

# ¿Cómo medir el impacto y la toxicidad de las emisiones relacionadas con las actividades petroleras en los animales, plantas y suelos?

---

*Thibaut Lévêque  
Laurence Maurice  
Eva Schreck  
Fiorella Barraza  
Christophe Furger  
Hélène Budzinski  
Gaëlle Uzu*

## **La biodisponibilidad y la bioaccesibilidad**

La población humana puede asimilar los contaminantes ambientales por tres vías principales de exposición: la inhalación, la absorción cutánea y la ingestión. Sin embargo, la asimilación a través de la alimentación representa la principal fuente de exposición a contaminantes ambientales. En efecto, más del 90 % de los contaminantes orgánicos e inorgánicos son absorbidos a través de los alimentos (Fries, 1995), y podrían ser la causa del 30 % de los cánceres asociados con una exposición crónica (Mansour *et al.*, 2009). El suelo es también una fuente importante de contaminantes. Los niños pequeños (de 0 a 6 años) al llevarse los dedos a la boca pueden asimilar 100 a 150 mg de suelo/día

(fuera de la geofagia). Los niños de zonas rurales que viven en pequeñas comunidades afectadas por la explotación petrolera o ciertas prácticas agrícolas son también vulnerables a los contaminantes contenidos en el suelo.

La exposición de la población humana a los metales pesados por vía digestiva depende de la biodisponibilidad gastrointestinal. La biodisponibilidad gastrointestinal es la fracción de un compuesto ingerido (un decontaminante o de un nutriente, por ejemplo) que es absorbido por la pared intestinal y que llega a la circulación sanguínea. Este contaminante puede provocar una respuesta biológica (un efecto negativo o positivo). La biodisponibilidad gastrointestinal depende de las inte-

racciones físicas, químicas y biológicas que determinan absorción de contaminantes presentes en los alimentos.

Con el fin de determinar con mayor precisión el nivel de exposición de las poblaciones humanas, es necesario tomar en cuenta el concepto de biodisponibilidad, lo que actualmente no se lleva a cabo en las evaluaciones cuantitativas de riesgos sanitarios. Para acercarse a la biodisponibilidad de manera simplificada, sin pasar por la experimentación animal, se ha medido la bioac-

cesibilidad gastrointestinal. La bioaccesibilidad gastrointestinal es la fracción de un compuesto ingerido que es extraído de su matriz (alimentos, cultivos, suelos, etc.) por los fluidos digestivos a nivel del sistema salival y del tracto intestinal y que se encuentra en el lumen digestivo, disponible para la absorción. Para medir la bioaccesibilidad se procede con la disolución de los contaminantes a realizarse en el tracto gastrointestinal. El vínculo entre bioaccesibilidad y biodisponibilidad esta explicado en la figura 17.

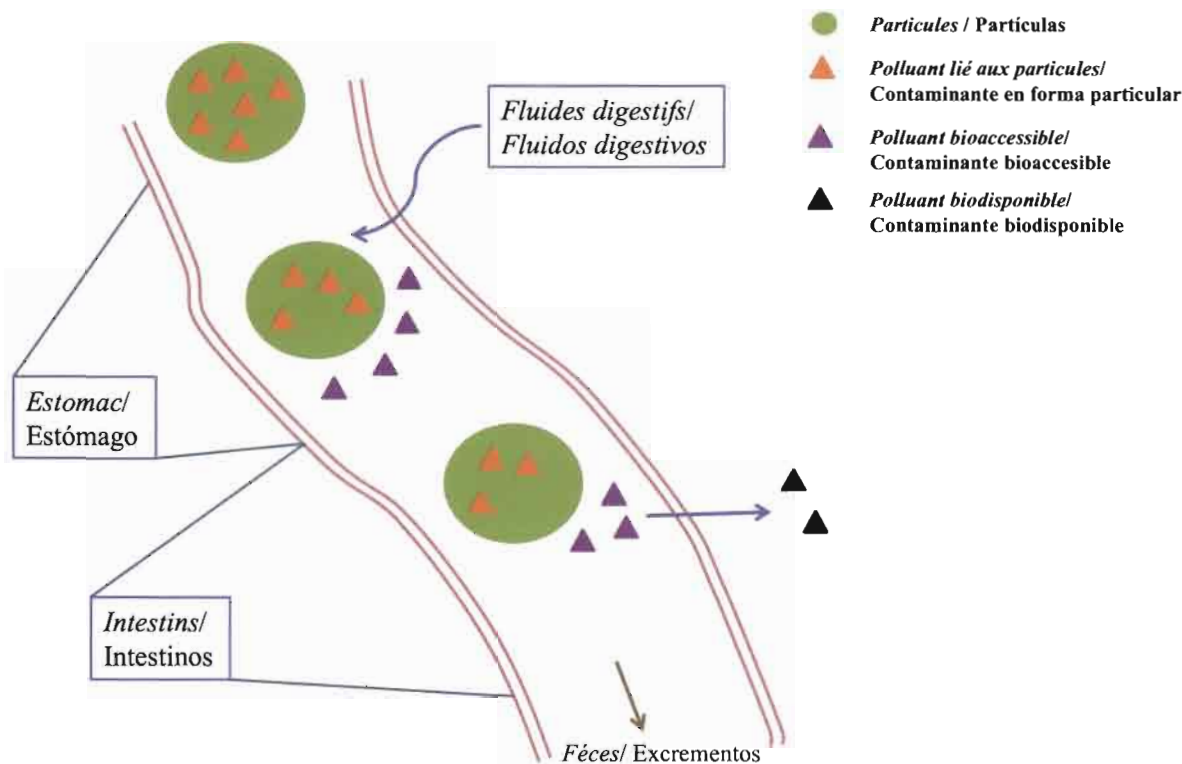


Figura 17. Esquema de la relación entre bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Lévêque, 2014 adaptado de Caboche, 2009)  
 Figure 17. Schéma de la relation entre bioaccessibilité et biodisponibilité (Lévêque, 2014 adapté de Caboche, 2009).

La bioaccesibilidad gastrointestinal de los metales pesados se mide utilizando el test de bioaccesibilidad BARGE (BioAccessibility Research Group Europe). Esta prueba consiste en una serie de extracciones sucesivas de los contaminantes contenidos en una matriz (plantas, alimentos o suelos) con ayuda de soluciones digestivas sintéticas: soluciones salivales, gástricas, duodenales y biliares. La bioaccesibilidad gastrointesti-

nal humana de un contaminante es regida por muchos parámetros, tales como la fisico-química de los elementos estudiados, el tamaño de las partículas y la especiación (forma química del contaminante), la concentración total, la naturaleza de la matriz vegetal, el impacto biótico, etc. La siguiente figura resume los mecanismos y parámetros que pueden influir en la bioaccesibilidad de los metales pesados.

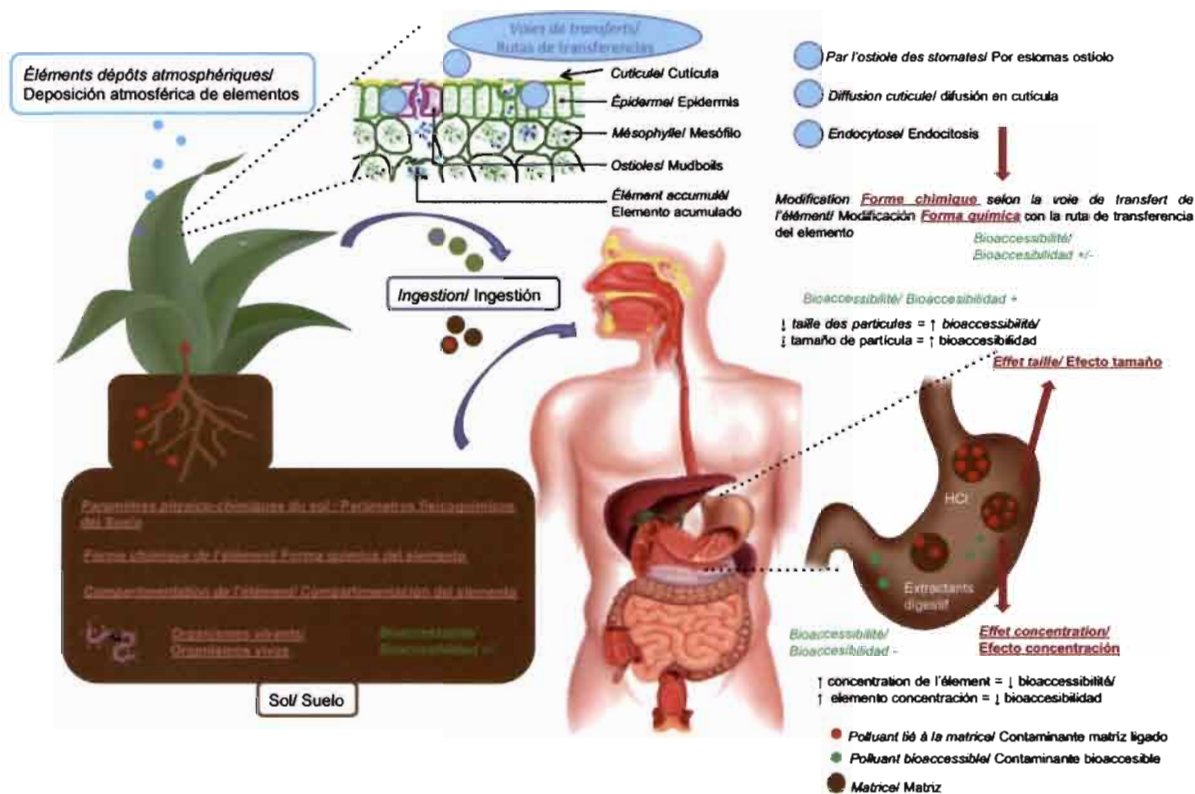


Figura 18. Esquema de los diferentes mecanismos y parámetros que influyen en la bioaccesibilidad de los metales pesados como por ejemplo el plomo (Lévêque, 2014)

Figure 18. Schéma des différents mécanismes et paramètres influençant la bioaccesibilité des métaux lourds avec pour exemple le plomb (Lévêque, 2014).

## Medición de la eco-toxicidad

La explotación petrolera puede contaminar los ecosistemas por sus vertidos en el aire, aguas y suelos. Los organismos que viven dentro de estos ecosistemas pueden ser afectados por esta contaminación. Para estudiar los posibles efectos tóxicos de los contaminantes relacionados con la explotación petrolera, se extrajeron muestras de los distintos organismos vivos y suelos en cuatro regiones del Ecuador en el marco del programa MONOIL. Los suelos fueron muestreados en pequeñas explotaciones (fincas) de cacao en dos regiones de la Amazonía ecuatoriana, una afectada por las actividades extractivas: Shushufindi-Pacayacu y otra en una región control no afectada: Gualaquiza en la provincia de Morona Santiago. En la costa del Pacífico, fueron extraídas muestras de suelo de la ciudad de Esmeraldas, cerca de la mayor refinería de petróleo del país y se contrastaron con una zona de control en Manabí, al sur, en el campo experimental del INIAP en Portoviejo (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ministerio de Agricultura del Ecuador).

El carácter tóxico de estos suelos potencialmente contaminados para el crecimiento de las plantas (la fito-toxicidad) ha sido estudiado con ayuda de tres protocolos diferentes:

1. Medición de la biomasa de dos plantas *Vicia faba* (habas) y *Lepidium sativum* (berro) cultivados en suelos muestreados
2. Medición de la tasa de germinación (desarrollo de las semillas) de *Lepidium sativum* (berro)
3. Medición de la toxicidad de los suelos para el ADN de las plantas (geno-toxicidad)<sup>1</sup> mediante el conteo de los micro-núcleos formados en las raíces secundarias de *Vicia faba*.

Los primeros resultados sobre la biomasa de plantas y la tasa de germinación de berros (ilustraciones 19 y 20) han demostrado un efecto más importante del tipo de suelo que de la potencial contaminación de suelos en las regiones afectadas por la explotación petrolera. Se puede observar que las plantas cultivadas en suelos rojos de la región amazónica tienen una tasa de germinación y una biomasa significativamente más bajas que las cultivadas en suelos de la región del Pacífico.

Los primeros resultados de toxicidad de los suelos para las plantas (habas *Vicia faba*) muestran que estos suelos no tienen impacto en el ADN. Si embargo, sí se han observado impactos de los suelos de la región de control de Manabí, suelos no contaminados por las actividades petroleras (se observa un aumento significativo del número de micronúcleos en las raíces secundarias de *Vicia Faba*) y comparados con los suelos no contaminados y conocidos como no-genotóxicos de la misma región. Este resultado permite pensar que las prácticas agrícolas (uso intensivo de plaguicidas y herbicidas) tienen más impacto al ADN que los contaminantes vinculados al petróleo.

1 Genotoxicidad. Capacidad para causar daño al material genético; el daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.

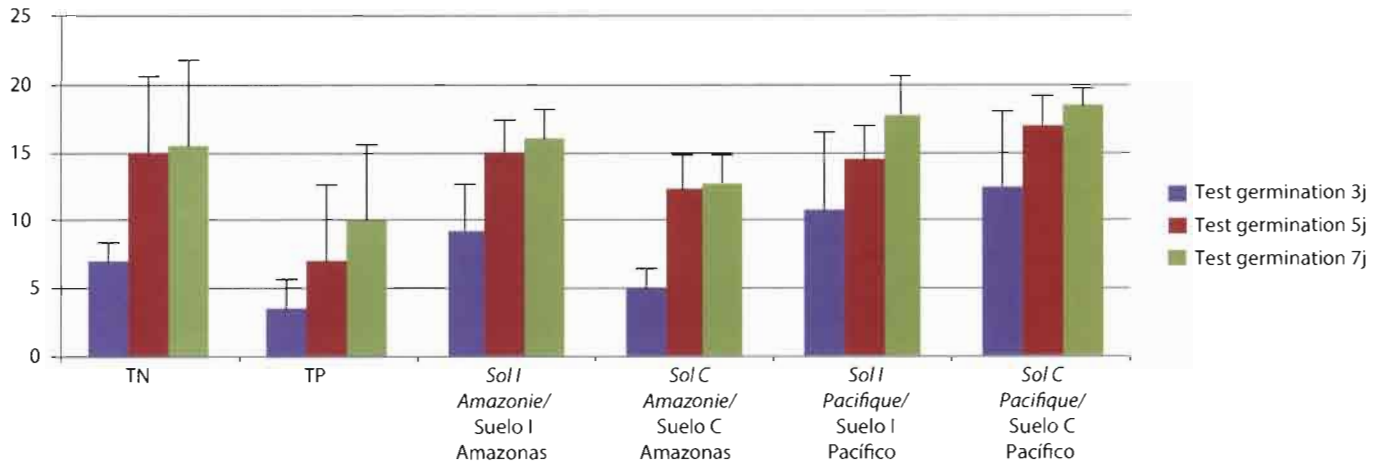


Figura 19. Tasa de germinación en % a 3, 5 y 7 días de *Lepidium sativum* cultivada en diversos suelos ecuatorianos (TN: Testigo Negativo; TP: Testigo Positivo; I: Impactado; C: Control).

Figure 19. Taux de germination en % à 3, 5 et 7 jours de *Lepidium sativum* cultivé sur différents sols Équatoriens (TN: Témoin négatif; TP: Témoin positif; I: Impacté; C: Contrôle).

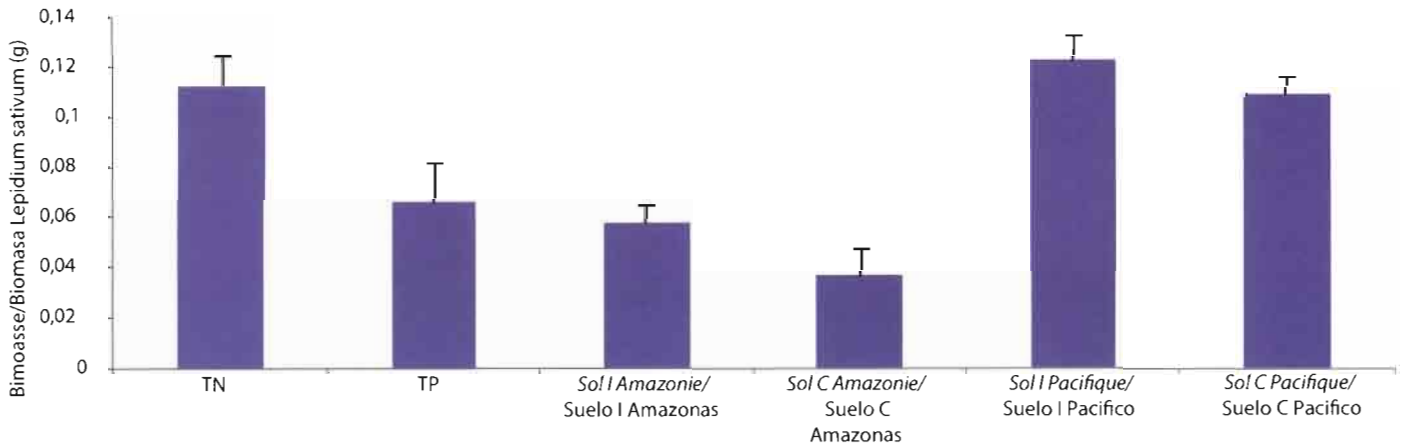


Figura 20. Biomasa (en gramos) a los 15 días de *Lepidium sativum* (berros) cultivado en diversos suelos del Ecuador (TN: Testigo negativo; TP: Testigo positivo; I: Impactado; C: Control)

Figure 20. Biomasse (en grammes) à 15 jours de *Lepidium sativum* (cresson) cultivé sur différents sols Équatoriens (TN: Témoin négatif; TP: Témoin positif; I: Impacté; C: Contrôle).

## Medición de la cito-toxicidad

Los primeros resultados de MONOIL y en particular los referentes a las medidas de los impactos a nivel celular como a nivel de un organismo (planta o animal) o a escala más amplia, plantean la siguiente pregunta: ¿cuáles son los efectos de las mezclas de contaminantes, metálicos y HAP sobre la salud de los ecosistemas como de las poblaciones humanas? La falta de estudios toxicológicos y ambientales sobre los efectos combinados de estas mezclas no permite responder a esta interrogación, aunque los resultados recientes han demostrado efectos toxicológicos graves a nivel celular (alteraciones al ADN, riesgo de desarrollo de células cancerosas, etc.) relacionados con las exposiciones crónicas a mezclas de moléculas orgánicas (plaguicidas, PCB, etc.) y/o metálicas.

Hay dos dimensiones esenciales a considerar para la aplicación de un programa de bio-monitoreo: los modelos vivos a analizar (o especies centinelas, sedentarias, por lo tanto, marcadores de un sitio específico, como algunas especies de peces o camarones (ver p. 115) y los “bio-sensores”, instrumentos de medición que permiten asegurar la medición biológica del impacto de contaminantes en un organismo vivo.

Sobre los bio-sensores, nuestra estrategia consistió en evaluar el impacto de la actividad petrolera con una biotecnología directamente en el campo. Para ello, hemos elegido utilizar como bio-sensor las células humanas y las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) sensibles a los contaminantes convencionales que se asocian a los vertidos petroleros como los hidrocarburos, o los metales pesados como cadmio o mercurio. La señal de

toxicidad se mide mediante la tecnología LUCS (Light-Up Cell System; Fernández Cruz *et al.*, 2002), una tecnología que mide el impacto de un contaminante en las células a partir de la medición de su fluorescencia. A diferencia de los estudios sobre los ecosistemas, la aplicación del ensayo LUCS es muy simple y fácilmente realizable en el campo. Los modelos celulares están marcados con un compuesto que se une al ADN y cuya fluorescencia varía según la respuesta del modelo celular tras la puesta en contacto con la muestra a analizar (en nuestro caso la carne de la especie centinela elegida) y por lo tanto, los contaminantes. En ausencia de contaminación, el modelo celular no está perturbado —se dice que está en homeostasis— y la fluorescencia sigue siendo baja. En presencia de un contaminante, la homeostasis celular se pierde y la fluorescencia está incrementada.

El bio-monitoreo aporta ante todo una fotografía instantánea del impacto de la contaminación en ambientes determinados. Idealmente, el bio-monitoreo debe incluir la medición de diferentes estados patológicos de las especies centinelas ya sea a nivel celular (estrés oxidante, alteración del ADN, presencia de micronúcleos, actividad citocromo P450, presencia de metabolitos biliares de los HAP, actividad de las metalotioneinas) o de todo el organismo, como en los peces por ejemplo (búsqueda de neoplasmas). Podría establecerse un Observatorio de Vigilancia que permita no sólo una cartografía de la contaminación sino también monitorear su evolución en el tiempo. El Observatorio se convierte, por lo tanto, en un instrumento de apoyo a la decisión para la gestión de la actividad económica y de la acción ambiental.

## Comment mesure-t-on l'impact et la toxicité des émissions liées aux activités pétrolières sur les animaux, les plantes et les sols?

---

*Thibaut Lévêque  
Laurence Maurice  
Eva Schreck  
Fiorella Barraza  
Christophe Furger  
Hélène Budzinski  
Gaëlle Uzu*

### **La biodisponibilité et la bioaccessibilité**

La population humaine peut assimiler les polluants environnementaux par 3 voies majeures d'exposition: l'inhalation, l'absorption cutanée et l'ingestion. Cependant, l'assimilation via l'alimentation représente la principale source d'exposition aux contaminants environnementaux. En effet, plus de 90% des polluants organiques et inorganiques sont absorbés via la nourriture (Fries, 1995) et pourraient être la cause de 30% des cancers associés à une exposition chronique (Mansour *et al.*, 2009). Le sol est également une source non négligeable de polluants. Les jeunes enfants (de 0 à 6 ans) par comportement de portage des mains à la bouche peuvent as-

similer 100 à 150 mg de sol/jour (hors comportements de géophagie). Les enfants ruraux vivant sur de petites exploitations contaminées par l'exploitation pétrolière ou certaines pratiques agricoles sont donc aussi exposés aux contaminants contenus dans les sols.

L'exposition de la population humaine aux métaux lourds par voie digestive dépend de la biodisponibilité gastro-intestinale. La biodisponibilité gastro-intestinale est la fraction d'un composé ingéré (un polluant ou un nutriment par exemple) qui est absorbée par la paroi intestinale et qui atteint la circulation sanguine. Ce polluant est donc susceptible de provoquer une réponse biologique (un effet délétère ou positif). La biodisponibilité

gastro-intestinale est fonction des interactions physiques, chimiques et biologiques qui déterminent l'absorption des contaminants contenus dans un aliment par exemple, par exemple, dans la circulation sanguine.

Afin d'estimer plus précisément le niveau d'exposition des populations, il est nécessaire de prendre en considération la notion de biodisponibilité, ce qui n'est actuellement pas réalisé lors des évaluations quantitatives de risques sanitaires. Pour évaluer la biodisponibilité sans passer par l'expérimentation animale, on mesure la bioaccessibilité gastro-intestinale. La bioaccessibilité gastro-intestinale est la fraction d'un composé ingéré qui est extraite de sa matrice (aliments, sols, etc.) par les fluides digestifs au niveau du système salivaire et gastro intestinal et qui se retrouve dans la lumière digestive, disponible à l'absorption. Afin de mesurer la bioaccessibilité, on procède à la solubilisation des contaminants telle qu'elle serait réalisée dans le tractus gastro-intestinal. Le lien entre bioaccessibilité et biodisponibilité est illustré dans la figure 17.

La bioaccessibilité gastro-intestinale des métaux lourds est mesurée à l'aide du test de bioaccessibilité BARGE (BioAccessibility Research Group Europ). Ce test consiste en une série d'extractions successives des polluants contenus dans une matrice (plantes, aliments ou sols) à l'aide de solutions digestives synthétiques: solutions salivaire, gastrique, duodénale et biliaire. La bioaccessibilité gastro-intestinale humaine d'un contaminant est régie par de nombreux paramètres, tels que la physico-chimie des éléments étudiés, la taille des particules et la spéciation (forme chimique du contaminant),

la concentration totale, la nature de la matrice végétale, l'impact biotique, etc. La figure 18 résume les mécanismes et paramètres pouvant influencer la bioaccessibilité des éléments métalliques.

### Mesure de l'écotoxicité

L'exploitation pétrolière est susceptible de contaminer les écosystèmes de par ses rejets dans l'air, les eaux et les sols. Les organismes vivant au sein de ces écosystèmes peuvent être impactés par cette pollution. Afin d'étudier les potentiels effets toxiques des contaminants liés à l'exploitation pétrolière, des prélèvements de différents organismes vivants et de sols ont été réalisés dans 4 régions de l'Equateur dans le cadre du programme MONOIL. Des sols ont été échantillonnés dans des petites exploitations (*fincas*) de cacao dans deux régions d'Amazonie Équatorienne, une impactée par les activités extractives: Shushufindi-Pacayacu et dans une région contrôle non impactée: Santiago Morona. Sur la côte Pacifique, des sols ont été prélevés dans la ville d'Esmeraldas à proximité de la plus grande raffinerie de pétrole du pays et comparés à une zone contrôle à Manabi, au Sud, dans un champ expérimental de l'INIAP à Portoviejo (centre de recherche agricole du Ministère de l'Agriculture équatorien).

Le caractère toxique de ces sols potentiellement contaminés pour la croissance des plantes (la phytotoxicité) a été testé à l'aide de 3 protocoles différents:

- Mesure de la biomasse de 2 plantes *Vicia faba* (fèves) et *Lepidium sativum* (cresson alénois) cultivées sur les sols échantillonnés



- Mesure du taux de germination (développement des graines) de *Lepidium sativum*
- Mesure de la toxicité des sols pour l'ADN des plantes (génotoxicité) par comptage des micro-noyaux formés dans les racines secondaires de *Vicia faba*.

Les premiers résultats portant sur la biomasse des plantes et le taux de germination du cresson (figures 19 et 20) ont montré un effet plus important du type de sol que de la potentielle contamination des sols dans les régions impactées par l'exploitation pétrolière. En effet, il peut être observé que les plantes cultivées sur les sols altérés de la région amazonienne ont un taux de germination et une biomasse significativement plus faibles que celles cultivées sur les sols de la région Pacifique.

Les premiers résultats portant sur la génotoxicité<sup>1</sup> des sols sur *Vicia faba* (fèves) n'ont pas mis en lumière un effet génotoxique de ces derniers, excepté pour le sol de la région contrôle de Manabi où a été mesurée une augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba* comparé au témoin négatif (sol non contaminé et connu comme étant non génotoxique). Ce résultat pourrait montrer que les contaminants issus de l'exploitation pétrolière ont moins d'effets génotoxiques sur les végétaux que les pratiques agricoles telles que l'usage intensif de pesticides, herbicides etc.

## Mesure de la cytotoxicité

Les premiers résultats de MONOIL et, en particulier, ceux concernant les mesures des impacts au niveau cellulaire comme au niveau d'un organisme (plante ou animal) ou à l'échelle plus large d'une population, soulèvent la question suivante: quels sont les effets des mélanges de polluants, métalliques et HAP, sur la santé des écosystèmes comme sur celle des populations humaines ? Le manque d'études toxicologiques et écologiques sur les effets combinés de ces mélanges ne permet pas de répondre à cette interrogation même si des résultats récents ont mis en évidence des effets toxicologiques graves au niveau cellulaire (adduits d'ADN, risque de développement de cellules cancéreuses, etc.) liés à des expositions chroniques à des mélanges de molécules organiques (pesticides, PCB, etc.) et/ou métalliques.

Il y a deux dimensions essentielles à considérer pour la mise en œuvre d'un programme de bio-monitoring: les modèles vivants à analyser (ou espèces sentinelles, sédentaires, donc marqueur d'un site précis, comme certaines espèces de poissons ou de crevettes, cf. 6ème article du chapitre 2) et les «biocapteurs», des instruments de mesure qui permettent d'assurer la mesure biologique de l'impact de contaminants dans un organisme vivant.

Concernant les biocapteurs, notre stratégie a consisté à évaluer l'impact de l'activité pétrolière par

1 Génotoxicité: capacité à altérer le matériel génétique (ADN); le dommage peut être mutagène ou carcinogène

une biotechnologie directement opérationnelle sur site. Nous avons choisi pour cela d'utiliser comme bio-capteur des cellules humaines et des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sensibles aux polluants classiques associés aux rejets pétroliers comme les HAP, ou encore les métaux lourds comme le cadmium ou le mercure. Le signal de toxicité est mesuré grâce à la technologie LUCS (Light-Up Cell System; Fernandez Cruz *et al.*, 2002; Derick *et al.*, 2017), une technologie qui met en évidence l'impact d'un contaminant sur des cellules à partir de la mesure de leur fluorescence. À l'inverse des études sur les écosystèmes, la mise en œuvre du test LUCS est très simple et facilement réalisable sur site. Les modèles cellulaires sont marqués avec un composé qui se lie à l'ADN et dont la fluorescence varie selon la réponse du modèle cellulaire après mise en contact avec l'échantillon à analyser (dans notre cas la chair de l'espèce sentinelle choisie) et donc des polluants. En l'absence de pollution, le modèle cellulaire n'est pas perturbé —on dit qu'il est en homéostasie— et

la fluorescence demeure faible. En présence d'un polluant, l'homéostasie cellulaire est perdue et la fluorescence est augmentée.

Le bio-monitoring apporte avant tout un instantané, une photographie de l'impact de la pollution dans des environnements donnés. Idéalement, le bio-monitoring doit inclure la mesure de différents états pathologiques des espèces sentinelles que ce soit au niveau cellulaire (stress oxydatif, altération de l'ADN, présence de micronoyaux, activité cytochrome P450, présence de métabolites biliaires des HAP, activité des métallothionéines) ou de l'organisme entier, poissons par exemple (recherche de néoplasmes). Il pourrait être mis en place dans le cadre d'un Observatoire de Surveillance permettant non seulement une cartographie de la pollution mais permettant également de suivre son évolution dans le temps. L'Observatoire deviendrait dès lors un outil d'aide à la décision pour la gestion de l'activité économique et de l'action environnementale.



Lévêque T., Maurice Laurence, Schreck E., Barraza F., Furger C., Budzinski H., Uzu Gaëlle. (2018).

Como medir al impacto y a la toxicidad de las emisiones relacionadas con las actividades petroleras en los animales, plantas y suelos ? = Comment mesure-t-on l'impact et la toxicité des émissions liées aux activités pétrolières sur les animaux, les plantes et les sols ?

In : Becerra S. (coord.), Maurice Laurence (coord.), Desprats-Bologna S. (coord.) Nuestro vivir en la Amazonia ecuatoriana : entre la finca y el petroleo = Vivre en Amazonie équatorienne : entre pétrole et terres agricoles.

Marseille (FRA) ; Quito : IRD ; Abya-Yala, 139-143.

ISBN 978-2-7099-26-28-7