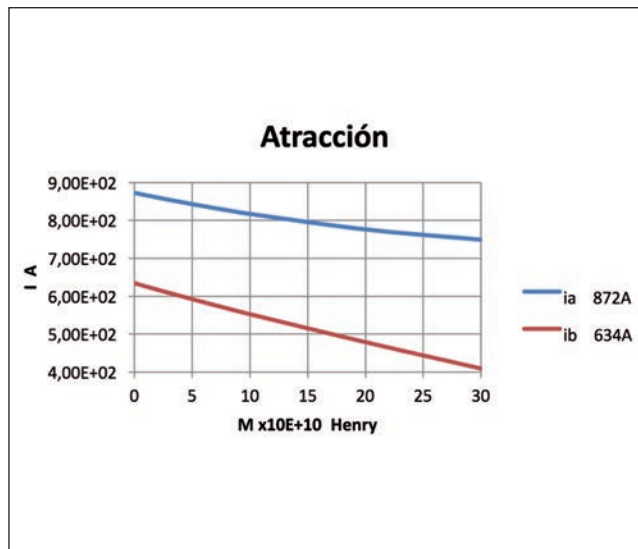


Figura 1. A medida que se acercan las muestras M disminuye.

Repulsión: De las ecuaciones (3) despejando I_a e I_b tenemos

$$I_a = L_b(L_a i_a + M i_b) / (L_a L_b - M^2)$$

$$I_b = L_a(L_b i_b + M i_a) / (L_a L_b - M^2)$$

5

Si no hubiese inducción, $M=0$, las corrientes se mantendrían constantes tanto en atracción como en repulsión, y las fuerzas serían simétricas, es decir, coincidirían en valor absoluto.

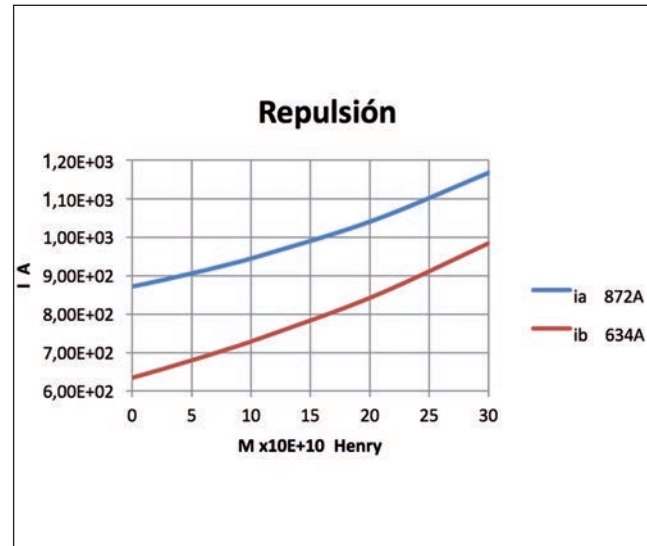


Figura 2. A medida que se acercan las muestras M aumenta.

PROCESO EXPERIMENTAL

En el proceso experimental medimos las fuerzas ejercidas entre los anillos (en repulsión y atracción) en función de la distancia entre éstos, $F(x)$. Estas fuerzas son proporcionales a $I_a I_b$ y disminuyen con una cierta potencia de la distancia.

El procedimiento consiste en medir dicha fuerza con una balanza.

Las muestras están introducidas dentro de un criostato con Nliq y la balanza detecta, no sólo la fuerza de repulsión, sino también el peso del criostato más la cantidad de Nliq contenido en él. A esto hay que añadir el empuje de Arquímedes de la muestra sumergida en el líquido más el empuje del vástago a medida que se introduce más y más. Tenemos, pues, que aislar todos estos efectos para medir únicamente la fuerza de repulsión.

El procedimiento de aislamiento se realiza de la siguiente forma:

Uno de los anillos (el que se encuentra libre del criostato) se aparta y es remplazado por otro anillo de las mismas dimensiones, sin corriente y no conductor para que no se ejerza inducción alguna. Permanece sólo el que está anclado al criostato. En estas condiciones desaparecen las fuerzas de repulsión (F_{ri}), y lo único que medimos con la balanza son las fuerzas debidas al peso del criostato (F_p), al peso del Nliq (F_{Nliqi}) y las fuerzas derivadas de la acción de Arquímedes (F_{Arqi}):

$$F_{1i} = F_p + F_{Nliqi} + F_{Arqi}$$

Se procede a la medida, mediante un cronómetro a intervalos iguales punto por punto. Estos datos son almacenados en F_1 .

De otra parte, se efectúan las mismas medidas, en las mismas condiciones (llenado de N_{liq} a la misma altura, a partir de la misma distancia, y durante los mismos intervalos de tiempo), pero, ahora, con el anillo auténtico, con su respectiva corriente eléctrica y estos datos se almacenan en otro archivo (F_2):

$$F_{2i} = F_{Ri} + F_p + F_{N_{liq} i} + F_{Arqi}$$

Para conocer la fuerza que actúa entre los anillos, de las fuerzas registradas del último archivo almacenado (F_2) se sustraen las fuerzas registradas en el primero (en que no había fuerzas de repulsión). Y así quedan las únicas fuerzas de repulsión, limpias de todas las otras fuerzas colaterales del equipo experimental. $F_{Ri} = F_{2i} - F_{1i}$

Las distancias x se calculan, 1º midiendo la distancia máxima de separación. Cada dato que se ha medido está separado del anterior por una distancia de 0,5 mm, que se va restando de la distancia máxima.



Figura 3. Aparato de medida

COMPROBACIÓN EXPERIMENTAL CON ANILLOS SUPERCONDUCTORES

Las fuerzas son proporcionales a $I_a I_b$ y disminuyen a medida que aumenta la distancia. Utilizamos para la experiencia 3 parejas de anillos superconductores: P1 P2, P1 P3 y P2a P5.

Las corrientes permanentes que circulan por cada anillo son:

En P1 circula una corriente permanente de 5551 Amperios, en P2 la corriente es de 238 Amperios. En esta pareja, por P1 pasa una corriente 23 veces mayor que en P2. En P3 circula una corriente permanente de 1586 Amperios. En P2a circula una corriente permanente de 872 Amperios. En P5 circula una corriente de 634 Amperios.

Con estas parejas de muestras comprobamos la disminución de la corriente en cada una de ellas durante la atracción electromagnética y el aumento de corriente durante la repulsión.

Para esto medimos la fuerza ejercida entre ellas en función de su distancia $F(x)$. En todas estas parejas, si las corrientes e permaneciesen constantes ($M = 0$), los valores absolutos de las fuerzas durante la atracción y durante la repulsión serían iguales y estarían sobre la misma curva. Pero como las I (corrientes) en atracción disminuyen y en repulsión aumentan, ambas curvas divergen a medida que la distancia disminuye.

En los superconductores a los portadores de carga no les afecta la agitación térmica, se mueven por la red cristalina sin interaccionar con los iones anclados en la red y sin ninguna resistencia a su movimiento, en cierto modo son independientes y se mueven de un núcleo a otro sin anclarse a ninguno, éstos sirven de soporte para que los portadores de carga se mantengan en la red. Mientras que todas las otras partículas atadas al núcleo participan de la agitación térmica e incluso los mismos núcleos. Ver en las Figuras 4, 5 y 6 los resultados experimentales de $F(x)$ para la atracción y la repulsión

En la figura 4 se anulan las fuerzas cuando una de las intensidades (I_a o I_b) se anula. Este valor tiene lugar (Ec.(4)) a la distancia de 16.5 mm en que $M_0 = L_b/23$, donde $I_b = 0$. Si $M > M_0$, $I_b = (-)$. Se hace negativo y las fuerzas cambian de sentido.

La diferencia entre las fuerzas de repulsión (F_R) y las fuerzas de atracción (F_A), Ec. (4) y (5),

$F_R - F_A = 2KM(L_a i_a^2 + M L_b i_b^2)$ es siempre positiva y aumenta al aumentar M (o disminuir x). Si $M = 0$, la diferencia es 0.

TABLA 1

SAMPLE	P1	P2	P3	P4	P5
i(A)	5551	238	1586	872	634

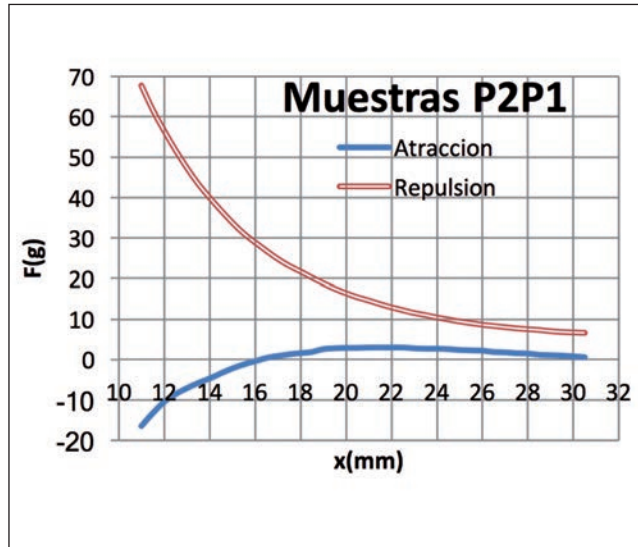


Figura 4. Fuerzas de atracción y repulsión vs. distancia entre P1 (ia=5551A) y P2 (ib=238A). Las fuerzas están en gramos.

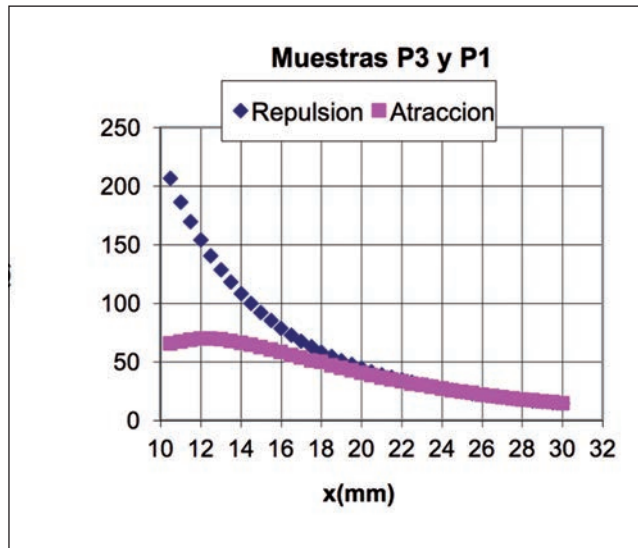


Figura 5. Fuerzas de atracción y repulsión vs. distancia entre P1 (ia= 5551A) y P3 (ib=1586A).

MUESTRAS P2 P5

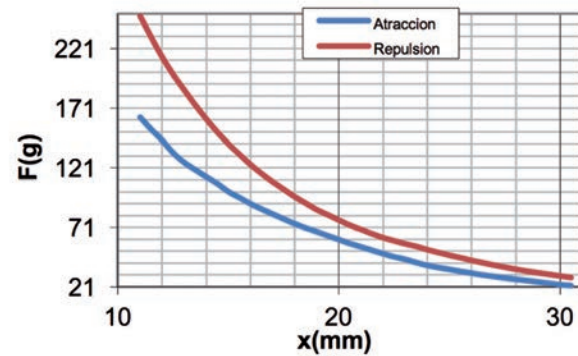


Figura 6. Fuerzas de atracción y repulsión vs. distancia entre P4 (ia=872A) y P5 (ib=634A).

En la Figura 4 existe una gran diferencia de corriente entre i_a e i_b de ésta manera la disminución de corriente sobre I_b , durante la atracción, es muy fuerte y la corriente de I_b no sólo llega a anularse sino que también cambia de sentido. Veamos cómo se expresa el trabajo de las fuerzas magnéticas (Fdx) en una atracción(o repulsión). Si no hay gradiente de campo ($\partial H/\partial x = 0$), en un campo uniforme, $F = 0$. La fuerza F para un material con un momento magnético M (A/m) por unidad de volumen sólo existe si hay un gradiente de campo en el entorno de M ($\partial H/\partial x \neq 0$). Es decir:

$$F = M \partial H / \partial x \text{ (Nw/m}^3\text{)}$$

$$F dx = V M dH \text{ (m}^3 \times \text{A/m} \times \text{Tesla) =}$$

$$= \text{Amp} \times \text{m}^2 \times \text{Tesla} =$$

$$= Id\Phi \text{ (Joules).}$$

Tesla $\times \text{m}^2$, también se puede expresar en las unidades de Volts $\times$ segundo, lo que también nos da:

$$Fdx \text{ (Amp} \times \text{Volts} \times \text{segundos) (Joules), es decir:}$$

$$F dx = V M dH = I d\Phi$$

La corriente que circula por los anillos puede ser frenada (o aumentada) por medio de una f.e.m. (diferencia de potencial) de inducción que actúa sobre los portadores de carga, esto tiene lugar por medio de la inductancia mutua M , que es lo que vehicula la inducción entre los anillos. El trabajo mecánico $F dx$ de atracción (o repulsión) representa la energía perdida (o ganada) por los portadores de carga presentes en estos anillos, donde la disminución (o aumento) de energía viene determinado por $Id\Phi$.

$$F_R - F_A = \frac{2L_a L_b M (L_a i_a^2 + M L_b i_b^2)}{(L_a L_b - M^2)^2} F(x)$$

8

$F(x)$ se puede asimilar a un polinomio de grado 4.

Esta diferencia es siempre positiva y aumenta al aumentar M (disminución de la distancia).

CONCLUSIÓN

Las Corrientes que circulan en los anillos pueden ser frenadas (o aceleradas) por medio de una f.e.m. que actúa sobre los portadores de carga. Esto tiene lugar porque la inducción mutua M actúa como un vehículo para la inducción entre las muestras. El trabajo mecánico de atracción (o repulsión) Fdx representa la pérdida (o ganancia) de energía de los portadores de carga que están presentes en ambos anillos, en que la disminución (o aumento) de energía están determinados por $Id\phi$.

La energía almacenada por el par de anillos en cuestión está representada por el área bajo la curva y el eje de las x ($\int Fdx$). Vemos que las curvas de repulsión pueden almacenar mucha más energía que lo harían las curvas de atracción.

RECONOCIMIENTO

Este trabajo forma parte del Proyecto de investigación 09REM007383PR. Los autores agradecen a la Consellería de Economía e Industria (Xunta de Galicia) por el aporte financiero.

BIBLIOGRAFÍA

1. H. González-Jorge, J. Peleteiro, E. Carballo, L. Romaní, and G. Domarco. Procedure to induce a persistent current in superconducting cylinders or rings. *App. Phys. Lett.*, 81(22): 4207–4208, 2002.
2. I. Karaca. Characterization of a cylindrical superconductor disk prepared by the wet technique with microstructure analysis and levitation force measurements using a permanent magnet. *Chinese Journal of Physics*, 47(5): 690–696, October 2009.
3. U. Hartmann M. Becker, M. R. Koblichka. Measurement of levitation forces of high- T_c superconductors. *Physics Education*, 45 (1), January 2010.
4. E. Durand. *Magnetostatique*. Massonet Cie, 120, Boul, Saint-Germain, Paris.
5. Hans-Gerd Ku'schner Bertrand Lu'cke Helmut Piel Beate, Lehndorf. Levitation-force measurements and field mapping of melt-processed Y Ba Cu O ceramics. *Elsevier, PhysicaC*, page 247, January 2000.
6. B. J. Crosby J. C. Macforlane J. Unsworth, J. Du. Magnetic levitation force measurements on high T_c superconducting ceramics / polymer composites. *Magnetics IEEE transactions*, August 2002.

ESPAÑA FORMARÁ PARTE DEL COMITÉ EJECUTIVO DE LA COMISIÓN OCEANOGRÁFICA INTERGUBERNAMENTAL DE LA UNESCO

La representación la ejercerá el jefe del Área de Medio Marino del Instituto Español de Oceanografía (IEO), Rafael González-Quirós

Durante la Asamblea General de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI) de la UNESCO celebrada en París, España fue elegida para formar parte de su Comité Ejecutivo, integrado por 39 de los 148 países que componen esta institución encargada de promover la cooperación y coordinación internacional de programas de investigación y observación de los océanos.

España ha entrado a formar parte del Comité Ejecutivo de la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO (COI-UNESCO) tras celebrarse recientemente las últimas elecciones durante la Asamblea General en la sede de la UNESCO en París.

La representación española en dicho comité la ejercerá Rafael González-Quirós, Jefe del Área de Medio Marino del IEO.

El objetivo de la COI-UNESCO es promover la cooperación y coordinación internacional de programas de investigación y observación de los océanos y el desarrollo de capacidades, que incrementen el conocimiento sobre la naturaleza y los recursos del océano y de las zonas costeras para promover la gestión, el

desarrollo sostenible, la protección del medio ambiente marino y facilitar la toma de decisiones de los estados miembros. Además, la COI es reconocida por la Convención de la Ley del Mar de la Organización de Naciones Unidas como la organización internacional competente en el campo de investigación científica y transferencia tecnológica marinas.

Entre los programas de la COI destacan el Sistema de Observación Oceánica Global (GOOS, en sus siglas en inglés), el de Alerta Temprana de Tsunamis, el de Intercambio de Información y Datos Oceanográficos Internacional, la Comisión Conjunta entre la COI y la Organización Meteorológica Mundial, el del estudio de la batimetría de los océanos en colaboración con la Organización Hidrográfica Internacional y el de Algas Tóxicas. En todos estos programas existe un objetivo transversal de desarrollo de capacidades y de transferencia de conocimiento desde los países más desarrollados a los que tienen menos recursos.

La COI-UNESCO se constituyó en 1960 como un organismo autónomo dentro de la UNESCO, siendo la única organización competente en ciencia marina dentro de la ONU.

España fue elegida para formar parte de su Comité Ejecutivo, integrado por 39 de los 148 países que componen esta institución encargada de promover la cooperación y coordinación internacional de programas de investigación y observación de los océanos.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE ECONOMÍA
EMPREGO E INDUSTRIA

gain

CCT
INSTITUTO CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA