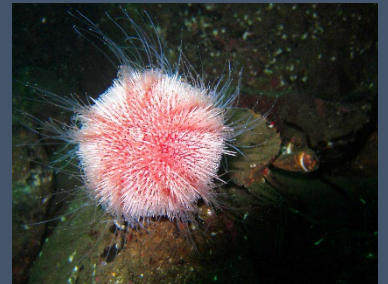
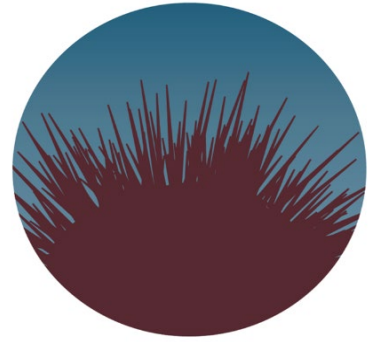
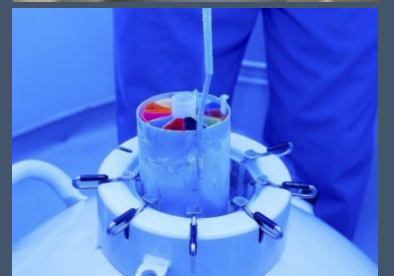
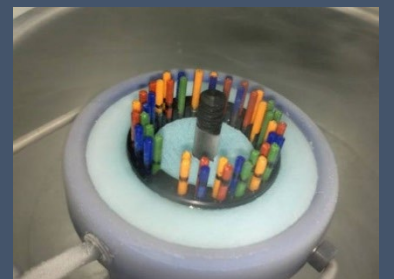


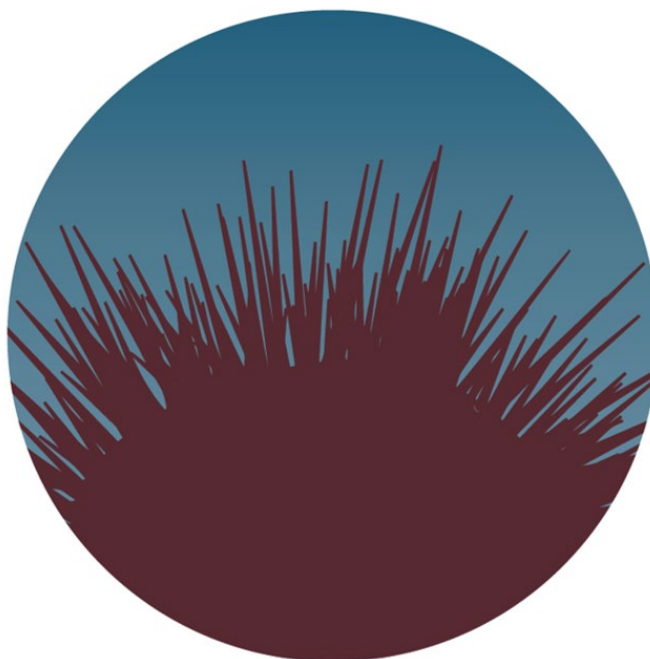
Informe técnico sobre potencial
de cultivo en hatchery de
especies de erizo de mar

Ocimer



**Sea Urchin
Research
Project**





Acrónimo: OCIMER

Título: Cultivo integral del erizo de mar *Paracentrotus lividus*

Inicio del trabajo: Diciembre 2019.

Duración: 24 meses

Fuente Verificación	FV 6.3
Tipo de diseminación	Informe técnico
Nivel de Diseminación	Público
Idioma	Español
Titulo	Informe técnico sobre potencial de cultivo en hatchery de especies de erizo de mar
Fecha publicación	Noviembre 2021
Acción	<i>A6 Creación de un biobanco de diversas especies de erizo de mar como herramienta para la conservación de la biodiversidad de las especies autóctonas de erizo de mar, en colaboración con el Parque Nacional de las Islas Atlánticas.</i>
Entidad Beneficiaria	Universidade de Vigo
Participantes	Estefanía Paredes, Universidade de Vigo Sara Campos, Universidade de Vigo Damián Costas, Universidade de Vigo

Resumen

De entre las especies presentes en el litoral gallego, solamente 7 de ellas tienen una abundancia relevante que las podría colocar como objetivos de extracción y consumo: *Paracentrotus lividus* (actualmente en explotación), *Psammechinus miliaris*, *Arbacia lixula*, *Sphaerechinus granularis*, *Echinus esculentus*, *Echinocardium cordatum*, *Spatangus purpureus*. De entre ellas *Paracentrotus lividus* es el único erizo con una explotación regulada en Galicia. El presente trabajo describe de modo somero la facilidad para la obtención de puestas y un único cultivo larvario con resultados menores en terminos de supervivencia si se comparan con *P. lividus*, pero que al menos permiten asegurar la obtención de larvas competentes para fijación y la descripción del cultivo larvario.

Disclaimer

Los autores no tienen ningún interés activo o pasivo en la utilización comercial de ninguna de las tecnologías mencionadas en este texto. En ningún caso tienen intereses económicos en ninguna de las asociaciones o empresas citadas. Este texto es puramente informativo, publicado en abierto y sin ánimo de lucro.

Índice

Especies presentes en el litoral gallego.....	4
Especies en aguas Gallegas	4
Estudio de Cultivo de <i>Sphaerechinus granularis</i>	6
Descripción de la especie.....	6
Reproducción	7
Cultivo larvario.....	11
Potencial de cultivo en hatchery de <i>S. granularis</i>	16
Criopreservación	18
Conclusiones	18
Bibliografía	19

Especies presentes en el litoral gallego.

Especies en aguas Gallegas

De entre las especies listadas en la tabla 1 como presentes en el litoral gallego, solamente 7 de ellas tienen una abundancia relevante que las podría colocar como objetivos de extracción y consumo: *Paracentrotus lividus* (actualmente en explotación), *Psammechinus miliaris*, *Arbacia lixula*, *Sphaerechinus granularis*, *Echinus esculentus*, *Echinocardium cordatum*, *Spatangus purpureus*. De entre ellas *Paracentrotus lividus* es el único erizo con una explotación regulada en Galicia aunque especies como *S. granularis* y *E. esculentus* se consumen en otras áreas como Italia, Francia (Provenza) o Cataluña de forma más o menos abundante.

En este caso hemos enfocado nuestro trabajo en el estudio de *E. esculentus* y *S. granularis* ambas especies abundantes en la costa gallega. Hay un interés creciente en el cultivo y extracción de *S. granularis* (Lourenço et al. 2022) mientras que un erizo irregular como *E. esculentus* no ha despertado interés.

Nuestra evaluación de las características de interés en acuicultura erizos se resume en el esquema inferior, donde calificamos en verde valores positivos, en amarillo intermedios y en rojo valores negativos. En gris están valores que desconocemos.

Características	<i>P. lividus</i>	<i>S. granularis</i>	<i>E. esculentus</i>
Abundancia	Green	Green	Green
Facilidad extracción	Green	Yellow	Yellow
Gran cantidad de gónada	Green	Green	Red
Fragilidad en recolección o transporte	Green	Green	Red
Buen sabor	Green	Green	Grey
Conocimientos sobre su biología para acuicultura	Green	Yellow	Red

Tabla 1.- Listado de erizos catalogados en aguas de Galicia (Besteiro & Urgorri 1988)

Clase	Orden	Familia	Especie	Regular/Irregular	WORMS ID
Echinoidea	Cidaroida	Cidaridae	<i>Cidaris cidaris</i>	Regular	124257
			<i>Stereocidaris ingolfiana</i>		124267
	Echinomurioida	Echinothurida	<i>Araeosoma fenestratum</i>		149880
			<i>Phormosoma placenta</i>		124343
	Arbacioida	Arbaciidae	<i>Arbacia lixula</i>		124249
	Temnopleurida	Toxopneustidae	<i>Sphaerechinus granularis</i>		124427
	Echinoida	Echinidae	<i>Echinus acutus</i>		124277
			<i>Echinus alexandri</i>		124280
			<i>Echinus esculentus</i>		124287
			<i>Paracentrotus lividus</i>		124316
			<i>Psammechinus miliaris</i>		124319
	Clypeasteroidea	Fibulariidae	<i>Echinocyamus pusillus</i>		124373
	Cassiduloidea	Cassiduloidae	<i>Neolampas rostellata</i>		144254
	Spatangoidea	Brissidae	<i>Brissopsis lyrifera</i>		124373
		Spatangidae	<i>Spatangus purpureus</i>		124418
Loveniidae		<i>Echinocardium cordatum</i>	124392		
				Irregular	

Si nos centramos en *S. granularis*, cumple con muchas de las cualidades que tiene *P. lividus*, sobre todo su potencial de generar gonadas de gran tamaño es especialmente atractiva, sin embargo las poblaciones de esta especie están a mayor profundidad con lo cual su extracción sería un poco más complicada que en el caso de *P. lividus*. Se ha identificado como especie emergente durante años (Guillou and Michel 1993, Soualili et al. 1999, Martínez-Pita et al. 2010 and Lourenço et al. 2022) donde se ha visto como una posible alternativa al consumo de *P. lividus* sin embargo se desconocen muchos parámetros sobre su biología y cultivo lo cual dificulta enormemente la evaluación de la posibilidad de explotarlos de forma controlada y no permite un cultivo de acuicultura. No existe, hasta donde nosotros conocemos, ningún estudio exhaustivo de la localización y abundancia de sus poblaciones en el litoral Gallego. Esta especie ya se consume de forma puntual con lo cual se da por sentado que sus parámetros de sabor son agradables.

El otro caso de estudio es el erizo irregular *E. esculentus*, en nuestro análisis hemos marcado en naranja la facilidad de extracción ya que estos erizos se encuentran enterrados en la arena fina/fangosa a una profundidad de hasta 15 cm. Su cantidad de gónada, como se puede ver en la imagen 5, es mucho menor lo cual le resta valor comercial. Su caparazón es mucho más frágil que en el caso de erizos regulares y esto dificulta en gran medida su recolección y transporte. En cuanto al sabor de sus gónadas no hemos encontrado ningún registro de consumo de especies de erizo irregular ni siquiera a nivel anecdótico en poblaciones determinadas con lo cual desconocemos su potencial en este término. Finalmente en relación con el conocimiento de su biología y cultivo conocemos aún menos que en el caso de *S. granularis*. Nuestra evaluación por tarta lo descarta como especie de interés en consumo por ahora.

Estudio de Cultivo de *Sphaerechinus granularis*

Descripción de la especie

Sphaerechinus granularis (Echinodermata, Echinoidea, Toxopneustidae) es una especie conocida como erizo de mar violáceo, de gran tamaño que puede crecer hasta alcanzar los 15 cm de diámetro (Tabla 2). Puede presentar dos coloraciones: espinas violáceas o blancas, aunque la epidermis presenta en ambas el mismo color púrpura. Las espinas son romas y de corta longitud colocadas en filas ordenadas (Figura 1). La especie tiene una amplia distribución geográfica que se extiende por el Mediterráneo occidental y Atlántico oriental, desde el Golfo de Guinea hasta el Canal de la Mancha, siendo particularmente común en Bretaña. Se puede encontrar en diferentes tipos de hábitat, pero en general, prefiere sitios protegidos sobre rocas. En el Mediterráneo ocupa hábitats coralígenos, praderas de fanerógamas marinas y fondos arenosos y rocosos. *S. granularis* suele distribuirse desde

aguas poco profundas (30m) hasta los 130m de profundidad. Es una especie herbívora y consume generalmente algas coralinas incrustantes, hojas muertas y rizomas de *Posidonia oceánica*, así como láminas de *Laminaria*. *S. granularis* tiene un gran interés comercial debido a que sus gónadas se consideran un manjar en muchos países (Figura 4-5), por lo que se consume puntualmente desde la década de los 80 (Sellem et al. 2018; Soualili et al. 1999; Guillou and Michel 1993).



Figura 1. Ejemplares de *S. granularis* con diferentes coloraciones.

Reproducción

Sphaerechinus granularis presenta un ciclo reproductivo anual con un mayor desove a principios de la primavera hasta finales de verano. Los huevos y espermatozoides se liberan al medio, produciéndose la fertilización en la columna de agua. Cuando el espermatozoide entra en contacto con el huevo la fertilización se produce de forma instantánea creándose una barrera, la membrana de fertilización (Figura 2), que impide la entrada de más espermatozoides y se evita así la poliespermia. Al cabo de 8h post-fertilización ya se encuentran blástulas. Tras 48h aparecen gástrulas (Figura 7) que, después de 5 días darán lugar a larvas pluteus de 4 brazos que, a los 7 días se convierten en larvas pluteus de 6 brazos. Seguidamente, tras 12 días aparecen ya larvas de 8 brazos que darán lugar a larvas pre-metamórficas no competentes después de 19 días. Finalmente, a los 23 días, se observan larvas pre-metamórficas competentes que ya muestran el rudimento. Estas últimas ya están listas para asentarse y, una vez conseguido el asentamiento, experimentan una metamorfosis entrando en el estado juvenil.

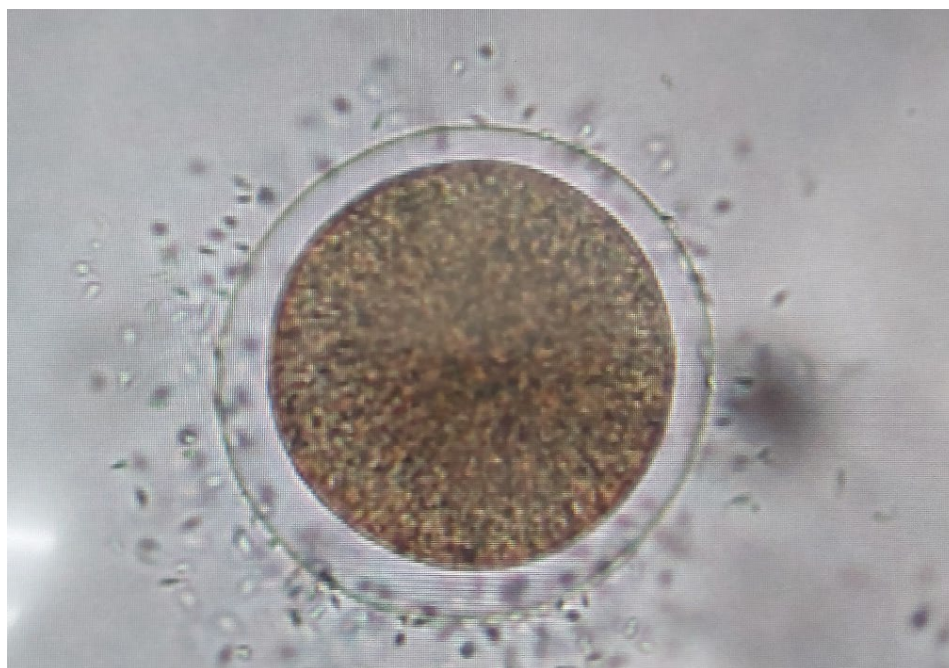


Figura 2. Huevo recién fertilizado.

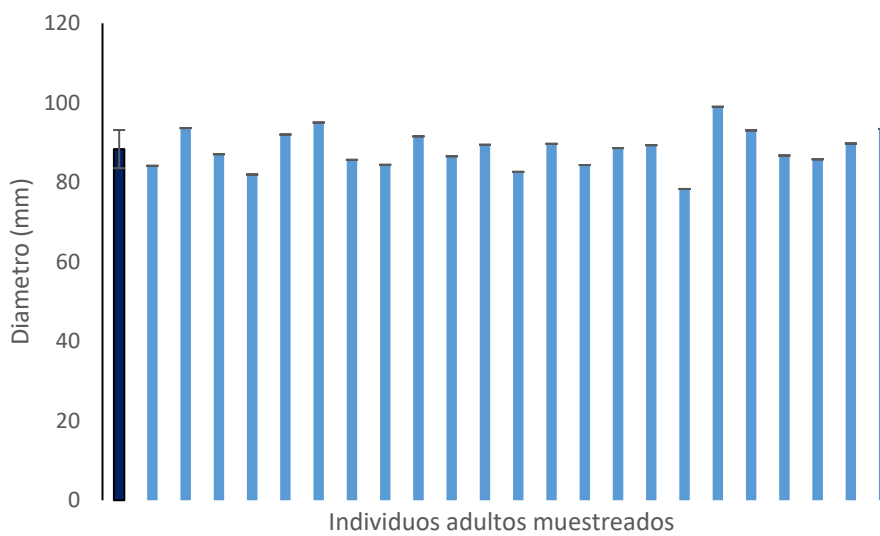


Figura 3. Tamaño medio del adulto utilizado o en los experimentos de reproducción (barra oscura).

83 ± 4.8 mm en diámetro



Imagen 4. Imagen de gónadas de *S. granularis*. En la imagen de la izquierda se pueden ver esperma saliendo de las gónadas del macho tras la disección. A la derecha imagen de las gónadas de una hembra y se puede ver el líquido naranja que contiene los ovocitos.



Figura 5. De izquierda a derecha *E. esculentus*, *S. granularis*, *P. lividus* y *E. cordatum* hembra (fila superior) y macho (inferior) nos permite una comparativa de los tamaños y contenido gonadal de los adultos reproductivos.

Cultivo larvario

Para realizar el cultivo larvario de *S. granularis* primeramente se recolectaron huevos y esperma directamente de la gónada mediante la disección de un ejemplar de cada sexo. Posteriormente se comprobó la calidad de los huevos mediante la observación del color (anaranjados) y forma (redondos), y del esperma (porcentaje de movilidad) mediante la observación bajo el microscopio óptico. Una vez hechas estas comprobaciones, se procedió a la fertilización. Para ello se concentraron los huevos con la finalidad de obtener 1 millón de larvas, se le añadió el esperma y se observó que el porcentaje de fertilización fuese superior al 90%. Los huevos fertilizados se repartieron en tres tanques de 450 litros cada uno y se mantuvieron con aireación, pero sin alimentar durante las primeras 48 horas. A día 2 se empezó a proporcionar alimento a las larvas diariamente según lo que se recoge en la tabla 2. Cada dos días se llevó a cabo una bajada de los tanques (Filtro de 63 μm) para realizar conteos, mediciones y fotografiar las larvas. A día 23 se obtuvieron larvas con rudimento y tendrían que ponerse a fijar en cajas de 50L con estructuras separadores. Anteriormente a la fecha de fijación, las cajas se tendrían que preparar añadiendo una diatomea con flujo de agua y luz 24h para crear un biofilm sobre las estructuras. El día de la fijación se añadiría alimento, se apaga la luz, se cierran el flujo de agua y aire, quedando de este modo durante 48h. Tras este período, se vuelve a retomar el flujo de agua continuo.

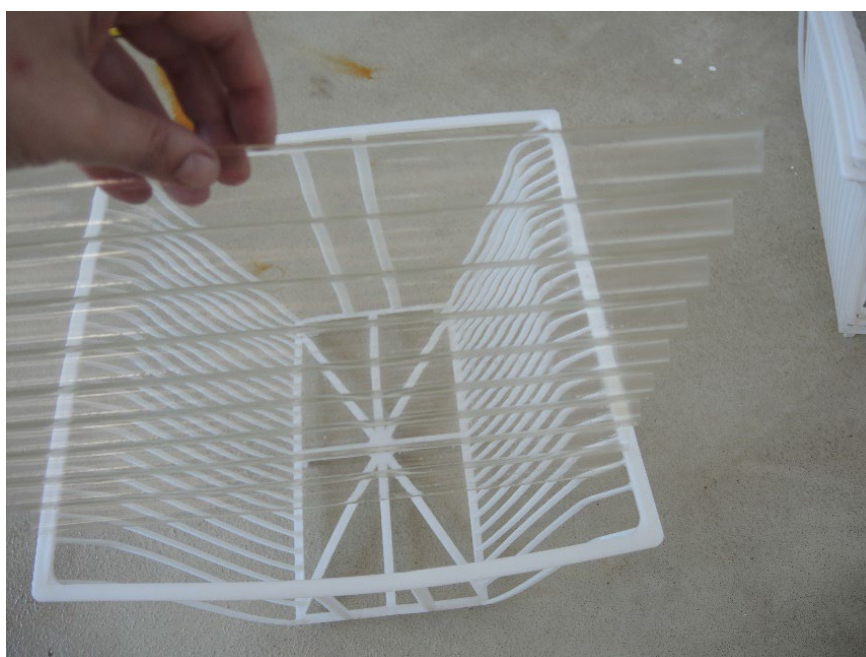


Figura 6. Estructuras separadoras plásticas para fijación de larvas.

Tabla 2. Dieta suministrada a *S. granularis* durante el larvario.

Días	Especie	células/microlitro
2 - 3	<i>Tisochrysis lutea</i>	10
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	
4 - 7	<i>Tisochrysis lutea</i>	15
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	
8 - 11	<i>Tisochrysis lutea</i>	20
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	
12 - 14	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	
15	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	37,5
	<i>Rhodomonas lens</i>	25
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	12,5
16 - 21	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	
23	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	50
	<i>Rhodomonas lens</i>	25
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	0
26	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	
28	<i>Tisochrysis lutea</i>	0
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	25
	<i>Rhodomonas lens</i>	50
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	25
30	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	50
	<i>Rhodomonas lens</i>	25
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	0
33 - 55	<i>Tisochrysis lutea</i>	25
	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	
	<i>Rhodomonas lens</i>	
	<i>Chaetoceros neogracile</i>	

Esta era nuestra primera experiencia en el cultivo de esta especie y debido a esto nos paramos a observar su desarrollo larvario (Figura 7) para poder después evaluar la salud larvaria a lo largo del cultivo. Los resultados del cultivo larvario de *S. granularis* (Figura 8) muestra una caída gradual del número de larvas con el tiempo bastante pronunciado. A pesar de que esta especie se ha utilizado bastante en Ecotoxicología recientemente (Gravina et al. 2018, Triguoggi et al. 2017) no hay estudios sobre su cultivo larvario con fines de acuicultura. Al final del cultivo larvario (día 23) la supervivencia fue del 8%, las larvas estaban sanas y eran competentes. No se realizaron experimentos de fijación en esta etapa del estudio.

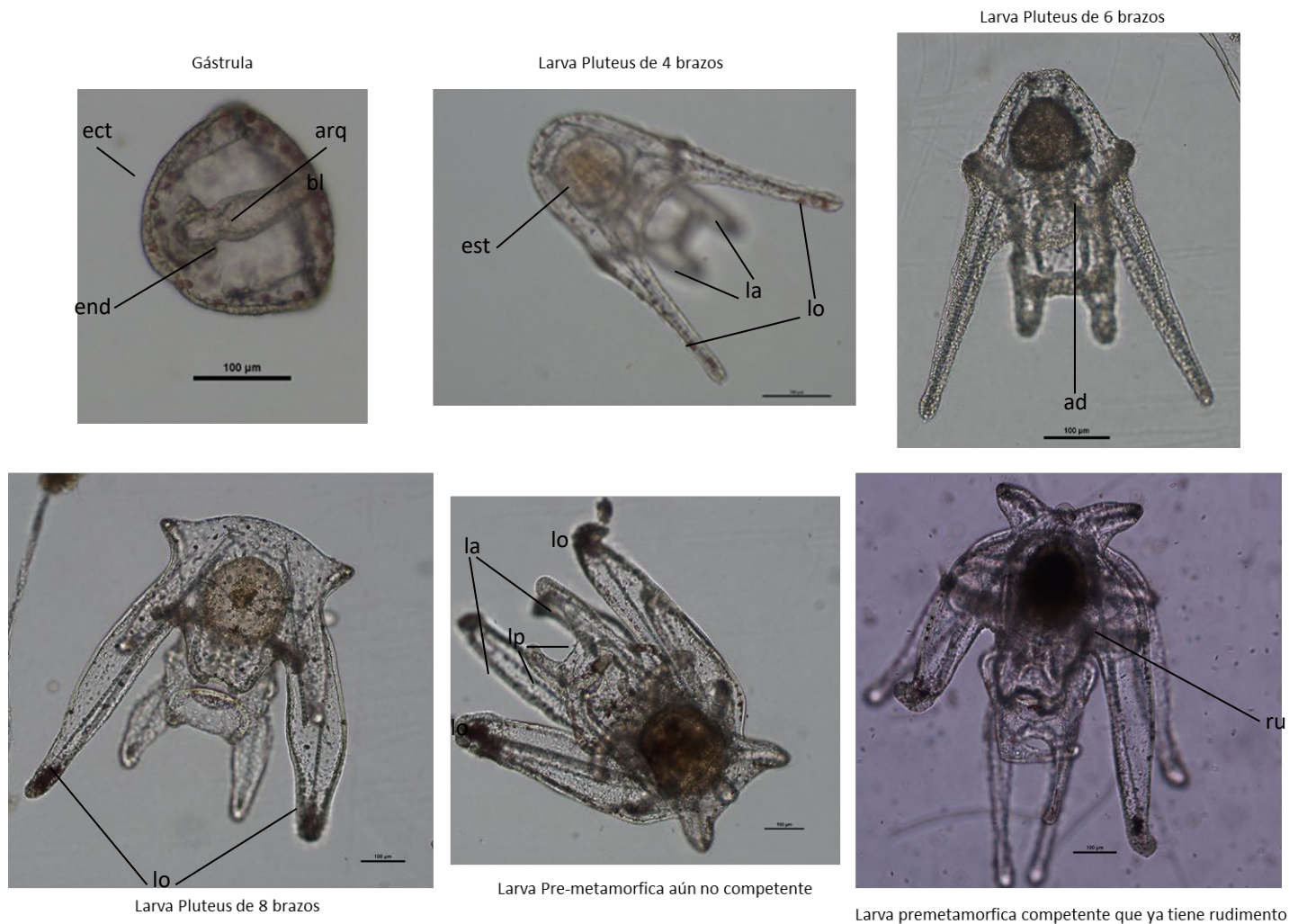


Figura 7.-Desarrollo larvario de *S. ganularis* (temperatura 18°C) en laboratorio. Arq: arquenteron; ect: ectodermo; end: endodermo; bl: blastoporo; est: estómago; lo: línea post-oral; la: línea anterolateral; ad: arco dorsal; lp: línea pre-oral ru: rudimento.

Tabla 3. *No Observed Effect Concentration (NOEC) and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)* en mol/L para dos estados de desarrollo de *S. granularis* (huevo sin fertilizar y blastula de 8 horas (18°C)) para crioprotectores permeantes como Dimetil sulfóxido (DMSO), Etilen glicol (EG), Propilen glicol (PG), Metanol (Meth), Glicerol (Gly) y para crioprotectores no permeantes como Trealosa (TRE), Polivinil pirrolidona (PVP), Sucrosa (SUC), Fructosa (FRU) y Glucosa (GLU).

Tipo celular	NOEC (M)					LOEC (M)				
	DMSO	EG	PG	Meth	Gly	DMSO	EG	PG	Meth	Gly
Huevo	-	-	-	-	-	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Blástula	-	0.05	-	0.5	-	0.05	1	0.05	1	0

Tipo celular	NOEC (M)					LOEC (M)				
	TRE	PVP	SUC	FRU	GLU	TRE	PVP	SUC	FRU	GLU
Huevo	0.30	-	-	-	-	0.40	0.25	0.25	0.25	0.25
Blástula	0.4	-	-	-	-	0.50	0.25	0.25	0.25	0.25

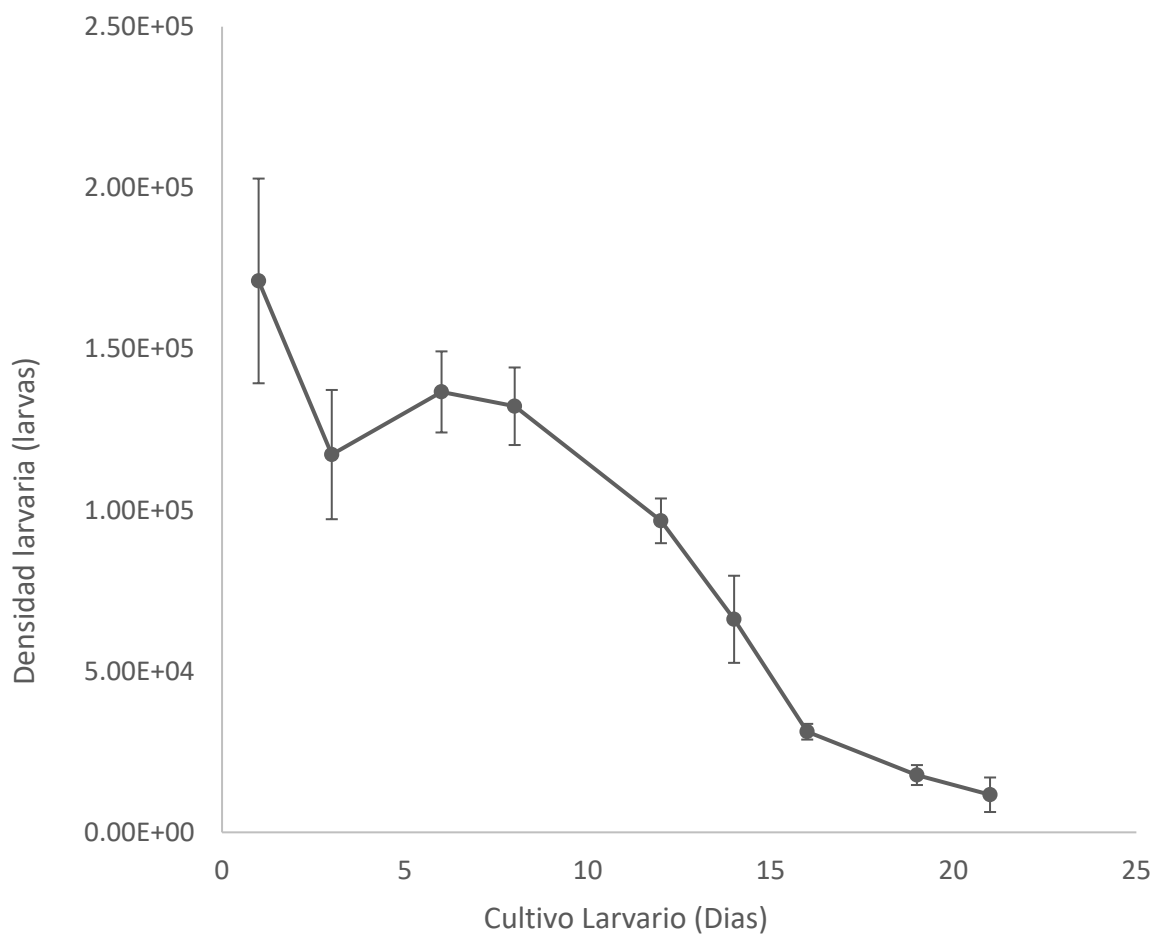


Figura 8. Cultivo larvario de *S. granularis* desde fertilización hasta competencia a los 23 días (18°C) en circuito abierto.

Potencial de cultivo en hatchery de *S. granularis*

El consumo de recursos de origen marino para alimentación humana no ha parado de incrementarse en las últimas décadas, especialmente derivado del aumento de la producción y de especies cultivadas en todo el mundo. La acuicultura crece a un ritmo mayor que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal. Así, la diversificación es una cuestión recurrente entre las personas que nos dedicamos a la acuicultura desde el momento mismo del inicio de la acuicultura moderna. Hablar de diversificación es hacerlo de (1) nuevas especies, (2) desarrollo de sistemas, técnicas y protocolos de cultivo como la recirculación, los cultivos offshore, microdietas, etc. (3) la transformación de

productos como el fileteado, ahumado, marinado, etc. Podríamos decir que las fuerzas que impulsan a diversificar son:

1. La adaptabilidad de una especie a las condiciones ambientales de diferentes lugares.
2. La necesidad de los productores de reducir riesgos asociados a la producción de una sola especie.
3. La demanda del mercado.

Si bien son muchas las especies potenciales, especialmente en piscicultura, el esfuerzo de investigación en nuevas especies no siempre se ve reflejado en la producción de las mismas. Si partimos de cultivos consolidados como el de la Trucha, Mejillón, Dorada, Lubina o Rodaballo, desde hace 30 años se vienen desarrollando por ejemplo estudios de cultivo en especies como el Lenguado, Corvina, etc. Algunas, aunque con producción durante años no han fraguado y su cultivo ha declinado, como es el caso del Besugo; otras si han llegado al mercado recientemente, como el Lenguado o la Corvina; otras han alcanzado un buen desarrollo de las técnicas de cultivo, pero no han llegado al mercado, como puede ser el Pargo o el Dentón; otras tienen enorme potencial con diferente grado de desarrollo de los cultivos como es el caso de la Seriola, el pulpo, la Cherna o el Atún y finalmente otras se han abandonado como el caso del Abadejo o la Merluza. En el caso de los invertebrados en España, especies como la ostra plana o la almeja fina están en franco retroceso, el cultivo de pectínidos ha desaparecido y es el mejillón y la almeja japonesa los que dominan la producción.

En el caso del erizo, *P. lividus* es una especie recolectada del medio natural mediante planes de explotación regulados por las comunidades autónomas, y una incipiente producción orientada a obtener semilla de hasta unos 20 mm para repoblar y recuperar bancos o zonas donde la sobreexplotación o cualquier otro evento haya hecho declinar la producción. La biología de la especie y su cultivo es bien conocida, salvo en aspectos como las patologías o la diversidad genética de poblaciones, y desde el punto de vista zootécnico necesita optimizar procesos de cara a reducir costes y hacer rentable el cultivo y suministro de semilla, así como asegurar la supervivencia y tasa de recaptura de los individuos, así como desarrollo de piensos que vayan optimizando procesos y deduciendo tiempos de cultivo.

En este contexto, la presencia de una especie de biología conocida de interés acuícola creciente, consumida, conocida por el mercado, de alta demanda y precio, sobreexplotada en algunos casos, como es el caso del *P. lividus* sugiere el interés en conocer las características del cultivo de *S. granularis* dadas las características expuestas en la tabla 1. y respondiendo a las fuerzas e interés propio del sector en diversificar continuamente.

El presente trabajo describe de modo somero la facilidad para la obtención de puestas y un único cultivo larvario con resultados menores en terminos de supervivencia si se comparan con *P. lividus*, pero que al menos permiten asegurar la obtención de larvas competentes para fijación y la descripción del cultivo larvario.

Desde el punto de vista biológico son necesario nuevos trabajos pero el resultado mantiene el interés y el potencial de la especie, ya no parece que haya dudas desde el punto de vista de la demanda del consumidor y sus características en cuanto a tamaño de gónada, organolépticas etc.

Criopreservación

En este proyecto hemos desarrollado estudios de criopreservación tanto del esperma como de los embriones de *S. granularis* con bastante éxito en el caso de los embriones. Nuestro trabajo inicial se centró en el estudio de la toxicidad de los crioprotectores que queremos utilizar (Tabla 3) y comparandolos con los de *P. lividus* que ya conociamos (Paredes et al. 2009). Vemos que esta especie es más sensible al dimetil sulfóxico (DMSO) que *P. lividus*. Se estudiaron por tanto otros nuevos crioprotectores y se puede ver que los embriones (estado de blástula) pueden soportar la exposición al Glicerol (Gly) mucho mejor. La criopreservación siguiendo el protocolo para *P. lividus* (Paredes et al. 2015) nos ha proporcionado larvas a partir de embiones criopreservados por primera vez. Aunque este solamente ha sido el primer paso para desarrollar un protocolo fuerte, reproducible y útil para la industria, es un paso muy importante que pone esta especie a la cabeza de aquellas con interés y potencial para la acuicultura.

Conclusiones

De las especies estudiadas, *Sphaerechinus granularis* y *Echinocardium cordatum* solo una de ellas presenta un potencial de cultivo considerable, *S. granularis*. Ya cuenta con cierta historia de consumo a nivel local y tiene un buen tamaño de gónada. Su extracción es razonablemente sencilla y son erizos duros, lo cual facilita su extracción y transporte desde el mar a su planta de procesado o pescadería. Sin embargo en nuestros análisis queda claro que tiene un punto debil, la falta de conocimientos sobre su biología es un parametro determinante que no nos permitiria por el momento extraerlo de forma segura. Sin embargo en este estudio preliminar queda claro que existe la posibilidad de desarrollar un protocolo que optimice los resultados y genere semilla en laboratorio y se ha desarrollado un estudio preliminar de criopreservación con exito lo cual es un valor añadido a favor del futuro cultivo y extracción de esta especie. Desde el punto de vista biológico son necesario nuevos trabajos pero el resultado mantiene el interés y el potencial de la especie, ya que no parece que haya dudas desde el punto de vista de la demanda del consumidor y sus características de gónada.

Bibliografía

1. Besteiro, C., V. Urgorri, (1988). Inventario dos Equinodermos de Galicia. (*Echinodermata*) Cadernos da Área de Ciencias Biolóxicas, (Inventarios) Seminario de Estudos Galegos, Vol. I O Castro-Sada, A Coruña: Ed. do Castro.
2. Gravina, M., Pagano, G., Oral, R., Guida, M., Toscanesi, M., Siciliano, A., Di Nunzio, A., Burić, P., Lyons, D.M., Thomas, P.J., Trifuoggi, M. (2018). Heavy Rare Earth Elements Affect *Sphaerechinus granularis* Sea Urchin Early Life Stages by Multiple Toxicity Endpoints. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* volume 100, 641–646
3. Guillou, M., Michel, C. (1993). Reproduction and growth of *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata: Echinoidea) in southern Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73(1), 179-192. doi: 10.1017/S0025315400032719
4. Lourenço, S., José, R., Neves, P., Góis, A., Cordeiro, N., Andrade, C., Ribeiro, C. (2022). Population Density, Reproduction Cycle and Nutritional Value of *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata: Echinoidea) in an Oceanic Insular Ecosystem. *Front. Mar. Sci.*, 27 January 2022 | <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.699942>
5. Martínez-Pita, I., Sánchez-España, A. I., and García, F. J. (2008). Gonadal growth and reproduction in the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck 1816) (Echinodermata: Echinoidea) in southern Spain. *Sci. Mar.* 72, 603–611. doi: 10.3989/scimar.2008.72n3603
6. E. Paredes, J. Bellas (2009). Cryopreservation of sea urchin embryos (*Paracentrotus lividus*) applied to marine ecotoxicological studies. *Cryobiology* 59, 344-350.
7. E. Paredes, J. Bellas, D. Costas (2015). Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing — Culture from cryopreserved embryos, *Aquaculture* 437, 366-369
8. Sellem, F., Othman, A., Harki, M., Bejaoui, B., & Ourens, R. (2018). First Record of the Sea Urchin *Sphaerechinus Granularis* (Lamarck, 1816) in a Coastal Lagoon (Tunisia-Western Mediterranean). *J Marin Biol Aqua Res*, 1(1), 102.
9. Soualili, D. L., Guillou, M., & Semroud, R. (1999). Age and growth of the echinoid *Sphaerechinus granularis* from the Algerian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(6), 1139-1140.
10. Trifuoggi, M., Donadio, C., Mangoni, O., Ferrara, L., Bolinesi, F., Nastro, R.A., Corrado S., Toscanesi, M., Di Natale, G., Arienzo, M. (2017). Distribution and enrichment of trace metals in surface marine sediments in the Gulf of Pozzuoli and off the coast of the brownfield metallurgical site of Ilva of Bagnoli (Campania, Italy). *Marine Pollution Bulletin* 124, Issue 1, 502-511.