

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"DESCRIPCION DE UN BIOENSAYO ESTATICO  
PARA EVALUAR LA TOXICIDAD RELATIVA  
DEL PETROLEO CRUDO Y DISPERSANTE  
SOBRE PENAEOUS DUORARUM DUORARUM"**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PRESENTA  
JUAN AVILA GONZALEZ  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O**

**MARZO, 1982.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

Pág.

## INTRODUCCION

## OBJETIVOS

I	ANTECEDENTES HISTORICOS	3
II	PRUEBA DE LABORATORIO (BIOENSAYOS)	15
	Definición	
	Tipos de Bioensayos	
	Facilidades y equipo	
	Cámaras de Cultivo y Prueba	
	Limpieza	
III	ORGANISMOS DE PRUEBA	26
	Selección	
	Captura	
	Desove y Eclosión	
	Mantenimiento y Manejo	
IV	AGUA DE DILUCION Y TOXICO DE PRUEBA	33
	Abastecimiento de Agua	
	Petróleo crudo	
	Dispersante	
	Emulsión Petróleo-Dispersante	
	Mezclado y Agitación	
V	PARAMETROS QUE DEBERAN CONTROLARSE	39
	Temperatura	
	Salinidad	

	Oxígeno Disuelto	
	pH, Alcalinidad y Dureza	
VI	ANALISIS QUIMICO DE LA SUBSTANCIA A PRUEBA	46
	Análisis de Hidrocarburos del Petróleo	
	Análisis de Dispersante	
VII	CALCULO DE RESULTADOS	53
	Estimación de CL50 por Interpolación	
	Método Abreviado de Litchfield-Wilcoxon	
	Graficado de las curvas de Toxicidad	
	Toxicidad Relativa	
VIII	PROYECTO DE TRABAJO	70
IX	DISCUSION	78
X	BIBLIOGRAFIA	
	APENDICE	85
	1.- Generalidades del camarón	101
	2.- Comportamiento del Petróleo en el agua	113
	3.- Dispersantes .	120

## INTRODUCCION

Los efectos del petróleo crudo y de agentes químicos neutralizantes o dispersantes del petróleo en el medio marino y organismos, involucran reacciones físicas, químicas y biológicas. El estudio de estos efectos requiere de una variedad de disciplinas, de tal forma que, al integrar los resultados obtenidos, se pueda tener una idea de las alteraciones producidas en la parte biótica y abiótica del sistema. Las investigaciones de campo han venido a ser complementadas con los experimentos de laboratorio o bioensayos, ya que estos son necesarios para conocer el comportamiento y los efectos que producen las sustancias contaminantes.

Los efectos causados por el petróleo crudo y el dispersante sobre los organismos acuáticos son resumidos por Carthy y Arthur (1968) y Smith (1968). Comparativamente pocos autores han estudiado la influencia de mezclas de petróleo y dispersante en el medio marino. Los estudios de Kuhl y Mann (1967), los han llevado a concluir que el petróleo es menos tóxico que la mezcla petróleo-dispersante. Spooner, (1968), señala que es importante trabajar con petróleo y con dispersantes; pero las distintas toxicidades según el tipo de petróleo crudo y sus delicados mecanismos en experimentos biológicos, hacen difícil establecer en forma general las concentraciones que producen un determinado efecto. Anderson et al. (1974), mencionan que los productos del petróleo crudo varían de acuerdo con la concentración de hidrocarburos específicos que se presentan, los cuales a su vez, tienen distintos

grados de solubilidad y de toxicidad. Esto ha ocasionado que en bioensayos con diferentes tipos de petróleo crudo o con diferentes métodos de mezclado se obtengan resultados en diferentes órdenes de magnitud con respecto a la Concentración Letal, -- (CL).

### OBJETIVOS

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de este estudio es el establecer un proyecto de trabajo, el cual permita evaluar la toxicidad relativa del petróleo crudo y el dispersante, solos y combinados, sobre las distintas etapas de el desarrollo del camarón rosado, Penaeus duorarum duorarum Burkenroad.

## ANTECEDENTES

Antes de 1940, no existía uniformidad en el desarrollo y forma de reportar los resultados de los bioensayos utilizados en la evaluación de contaminantes presentes en los sistemas acuáticos. En los años subsecuentes, la necesidad de una técnica uniforme se hizo obvia. La Atlantic Refining Company, da las primeras reglas en sus reportes internos, que fueron de gran valor para la metodología actual (Hart, Doudoroff y Greenbank, 1945). Más tarde fue actualizada, modificada y aceptada por la industria, centros de investigación y el gobierno de E.U., (Doudoroff y Katz, 1951).

Guilles La Roche et al. (1970), publicaron métodos que vinieron a modificar el desarrollo de la metodología existente. Así mismo, presentaron los requerimientos básicos para el desarrollo de bioensayos específicos, utilizados en la evaluación de la toxicidad relativa del petróleo crudo, el dispersante y las mezclas de petróleo-dispersante sobre:

Fundulus heteroclitus; Nereis virens; y Paleomonetes vulgaris. Observaron que, debido al surgimiento de problemas especiales en bioensayos con petróleo crudo y mezclas de petróleo dispersante, era necesario suplementar los procedimientos descritos en American Public Health Association (APHA, 1965), y probar métodos adecuados con organismos diferentes a peces para establecer las condiciones de prueba y que los resultados puedan ser comparados. Por ello se considera importante establecer: una lista de especies que puedan ser utiliza

das en la prueba; una fórmula uniforme de agua de mar artificial; que la temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto sean óptimos y constantes; un procedimiento uniforme para agitar y mezclar el petróleo y las combinaciones de petróleo-dispersante.

El American Petroleum Institute (API, - 1971), propone no utilizar la muerte de los organismos de prueba como una forma de evaluar los efectos tóxicos de los contaminantes, debido a que este parámetro no puede ser siempre evaluado (como en el caso de algas unicelulares y zooplancton) ya que pueden incorporar una etapa latente en su ciclo de vida. Con esto en mente se desarrollaron métodos alternativos para evaluar el o los efectos del petróleo y el dispersante en el plancton marino. En general se utiliza el crecimiento, el consumo de alimento y la reproducción como sustitutos de la mortalidad. Así mismo, incluyen en sus reportes: caracterización del agua de dilución y del tóxico; forma en que se mezcla y se introduce y, si es necesario la aereación.

Smith (1973), analiza el aspecto de la contaminación de las aguas y el creciente problema por contaminación de hidrocarburos; las propiedades de un derrame de petróleo crudo, su detección, identificación y análisis de compuestos carcinogénicos; así como los posibles efectos en organismos y comunidades marinas.

En cuanto a pruebas de toxicidad específica que, en la industria han determinado que la concentración "permisible o sin riesgo" de un contaminante, se encuentra entre 1/10 a 1/100 de CL<sub>50</sub> (48-96 h), la cual también puede ser calculada por



la fórmula:

$$\text{Conc. Permisible} = \frac{CL_{50} (24 \text{ h}) \times 0.3}{(CL_{50} (24 \text{ h}) / CL_{50} (48 \text{ h}))^x}$$

donde "x" es el factor arbitrario de seguridad, y cuyo valor se ha estimado de 2 a 3.

En lo referente a la carcinogénesis, análisis recientes han revelado que hidrocarburos potencialmente carcinogénicos están ampliamente esparcidos en el medio marino, siendo la mayoría compuestos aromáticos policíclicos (CAP), principalmente Benzo (a) pireno (3,4 benzopireno). Otros como Benzantraceno puede inducir al cáncer; pero es importante notar que gran parte de los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo no tienen actividad carcinogénica. La presencia de CAP inespecíficos no implica, necesariamente que exista riesgo de cáncer, aunque pueden indicar que los compuestos carcinogénicos están presentes en cantidades reducidas. Estos compuestos tienen poca solubilidad y están presentes en el agua la mayoría de las veces como partículas suspendidas o absorbidas.

Tatem y Anderson (1973), Cox (1974), Rossi et al. (1976), Neff et al. (1976) y Tatem (1977), realizaron pruebas con hidrocarburos individuales y demostraron la naturaleza tóxica de los compuestos aromáticos (naftalénicos), que son acumulados rápidamente por los crustáceos.

Anderson et al. (1974), describen en detalle los dos métodos utilizados para preparar la solución de prueba que contendrá los hidrocarburos y que será utilizada en bioensayos estáticos, cuyas

unidades experimentales serán crustáceos estuari- - nos.

Botello (1975), realizó bioensayos con Penaeus duorarum y con Penaeus aztecus, a los - - cuales se les suministró una dieta especial que con - tenía petróleo crudo. Al sacrificar a los crustá- - ceos el extracto de hidrocarburos fue identificado - por la técnica de cromatografía de gases; observán- - dose que ambas especies degradaron, casi en su to - talidad, los hidrocarburos que se encontraban en el - intervalo de C<sub>12</sub> hasta C<sub>22</sub>. Los hidrocarburos de - C<sub>24</sub> a C<sub>36</sub> (tipo aromático como benzopireno), no - son degradados y permanecen fijos e inalterados en - los tejidos del organismo.

La APHA (1976), en la sección de bio- - ensayos, recopila aspectos sobre: terminología; - requerimientos básicos para bioensayos; preparación - de organismos para prueba; tipos de bioensayos, - material y procedimiento; conducción del bioensayo; - cálculo, análisis y reporte de los resultados; inter- - pretación y aplicación de los mismos. Así mismo, - se incluyen bioensayos específicos con: fitoplancton, - zooplancton, coral, anélidos poliquetos, crustáceos - e insectos acuáticos (todos ellos en forma tentativa), - con moluscos y peces (en forma estandarizada).

Johnston (1976), concluye que la toxicidad - aumenta dentro de la serie: parafina-naftaleno - s y de oleofinas-aromáticos. Dentro de cada una de - las series de hidrocarburos las moléculas pequeñas - son más tóxicas que las grandes. Esto es debido - a que el tamaño molecular afecta al intervalo de - - ebullición y de viscosidad, por lo cual el tipo y se

veridad del daño varía de acuerdo a la clase de petróleo, la estación del año, y la naturaleza de la comunidad contaminada.

Malins (1977), trata la naturaleza y disposición del petróleo, y los efectos biológicos. Recopilando y evaluando la información existente sobre los efectos del petróleo en el medio marino.

Tatem et al. (1978), indican que en los bioensayos la concentración de hidrocarburos totales en la solución de prueba, depende del tipo de petróleo crudo añadido y del método para dispersarlo. Ponen como ejemplo que, si 1.0 ml de petróleo crudo se añade a 999.0 ml de agua de mar, se espera obtener una solución con una concentración de 1000 ppm, sin embargo, la cuantificación de hidrocarburos totales de esta solución, fue de solo 40 a 60 ppm. Por lo cual, los valores de la CL<sub>50</sub> que se reporten deberán ser determinados por el análisis Infrarrojo o estimado de estas determinaciones.

Balckman et al. (1978), desarrollan un sistema que da una suspensión homogénea de la mezcla petróleo-dispersante o petróleo solo. Proponen el uso de un tanque cilíndrico con una propela rotante en el centro dentro de un cilindro central de "Perspex", el cual tiene aberturas superiores e inferiores cubiertas por una malla de plástico para impedir la entrada de los organismos de prueba. Con la propela a una velocidad de 1350 a 1450 rpm, el agua es absorbida por la abertura superior y expulsada por la abertura inferior, produciendo así una dispersión uniforme, reproducible y sin causar

tensión a los organismos de prueba. Una unión magnética entre la propela y el motor, permite que el tanque sea cerrado herméticamente con una tapa de "Perspex".

Corner (1978), señala que los organismos marinos incluyendo el plancton, han sido expuestos a los hidrocarburos del petróleo que emanan de yacimientos submarinos a través del tiempo geológico, y parece ser que han desarrollado mecanismos fisiológicos y bioquímicos, que les han permitido adaptarse a la presencia de pequeñas cantidades de estos compuestos en el medio marino. Así mismo considera que en el presente se ha incrementado el interés por conocer los efectos que se producen en organismos planctónicos al exponerse a hidrocarburos y a los compuestos relacionados con un derrame accidental. Ello ha producido una gran variedad de literatura dispersa. La revisión de las publicaciones consideradas en su artículo se refieren a estudios de laboratorio y son discutidas en el contexto de un modelo simplificado de la dinámica de los hidrocarburos en el ecosistema, que se inicia con el agua de mar de donde pasan el fitoplancton y de ahí al zooplancton.

Maciorowski et al. (1980), comparan la literatura de 1978 con la de 1979, donde se observa el gran interés que se tiene en llevar a cabo bioensayos aplicados para evaluar y predecir la toxicidad de la contaminación del agua.

La U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 1979), publicó un manual de bioensayos para la evolución de efectos a corto plazo, en el

se presentan aplicaciones, finalidades, desarrollo, -  
grados de complejidad y costo relativo de cada prue  
ba.

Schmid-Bleek y Wagenknecht (1979), re-  
visan los distintos métodos para evaluar la toxici-  
dad y su utilidad dentro de la legislación ambiental  
Alemana.

En el primer Simposio Ruso-Americano  
sobre contaminación química en el medio marino --  
publicado por EPA (1978), se consideran los méto-  
dos analíticos y de muestreo; los problemas relacio-  
nados al determinar los niveles permisibles de con-  
taminantes; y con ello prevenir las consecuencias -  
biológicas en los océanos.

Otro reporte de la EPA (1978), da reco-  
mendaciones para seleccionar pruebas preelminares,  
"sustancialmente predictivas", utilizadas en toxico-  
logía acuática; se incluyen además organismos y --  
pruebas en ecosistemas.

EPA (1978), describe los procedimien-  
tos para evaluar laboratorios móviles, incluyendo la  
laboratorio de bioensayos, que se llevan a cabo du- -  
rante el desarrollo de programas de certificación. -  
Esto es de gran importancia para correr pruebas -  
cerca de los cuerpos de agua donde se está presen-  
tando un problema de contaminación.

Ehrenspeck (1979), publica un compendio  
de contaminación por petróleo.

Laughlin (1979), muestra que factores --

como temperatura, salinidad e hidrocarburos, pueden alterar la concentración de hidrocarburos aromáticos, a la cual están siendo expuestos los organismos de prueba.

Mc Leese (1979), presenta la relación que existe entre la estructura química y los efectos letales que producen los fenoles anilinas y otros hidrocarburos aromáticos en camarones y almeja.

Marty (1979), Higashihara y Sato (1979), reportan los efectos de los dispersantes en las poblaciones de bacterias; y la distribución y abundancia de bacterias que degradan hidrocarburos.

Numes y Benville (1979), Tokuda (1979), presentan trabajos con fitoplancton, petróleo crudo y emulsificantes del petróleo.

Ustach (1979) y Spooner (1979); miden los efectos subletales que producen los petróleos crudos sobre los copépodos.

Anderson, (1979), especifica que la mayor parte de las investigaciones están dirigidas hacia el descubrimiento de respuestas biológicas a estímulos sensitivos que permitan evaluar el estado fisiológico de organismos expuestos en condiciones experimentales o en el campo. En el último caso, sería para determinar el impacto de un derrame o efluente bajo condiciones naturales; y el primero es un intento para determinar la concentración del "umbral mínimo sin riesgo" para distintas especies, bajo diferentes composiciones y concentraciones de hidro

carburos. Esto puede ser de gran ayuda para predecir el daño, debido a la gran variedad en la composición del petróleo y a la gran diversidad de organismos en el medio natural. En cuanto a la toxicidad de un petróleo dado, señala que esta puede ser predicha en términos generales, por la concentración relativa de aromáticos tóxicos y por las características físico-químicas de la mezcla petróleo-agua y también por un patrón general de toxicidad relacionado con el grado de alquilación y solubilidad en agua de los componentes. Los compuestos aromáticos, como el criseno y benzo-pireno (cuatro y cinco anillos), tienen muy poca solubilidad en agua y por lo tanto, son de baja toxicidad en exposiciones cortas. Compuestos como el benceno (un anillo) y fenantrenos (tres anillos), presentan una toxicidad que parece incrementarse con el grado de alquilación. Advierte que no es posible extrapolar de una especie a otra en cuanto la absorción y eliminación de hidrocarburos. Mientras los bivalvos tienden a acumular, lenta pero constantemente, los hidrocarburos, los peces y crustáceos toman estos compuestos rápidamente alcanzando el nivel máximo en pocas horas. Ha sido demostrada la acumulación de hidrocarburos del petróleo, al igual que el metabolismo de éstos en el hígado, branquias, y hepatopáncreas de crustáceos. Esta actividad contribuye significativamente a la tasa de liberación exhibida por peces y crustáceos. La degradación enzimática ocurre durante períodos de exposición crónica al petróleo. Este proceso puede ayudar a explicar o medir los efectos subletales.

El Instituto de Ciencias Marinas de la Universidad de Texas (1979), presenta el reporte fi

nal del IXTOC - I. Este contiene: información de las características químicas de las muestras del Ixtoc - I, y de las mezclas petróleo-agua de mar utilizadas para los estudios de toxicidad; información de los efectos del petróleo-Mexicano en la actividad fotosintética del fitoplanctón y pastos marinos; así como, resultados de los estudios de toxicidad del petróleo del Ixtoc - I en zooplancton.

El programa Coordinado de Estudios Ecológicos en la Sonda de Campeche (1980), proporciona información sobre los trabajos realizados para el control del Pozo Ixtoc - I, el combate al derrame, así como la determinación de sus efectos en el ambiente marino. De acuerdo con la cifra estimada por PEMEX durante el período de 281 días en que el Ixtoc - I estuvo fuera de control, fluyeron 3,100,000 barriles de petróleo, de los cuales, después de descontar los hidrocarburos quemados, los evaporados y los recolectados, se estima que quedaron a la deriva 1,023,000 barriles. El petróleo del Ixtoc-I que quedó a la deriva correspondía a un petróleo privado de las fracciones ligeras (gasolina, querosina y buena parte del diesel), debido a que pasó primero por un contacto turbulento con el agua de mar y después sufrió un calentamiento y exposición al fuego en el borbollón. Parte del petróleo que quedó expuesto en la superficie del mar se dispersó en forma artificial mediante el uso de sustancias químicas biodegradables y no tóxicas (SIC), finamente atomizadas desde barcos y aviones especiales. A juzgar por los resultados, la mayor parte del petróleo derramado fue degradado por procesos naturales, aún en los primeros días del derrame en que el flujo del Ixtoc-I tuvo su máximo. En



las muestras no se lograron cuantificar hidrocarburos disueltos en concentraciones superiores a las 60 ppm. En cuanto a la evaluación de sustancias activas al azul de metileno, que es una manera indirecta de determinar la presencia de agentes tensoactivos, los resultados fueron negativos, lo que reveló que los dispersantes utilizados fueron diluidos o biodegradados en tal forma que no se detectaron, por lo que se concluyó que su aplicación no produjo daño alguno a la vida marina.

Con el objeto de conocer los efectos tóxicos del petróleo del Ixtoc-I con diferente grado de intemperismo, el Instituto de Ciencias Marinas de la Universidad de Texas, realizó una serie de bioensayos con diversos organismos. Los resultados de bioensayos con fitoplancton indican que, el crudo Ixtoc Intemperizado en las condiciones y concentraciones de prueba, no afecta la velocidad fotosintética, comparativamente con los resultados obtenidos en la muestra testigo. Así mismo, en algunos casos se registró un mayor consumo de  $O_2$  en las muestras que contenían crudo Ixtoc, lo cual refleja mayor actividad orgánica (SIC) que en el testigo.

En los bioensayos realizados con zooplancton, también concluye que este crudo no afecta al zooplancton del Golfo de México. Las pruebas de toxicidad al exponer invertebrados al petróleo crudo del Ixtoc-I, intemperizado, se llevaron a cabo utilizando las siguientes especies marinas:

- a).- Entre cangrejos y almejas no se presentó el efecto letal del crudo Ixtoc en las concentraciones probadas (1.25, 3.75, 7.5, 15.0 ppm).

- b).- En el camarón café, como en el caso anterior, no se presentaron efectos letales en ninguna - de las concentraciones probadas a excepción - de la concentración de 15 ppm donde la mortalidad fue mayor en un 3% con respecto a la - del control.
- c).- En ningún caso se determinó la concentración letal media,  $CL_{50}$ ; sin embargo se considera - que es mayor a 15 ppm, valor que no se de-- tectó en el Golfo de México.

## PRUEBAS DE LABORATORIO (BIOENSAYOS)

### Definición

Las pruebas de toxicidad o bioensayos - fueron inicialmente realizadas con drogas, donde el principal interés era determinar la potencia de un - estímulo con base al grado de respuesta de los or- ganismos de prueba, (Brown, 1973).

Sprague (1973), define al bioensayo como una prueba en la cual se determina la potencia o - dosis de una sustancia particular por la reacción - causada en los organismos. El opina que esta defi- nición cubre adecuadamente tanto a las pruebas de - potencialidad de drogas realizadas en farmacología - y como á las pruebas de toxicidad conducidas en -- estudio de contaminación.

Las pruebas de toxicidad son estudios - donde los organismos de prueba son sometidos a -- una serie de concentraciones de una sustancia o a un intervalo de condiciones físicas, por un tiempo - estipulado; y los efectos causados son comparados - con un grupo testigo, el cual está constituido por - organismos de la misma especie, sujetos al mismo tratamiento excepto por la exposición al contaminan- te o condición a prueba, (Craddock, 1977).

Al aumentar el número de investigado- - res que utilizan los bioensayos, se ha incrementado el número de términos utilizados para expresar los resultados, siendo los más comunes:

Concentración Letal: CL, es utilizada -- para expresar los resultados de bioensayos en don-- de se aplican concentraciones que causan efectos -- agudos. Un subíndice es empleado (CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub>, - CL<sub>70</sub>) para indicar el porciento de animales que pe-- recen a una determinada concentración de la subs-- tancia a prueba. Los efectos que un tóxico produce a los organismos acuáticos depende de su concentra-- ción y del tiempo de exposición, por lo cual, el -- tiempo debe ser incluido al expresar el resultado. - Por ejemplo: CL<sub>50</sub> 96 h es la concentración a la -- cual una sustancia es letal para el 50% de los or-- ganismos de prueba a las 96 h de exposición.

Límite de Tolerancia Media: LT<sub>m</sub>, LT<sub>50</sub> así como CL<sub>50</sub> tienen el mismo significado pero, - LT<sub>10</sub> es equivalente a CL<sub>90</sub>, y LT<sub>90</sub> lo es a CL<sub>10</sub>.

Concentración Efectiva: CE, es utilizada cuando se determina algún otro factor diferente a -- la muerte. La concentración efectiva media (CE<sub>m</sub>) es la concentración que produce un efecto especifi -- co o respuesta, como: Pérdida de equilibrio; paráli -- sis; desarrollo anormal; o cualquier otro efecto -- subletal. Cuando se utiliza "CE" se debe especificar claramente el efecto medido, (APHA, 1976).

Los efectos de los contaminantes pueden ser clasificados por uno o más de los siguientes tér -- minos:

Agudo.- Involucra un estímulo con una severidad -- suficiente para ocasionar una respuesta rápida, usual -- mente dentro de los cuatro días de exposición.

Subagudo.- Un estímulo menos severo que el estímulo agudo, produce una respuesta en un período más largo.

Crónico.- Involucra un estímulo lento o continuo, - sobre períodos de un décimo del ciclo de vida o - - más.

Letal.- Causa la muerte por acción directa.

Subletal.- Insuficiente para causar la muerte.

Acumulativo: Llevado a cabo por adiciones sucesivas o aumento de potencia.

Los más utilizados son los efectos agudos que son siempre letales, y efectos crónicos que puede ser letales o subletales.

De acuerdo a Beynon y Cowell (1974), - la toxicidad puede ser clasificada de acuerdo a la - concentración como: extremadamente tóxica  $CL_{50} < 100$  ppm.

Tóxica  $CL_{50}$  entre 100 y  $10^3$  ppm.

Moderadamente-tóxica  $CL_{50}$  entre  $10^3$  y  $10^4$

Ligeramente-tóxica  $CL_{50} > 10^4$  ppm.

## Tipos de Bioensayos

APHA (1976), clasifica a los bioensayos por la forma en la que se aplica la solución de prueba en estáticos, renovables y de flujo continuo; y por su duración en corto plazo, intermedios y a largo plazo.

Bioensayos Estáticos: son aquellos en los cuales los organismos permanecen en la misma solución durante el tiempo de prueba.

Bioensayos Renovables: Los organismos son transferidos a una solución de prueba recientemente preparada, en intervalos periódicos, usualmente cada 24 h.

Bioensayos de Flujo Continuo: a las cámaras de prueba se les introduce y extrae, un volumen constante de la mezcla del agua de dilución y tóxico, obteniendo así un flujo continuo. Comúnmente se renueva cinco veces al día la solución de prueba.

Los bioensayos estáticos son utilizados para evaluar los efectos del tóxico sobre el fitoplancton y zooplancton, debido a que en las pruebas de flujo continuo los organismos se perderían. Estas pruebas no son satisfactorias cuando se utilizan sustancias que presentan: demanda de oxígeno elevada; inestabilidad o volatilidad; de fácil degradación por hidrólisis o actividad bacteriana; o bien, si son rápidamente tomadas por los organismos. Siendo todo ello de gran importancia, ya que al no considerarlo, los organismos quedarían expuestos a

diferentes concentraciones a través del tiempo de exposición.

Las pruebas de tipo renovable son utilizadas con peces y macroinvertebrados. Si se utilizan organismos pequeños no es necesario renovar la solución tóxica antes de 96 h; pero si existe demanda de oxígeno, es deseable renovar la solución de prueba cada 24 h.

Bioensayos a Corto Plazo: son muy útiles para establecer comparaciones entre contaminantes y ofrecen aplicaciones prácticas para la evaluación del impacto de una contaminación aguda. La toxicidad es evaluada mediante la determinación de la CL<sub>50</sub>. Esta determinación se emplea muy corrientemente, dado que ofrece resultados reproducibles y proporciona, si no un conocimiento de la toxicidad completa de la sustancia, si información sobre el efecto tóxico ejercido por los diferentes productos y la sensibilidad relativa de un número de especies al mismo. Por lo cual, los estudios de toxicidad deben ser llevados a cabo en condiciones rigurosamente definidas y constantes, tanto en lo que concierne a los organismos empleados (especie, tamaño, estado de desarrollo, etc.), como a las condiciones del medio (pH, temperatura, oxígeno disuelto, etc.). Estos bioensayos se llevan a cabo mediante:

a).- Pruebas Exploratorias: Cuando materiales de toxicidad desconocida son probados, se puede ahorrar mucho tiempo y esfuerzo realizando pruebas exploratorias o de escala amplia, con las cuales, se determinará el intervalo aproximado de concen-

tración del tóxico que será utilizado en las pruebas a corto plazo definitivas. Las pruebas exploratorias o de selección de intervalo, son en la mayoría de los casos estáticas y con una duración de 8 a 24 h. Los organismos de prueba son expuestos a un amplio intervalo de concentración expresada en mg/l ó ppm, usualmente guardando una relación logarítmica (0.001; 0.01; 0.1; 1.0; 10.0; y 100.0). Dentro de las concentraciones probadas, es deseable que una mate a todos los organismos y otra concentración que mate a muy pocos. Si la concentración menor utilizada mata a todos los organismos, es necesario optar por otra serie, en una relación logarítmica menor a la concentración mas baja.

Para determinar la concentración que será utilizada en las pruebas definitivas, se selecciona la concentración mayor que no mata a ningún organismo o sólo a unos cuantos, y la concentración menor que mata a todos o a la mayoría de los organismos; posteriormente se selecciona una serie de concentraciones basadas en un bisección progresiva de intervalos en escala logarítmica. Por ejemplo, cuando el intervalo seleccionado está entre 1.0 y 10.0; se utiliza concentraciones, tales como: 2.4; 3.2; 4.2; 5.6; y 7.5. Estos bioensayos son montados, por lo general, con cinco o más concentraciones a prueba y un testigo, considerando tres repeticiones por cada concentración.

b).- Pruebas Definitivas: Pueden ser estáticas, renovables, o de flujo continuo. La duración de las pruebas es determinada por el tipo de tóxico, los objetivos de la prueba y la precisión deseada. La



duración de los bioensayos a corto plazo, es usualmente la misma para los diferentes organismos -- (24 - 96 h), pero con organismos de ciclo de vida corto el tiempo usual puede cubrir varias generaciones o limitarse a una. La duración de las pruebas deben ser limitadas, en parte por la duración del estadio deseado para el estudio.

Bioensayos Intermedios: No existe una separación clara entre bioensayos intermedios y los a corto plazo, o entre bioensayos a largo plazo e intermedio. Esto depende de la duración del ciclo de vida de los organismos de prueba. Algunas veces los bioensayos pueden durar hasta 14 días, -- mientras que los bioensayos intermedios suelen ser de 15 a 90 días, aún así, los 14 días pueden representar varios ciclos de vida para algunas algas, al igual que los 90 días para muchos organismos del zooplancton. Las pruebas de duración intermedia pueden ser estáticas, renovables, o de flujo continuo. Las pruebas de flujo continuo son recomendables en la mayoría de los casos.

Los bioensayos intermedios son usados, o pueden ser con organismos que han sido obtenidos, en sus diferentes estadios por coleccionar de campo. Estas pruebas son a menudo utilizadas, para determinar como los efectos de diferentes tóxicos decrecen con el tiempo y como la curva de toxicidad se hace asintótica el eje "X" (tiempo de exposición).

Bioensayos a Largo Plazo: En este tipo de bioensayos se aplica el tóxico durante una parte a todo el ciclo de vida de la especie a prueba. Son

utilizados debido a que en los bioensayos de corto plazo, los efectos subletales escapan a la observación, aún cuando constituyen a largo plazo factores de mortalidad importantes. Los efectos crónicos o subletales se tratan a menudo, de una acción progresiva sobre ciertos órganos vitales, como hígado, hepatopancreas, sistema branquial, etc. En general, los objetivos de este tipo de pruebas son: establecer la sensibilidad relativa de especies importantes, a los efectos subletales; determinar la influencia que ejercen diferentes variables físico-químicas en la toxicidad de la sustancia de prueba; obtener datos fidedignos para evidencias o acciones legales contra la contaminación; y coleccionar datos esenciales para conceder permisos de descargas. Siendo el objetivo final de esta prueba, determinar la cantidad de una sustancia que puede ser descargada en un determinado cuerpo de agua, siendo esta información de gran importancia para elaborar un reglamento dirigido a prevenir la contaminación del agua.

Los bioensayos a largo plazo deben ser continuados durante todo el ciclo de vida de los organismos, e incluso más allá sobre las generaciones siguientes; la calidad del agua de dilución debe seguir el ciclo estacional natural que se presenta en el área en donde se desarrolla el organismo de prueba. La realización de tales bioensayos plantea problemas técnicos considerables, a pesar de estas dificultades, muestran precisamente que las concentraciones reales de seguridad son considerablemente más bajas que las que se deducen de los bioensayos a corto plazo, (Leynaud, 1976).

## Facilidades y Equipo

El sistema de abastecimiento de agua - para el laboratorio y todo el equipo necesario para el almacenamiento, mantenimiento, aclimatación y - prueba, deberán ser construidos con un material no tóxico, tales como: vidrio, acero inoxidable, sellantes de silicón, uniones y líneas de PVC Schedule 40, Titanio, fibra de vidrio; también han sido utilizados con buenos resultados, las resinas poliéster y las - resinas epoxy.

Los sistemas de calentamiento deben de tener una interfase de titanio o vidrio con el agua.- Los compresores de aire deberán ser a prueba de - agua, para impedir que el aceite entre en las líneas de aire y contamine el agua; cuando se requiere de grandes cantidades de aires se utilizan sopladores - de baja presión, asegurandose que las tomas de -- aire no estén cerca de laboratorios químicos o de - chimeneas.

## Cámaras de Cultivo y de Prueba

Para el cultivo y aclimatación de macroinvertebrados se utilizan tanques circulares de 1 a 3 m de diámetro; los tanques deberán ser lisos y carecer de esquinas para evitar que los organismos se dañen. Los tanques cuadrados o rectangulares son utilizados cuando se carece de espacio, ellos deberán tener tuberías para introducir y drenar el agua, en extremos opuestos; las esquinas deberán ser redondeadas y lisas; si se utilizan tanques de concreto es recomendable el cambio periódico de agua antes de utilizarlos. Los materiales de construcción que estén en contacto con el agua de dilución, no deberán ser porosos para evitar que absorban cantidades significantes de agua.

Las cámaras de pruebas utilizadas en pruebas estáticas pueden ser botellas de vidrio de 3.9 lts (1 galón) o de 19.6 lts. (5 galones); con larvas se utilizan recipientes de 1.0 lt ó de 250 ml.

El tamaño de las cámaras de prueba puede variar de acuerdo con el tamaño de los organismos y/o facilidades. Es recomendable que todos los recipientes tengan una red o un vidrio como cubierta, para impedir que los organismos de prueba se salgan del recipiente.

Para todas las pruebas, se debe marcar un límite del peso de los organismos por litro de solución a prueba. Esto minimiza el consumo de oxígeno disuelto, la conversión metabólica de los constituyentes del tóxico, la acumulación de desechos de productos metabólicos y el choque inducido por la sobrepoblación; debido a que cualquiera de estos efectos pueden alterar significativamente los resultados de las pruebas (EPA, 1978).

## Limpieza

Debido a que la limpieza presenta un costo considerable de tiempo, se debe diseñar un equipo que permita una limpieza fácil y evite el crecimiento de algas indeseables. Todas las cámaras de prueba, nuevas o usadas, deberán ser lavadas de la siguiente manera:

- Lavar con agua y un detergente apropiado, de preferencia a una temperatura de 50°C o más. El detergente en polvo o líquido deberá ser completamente sintético (SPARKLEEN o ALCONOX).

- Enjuagar con agua a 50°C o más.

- Enjuagar con ácido clorhídrico, diluido al 15%, para remover metales y bases.

- Enjuagar con agua a 50°C o más.

- Enjuagar con acetona para remover compuestos orgánicos.

- Enjuagar dos veces con agua destilada.

Cuando sea posible, el procedimiento descrito deberá ser utilizado para el equipo que tenga contacto con el sistema de prueba. Todo el equipo y recipientes deberán ser enjuagados con el agua de dilución antes de la prueba (EPA, 1978).

## ORGANISMOS DE PRUEBA

### Selección

La APHA (1976) y EPA (1978) consideran que los organismos de prueba deben cumplir con las siguientes características:

- a).- Ser una especie sensible, nativa del cuerpo de agua receptor del tóxico en estudio.
- b).- Conocer su distribución geográfica; que sea abundante y de fácil colecta durante todo el año.
- c).- Tener conocimiento de métodos de cultivo en el laboratorio y de sus requerimientos ambientales.
- d).- Que presente buenas condiciones fisiológicas, que este libre de parásitos y con baja mortalidad.
- e).- Encontrarse en la etapa más sensible de su ciclo de vida.
- f).- Ser comercialmente importante.

API (1973), elaboraron una lista a nivel regional de organismos "importantes", que son potencialmente vulnerables a los efectos del petróleo crudo y mezclas de petróleo-dispersante. Los organismos específicos fueron seleccionados como indicadores regionales, con propósito de uniformar las técnicas de bioensayos y poder comparar los resultados con datos base, derivados de pruebas rutinarias en el laboratorio. Entre las especies pro-

puestas se encuentra Penaeus duorarum para la región de la sonda de Campeche (generalidades de esta especie en el Apéndice I).

### Captura

Para la captura de hembras grávidas se requiere del conocimiento de las zonas de producción, la época del año, la hora, los parámetros ambientales y el tiempo de arrastre. Fuentes et al. (1976) y Soto (1979), describen las características de la pesca del camarón y la parte más representativa del Banco de Campeche, que es el área limitada por los 18° 45' y 21° 25' N y 90° 30' W, al norte de Cd. del Carmen, Campeche, hasta las isobatas de 21 y 25 brazas.

El camarón rosado prefiere los suelos de cieno y alubión, fondos firmes, con arenas de coral que contengan una mezcla de conchas de moluscos, como ha sido demostrado por Springer y Bullis (1954), Hildebrand (1954-55) y Gunter (1956). Hay evidencias de que el desove es más abundante durante la primavera, verano y otoño, según Ingle et al. (1959), Cummings (1961) y Jones et al. (1964). Generalmente es pescado durante la noche, pero también puede ser capturado en días nublados y cuando el agua está turbia, Hildebrand (1955) y Eldred et al. (1961).

El tiempo de remolque de la red depende de la cantidad de peces y fauna acompañante, es recomendable un arrastre de 10 a 30 min.; una vez que el producto es colocado sobre cubierta, se debe

identificar la especie, según las claves de Pérez - Farfante (1970) y se deben seleccionar las hembras menos golpeadas; este trabajo se hace con la mayor delicadeza sin apretar demasiado o asentar; los especímenes no se dañan ya que el tiempo fuera del agua es corto. Los tanques o hieleras, de 75lts. de capacidad, en los cuales son colocadas las hembras, contienen agua de mar filtrada y oxigenada al 100% de saturación; el agua tropical no es necesario que se mantenga circulando, pero si es recomendable - un cambio de agua cada 24 h. La temperatura se debe mantener constante, en calor extremo se utilizan bolsas de plástico con hielo para disminuir la temperatura, así las hembras pueden ser transportadas por más de 120 km , manteniéndose tranquilas, con poco consumo de oxígeno y disminuyendo la mortalidad.

En un volumen de 30 ó 40lts. de agua de mar se colocan un máximo de 10 hembras. Las que son seleccionadas para transportar al laboratorio son las que presentan un mayor grado de desarrollo del ovario, colocando un camarón por hie-  
ra. El desarrollo del ovario fue estudiado por --  
Cummings (1961), los lóbulos del ovario maduro -  
son visibles externa y dorsalmente a lo largo del -  
abdomen, con una coloración gris-oscuro.



## Desove y Eclosión.

En el laboratorio, las hembras grávidas fertilizadas son colocadas en hieleras tapadas, para evitar la entrada de luz y ruido; el contenido de -- oxígeno debe ser al 100% de saturación o mayor de 5 ppm de O.D.; la temperatura es aumentada 2°C -- cada 3 hrs., hasta alcanzar 27°C que es la temperatura que induce al desove. La relación existente -- entre temperatura y desove, Eldred et al. (1965), -- señala que el aumento de la temperatura parece ser el factor más importante.

A la mañana siguiente, se deberá retirar las hembras de las hieleras en las que ocurrió desove. Para el control cualitativo y cuantitativo se toma una muestra de las hieleras y se observa -- al microscopio, el huevo fértil se reconoce por su transparencia, viendose primero la mórula y la gástrula, posteriormente el embrión con movimientos -- rápidos y periódicos; el huevo no fértil es opaco; -- las hieleras con menos del 50% de huevos fértiles -- son eliminados. A las hieleras con huevos fértiles se les aumenta 1°C (28°C, temperatura que induce la eclosión) y se les coloca un foco en la esquina, tapando el resto, para atraer los Nauplios más -- fuertes a un sitio específico aprovechando su fototropismo positivo.

Después de 3 hrs. de la eclosión, se observa la concentración de Nauplios y se selecciona la hielera que contenga mayor sobrevivencia ( $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^5$  Nauplios. Para el cultivo se colectan  $2 \times 10^3$  Nauplios, por medio de sifoneo y son -- colocados en hieleras conservando una densidad de --

30 a 50 larvas por litro. A las hieleras se les --  
coloca una lámpara de Neón, encendiéndola a llegar  
a la fase Nauplio IV, donde se inoculara Skeletonema  
como Alimento.

## Mantenimiento y Manejo

La preparación del tanque de crecimiento incluye un procedimiento especial de limpieza: todas las superficies del tanque de cultivo y tuberías deben ser restregadas con agua y jabón, después de esto, enjuagar con agua de la llave y desinfectar -- con cloro comercial (Clorox HTH) al 0.5% o formalina al 30% (disolución de aldehído fórmico), se cepilla cuidadosamente y se deja remojar por toda la noche, por la mañana son enjuagados con agua de la llave y posteriormente se pasa una esponja con etanol.

Los tanques de cultivo deben recibir -- agua no contaminada, con una calidad constante y -- en un sistema de flujo continuo de por lo menos dos cambios por día; de otro modo, es necesario para -- desinfectar un sistema de recirculación donde el -- agua pasa por filtros de carbón activado o filtros -- de cinco micras para remover metabolitos, y por -- filtros ultravioleta para disminuir el número de bac -- terias.

El género Panaeus, requiere un flujo -- mínimo de 7.5 lts./día/g y deseable un mayor a 22 l/día/g, para asegurar una concentración de O.D. -- cerca del 70% de saturación. El flujo de aire debe variar según el estado de la larva como sigue: de -- huevo a protozoa I (muy suave, de 0.5 a 1.0 lt. -- /min); de protozoa I a III (suave, de 1.0 lt./min); -- de protozoa III a mysis I (moderado, de 1.0 a 1.5 l/min); de mysis I a postlarva (moderado, de 1.0 a 2.0 l/min). Se debe checar si existe demasiado -- aire o si falta, que no sea aire caliente o con im --

purezas, y que no exista demasiada presión en las bombas o aceite en las líneas.

La temperatura del agua debe estar entre 27.5 y 29.0°C (siendo la óptima 28.0°C), temperaturas bajo 27°C producen muda irregular y crecimiento bajo; temperaturas de 29.5°C ó más son letales. La salinidad debe ser ajustada a 35‰, una variación de 6 ‰ es riesgosa. El pH debe estar entre 7.2 y 8.3. El N-NH<sub>3</sub> a una concentración <0.03 mg/l.

Para minimizar la tensión de los organismos, deberán ser manipulados lo menos posible; cuando el manejo es necesario se deberá hacer con cuidado y rápido. Para transferir organismos pequeños se utilizan pipetas con bulbos de hule; con organismos grandes se utilizan mallas o redes, estas son disponibles comercialmente o pueden ser hechas con paños de seda para cernir, red de plancton o un material similar. Los organismos que toquen superficies secas y los que son dañados por caídas o durante el manejo deberán ser descartados (EPA, 1978). En el manejo de crustáceos se deben tomar ciertas precauciones; adultos y larvas son caníbales y atacan fácilmente a sus compañeros con exoesqueleto blando, por lo cual se mantienen a juveniles y adultos en tanques individuales.

## AGUA DE DILUCION Y TOXICO DE PRUEBA

## Abastecimiento de agua

El agua utilizada para el cultivo y como diluyente, debe ser obtenida del cuerpo de agua que recibirá la sustancia en cuestión. Si se encuentra contaminada, la toxicidad del material a prueba puede ser afectada por la presencia de antagonismo o de sinergismo. El pH y la salinidad deberá ser favorable para la especie cultivada, con poca turbidez y pocos sólidos sedimentables. Debido a que es problemático mantener y asegurar una salinidad óptima, si es posible obtengase agua de una área con salinidad alta y obtenga la salinidad deseada añadiendo agua dulce o de poca salinidad con una calidad satisfactoria. Este procedimiento es apropiado cuando se requiere de poca cantidad de agua, -- para grandes cantidades utilice sal comercial o agua de mar artificial. El uso de agua de mar artificial es recomendada para una gran variedad de propósitos: estudios de toxicidad relativa; pruebas de sensibilidad relativa; estudios para determinar la influencia de varios niveles de salinidad, pH y otros factores ambientales (APHA, 1976).

Guilles La Roche et al. (1970), seleccionan un medio sintético para la aclimatación, cultivo y prueba; esto es debido a la variedad en la composición del agua de mar natural disponible, especialmente en lo que se refiere al contenido de metales traza y otros materiales disueltos. Las marcas comerciales recomendadas por la EPA, (1978), son: "INSTANT-OCEAN" y "RILA SALTS".

## Petróleo Crudo

Para los bioensayos con petróleo crudo, es recomendable que todas las muestras lleguen en recipientes sellados de 100 ml. Para cada tipo de crudo, es conveniente, tener 40 recipientes disponibles. Para agregar las diferentes cantidades de crudo a las cámaras de prueba y de mezclado, se utilizan pipetas serológicas desechables. El petróleo que no haya sido utilizado en cada recipiente abierto, debe ser descartado. Esto es debido a la naturaleza volátil de algunas fracciones del petróleo.

La preparación de un stock es complicada debido al carácter insoluble de algunas fracciones del petróleo en el agua. La toxicidad de las fracciones solubles del petróleo pueden ser determinadas independientemente del producto total. Los dos métodos para la preparación, tanto de la Fracción Soluble en Agua (FSA) y de la Dispersión Petróleo en Agua (DPA), han sido descritos en detalle por Anderson et al. (1974): la fracción soluble en agua es la disolución del petróleo en agua, al ser agitadas lentamente por 20 h, mediante un agitador magnético, obteniéndose la fase acuosa por debajo de una capa de petróleo (la proporción utilizada es de 9:1 agua de mar petróleo). La velocidad de agitación debe ser controlada para que el vértice o remolino, no exceda más del 25% hacia el fondo del recipiente; se deja reposar por 6 h, antes de que la fase acuosa sea sinfoneada y utilizada inmediatamente, en los experimentos o para análisis químico. La dispersión petróleo en agua, es la solución donde un volumen conocido de petróleo ha sido añadido al agua de mar. La DPA es agitada vigorosamente --

por 5 min y se deja en reposo por 60 min., para permitir la separación de las fases. Posteriormente se introducen los organismos, teniendo cuidado que estos no sean cubiertos por la capa superficial de petróleo.

Guilles La Roche et al. (1970), recomiendan que inmediatamente después de añadir la sustancia a prueba, los recipientes deberán estar herméticamente cerrados y agitados por 5 min, en un sacudidor recíproco, con una agitación aproximada de 315 335 golpes/min, siendo cada golpe con un recorrido de 0.75 pulgadas. La plataforma agitadora deberá estar adaptada para sostener seis de las cámaras utilizadas en la prueba. La agitación y exposición de los organismos deberá ser llevada a cabo a la misma temperatura.

## Dispersantes

Comercialmente existen disponibles diferentes tipos de dispersantes del petróleo. Los estudios de estos productos, realizados por Poliakoff, (1966), indican que la mayoría de estos caen en una de las seis categorías mayores, basadas en los - - agentes surfactantes y en los tipos de solventes. Algunos de ellos son principalmente solubles en agua de mar y otros tienen gran afinidad por los derivados del petróleo. Sin hacer caso a esta afinidad, - se observó que una solución stock que contenga 10 ml de cualquier dispersante diluidos en 500 ml con agua de mar, puede ser eficientemente dispersada - con acción manual, por lo cual, alícuotas con propiedades tóxicas reproducibles son obtenidas, (1 ml de la solución stock de dispersante-agua de mar - - en 2 l de agua de mar = 0.01 ml de dispersante - - por litro), (Guilles La Roche et al.(1970).

Se debe tener cuidado para evitar la pérda de las fracciones solubles. Esto incluye el - uso de muestras recientes y de descartar el dispersante no utilizado después de cada prueba. Si es - posible, el dispersante deberá ser caracterizado - - químicamente. El dispersante es más soluble que el petróleo, sin embargo si las soluciones dispersantes-agua de mar se dejan reposar se separan las fracciones insolubles. Para asegurar una composición uniforme, la solución deberá ser mezclada continuamente mientras se toman las alícuotas apropiadas (API, 1971).



### Emulsión Petróleo-Dispersante.

La proporción de petróleo-dispersante se basa en las instrucciones del fabricante. En general, las emulsiones de petróleo dispersante son probadas en una relación de 10 partes de petróleo por 1 parte de dispersante, V/V. La concentración de petróleo dispersantes es expresada en partes por millón (ppm), en cada solución a prueba (API, 1971). Para probar el efecto de la mezcla, antes de introducir a los organismos, se añadirá primero el petróleo y posteriormente cantidades apropiadas de la solución stock de dispersante. Los resultados se expresaran en mililitros totales del producto por litro de solución, por ejemplo: cuando se obtenga una CL<sub>50</sub> 96 h de 0.506 ml/l, esto corresponderá a 9% dispersante (0.046 ml/l) y 91% de petróleo (0.46 ml/l).

## Mezclado y Agitación.

Durante la prueba, el mezclado continuo produce una excelente dispersión. El petróleo y el dispersante, mezclado de esta forma, se dispersa en pequeños glóbulos que son distribuidos en la solución a prueba. La emulsión que no es continuamente mezclada tiende a separarse en una parte que flota y se concentra en la superficie, y otra fracción que queda dispersa en la solución de prueba.

La agitación de los recipientes que contienen las distintas concentraciones de petróleo crudo y petróleo-dispersante, es necesaria para obtener soluciones de prueba reproducibles. La agitación por 5 min, a la velocidad indicada es poco más del intervalo mínimo requerido; ya que se ha observado que la agitación por períodos más largos, hasta de 30 min, no afecta los valores obtenidos de la CL<sub>50</sub>, en 96 h. La velocidad alta, en instrumentos filtradores, incrementa la toxicidad de la homogenización del petróleo crudo y de la mezcla petróleo-dispersante.

## PARAMETROS QUE DEBERAN CONTROLARSE

Los bioensayos que no cuentan con un sistema de control de las variables sistemáticas, presentan problemas al querer determinar los efectos que producen las sustancias de prueba y aquellos producidos por las variaciones de: Temperatura salinidad; oxígeno disuelto; pH, alcalinidad y dureza. Así como, la sensibilidad relativa de los organismos seleccionados a dichos parámetros. Se ha observado que es tal la influencia que ejercen los parámetros antes mencionados, sobre la toxicidad de diferentes sustancias, tales como, el petróleo crudo, dispersante y mezclas de petróleo-dispersante, que es necesario controlar y reportar las condiciones bajo las cuales fue llevado a cabo el experimento. Sólo de esta forma se logrará la comparación efectiva de los resultados obtenidos.

## Temperatura

La temperatura del agua es un factor ambiental crítico en la vida de los peces y otros organismos acuáticos. Afecta en un grado considerable, la respiración, crecimiento y reproducción de todas las formas acuáticas, (Huet, 1965). Las relativamente grandes variaciones en temperatura diaria y estacional, de los 20 a 28°C, en muchas zonas susceptibles a accidentes por contaminación -- con petróleo, Sverdrup (1942), sugieren la conveniencia de realizar bioensayos con distintas temperaturas y de relacionar la toxicidad con la estabilidad del tóxico, así como con la sensibilidad de los organismos de prueba.

Estudios con contaminantes diferentes al petróleo crudo y combinaciones de petróleo-dispersante, indican que la temperatura es una variable significativa al evaluar la toxicidad. Generalmente, al descender la temperatura se disminuye la toxicidad de la sustancia de prueba, (Lloyd, 1965); lo inverso es verdadero, para un aumento de la temperatura corresponde a un aumento en mortalidad. -- Aún así, datos preliminares indican que la influencia de la temperatura en la toxicidad de petróleo y mezclas de petróleo dispersante, no siguen esta regla general. Esto puede ser debido al comportamiento del tóxico, ya que a altas temperaturas se produce una volatilización de las fracciones tóxicas.

## Salinidad

Los efectos de distintas salinidades deben ser considerados en bioensayos en donde se utilizan especies estuarinas, debido a los cambios bruscos que se llevan a cabo tanto en estuarios como en lagunas costeras. Hay poca información acerca del efecto de las variaciones de salinidad sobre la toxicidad del petróleo y dispersante. La importancia de generar dicha información es obvia, debido a los amplios intervalos de salinidad encontrados en medios estuarinos y costas marinas.

## Oxígeno Disuelto.

La importancia de este elemento, esencial para la vida acuática, es determinante. La mayoría de los organismos son muy sensibles a cualquier disminución en la concentración de oxígeno disuelto y mueren por asfixia rápidamente. Estudios con tóxicos diferentes al petróleo crudo y mezclas de petróleo-dispersante, sugieren que niveles bajos de oxígeno disuelto tienen un efecto apreciable en la sobrevivencia. La mayoría de los tóxicos, reducen el oxígeno disuelto acelerando la muerte e introduciendo otras alteraciones, (Burdick, 1966). En bioensayos a largo plazo, con contaminantes biodegradables, se produce un aumento en la demanda de oxígeno que afecta el metabolismo de los organismos de prueba.

Hay poca información disponible de los efectos del oxígeno disuelto en la toxicidad de los dispersantes, solos o en combinación con el petróleo. Las pocas evidencias sugieren que los bajos niveles de oxígeno disuelto, asociados con las mezclas de petróleo-agua y petróleo dispersante-agua, pueden alterar significativamente la respuesta de los organismos. Hazel (1969), reporta que la sensibilidad de los organismos ante tres dispersantes, decrece cuando se les proporciona oxígeno a una solución de prueba carente de él. No se menciona a que grado el decremento de toxicidad puede ser atribuido a la volatilización o al mantenimiento de niveles altos de oxígeno disuelto. En pruebas similares, Tagatz (1961), demuestra que una concentración de productos del petróleo es tolerable por sábalo juveniles, Alosa sapidissima, a una concentra

ción de 6.0 ppm de oxígeno disuelto; pero resulta -  
mortal a niveles de 1.9 - 3.2 ppm de oxígeno di- -  
suelto.

## pH, Alcalinidad y Dureza.

Los crustáceos y otros organismos acuáticos pueden tolerar niveles de pH, ácidos y alcalinos, siempre y cuando sea entre los límites de 5.0 a 9.5, (Lloyd, 1965). Los valores altos pueden ser tolerados temporalmente, pero el límite depende de la especie. Evidencias indirectas de estudios a largo plazo, sugieren que con tóxicos diferentes al petróleo, cualquier variación amplia de pH o alcalinidad, puede tener un efecto apreciable en la determinación de la toxicidad. Pocas pruebas han sido - - conducidas para determinar los efectos del pH, alcalinidad y dureza en los resultados de bioensayos con petróleo y dispersante. En la mayoría de las pruebas llevadas a cabo por Perkins (1968), todos los dispersantes aplicados disminuyen el pH significativamente; en todos los casos la depresión se observó a concentraciones que excedían las 100 ppm y es muy posible que los organismos fueran afectados, tan sólo, por esta concentración, los bioensayos conducidos con productos del petróleo, que producen una disminución en el pH, deben de realizarse por duplicado, uno de ellos con el pH normal, - para poder determinar la influencia de este en la toxicidad.



## Estabilidad y Volatilidad

La estabilidad del petróleo y del dispersante, es de gran importancia para los bioensayos. En particular el petróleo crudo varía ampliamente en componentes orgánicos e impurezas inorgánicas, por ejemplo: azufre y metales traza. La exposición al aire o a procesos de intemperismo, ocasiona una rápida pérdida de hidrocarburos aromáticos con bajo punto de ebullición, y por lo general es esta fracción ligera la que se cree ocasiona o es el principal contribuyente de la toxicidad, (Berridge, 1968). Perkins (1968), concluye que la toxicidad del petróleo crudo reside en las terminaciones ligeras que no están presentes en los residuos; y también atribuye un decremento en la toxicidad, en soluciones viejas de dispersantes, por una pérdida de solventes. Spooner (1969), reconoce la dificultad de distinguir la pérdida de toxicidad ocasionada por evaporación o biodegradación, que parece ser ocurren juntas en condiciones naturales; señala que si los residuos del petróleo crudo "Kuwait" se les elevara la temperatura a 210°C, su composición sería similar a aquellas muestras de petróleo, que habían sido intemperizadas por 20 h o más, después del accidente del "Torrey Canyon".

Puede mencionarse que: la volatilidad y estabilidad del petróleo y dispersante utilizado en los bioensayos, pueden tener un efecto significativo y probablemente de primer orden en los resultados. Para estudios comparativos, la edad del petróleo -- (tiempo transcurrido después de la extracción) tiene que ser la misma. Soluciones frescas de petróleo, dispersante y mezclas de petróleo-dispersante, deben ser preparadas antes de empezar cualquier prueba. Debido a que el petróleo crudo pierde las fracciones ligeras (aproximadamente 20% en 24 h).

## ANÁLISIS QUÍMICO DE LA SUBSTANCIA A PRUEBA.

Las determinaciones analíticas de la -- sustancia de prueba, ya sea que se trate de com-- puestos individuales o de un grupo de compuestos, -- son esenciales para obtener resultados reproducibles y significativos, en especial cuando se desea cono-- cer la toxicidad relativa, como es el caso de com-- puestos del petróleo crudo y de los dispersantes; -- esto es debido a que son inestables y complejas, los cuales pueden sufrir procesos de fotooxidación.

### Análisis de Hidrocarburos del Petróleo.

El monitoreo y análisis químico del pe-- tróleo crudo, utilizado en los bioensayos, fue ini-- cialmente reportado por Anderson et al. (1974), y -- posteriormente por Vaughn (1973); Bean et al. (1974) Rossi et al. (1976), Rossi y Anderson (1976), Van-- der horst et al. (1976), Rice et al. (1975) y Rice -- et al. (1976).

El procedimiento analítico, para la iden-- tificación y cuantificación, del petróleo crudo en el sistema de prueba involucra cuatro pasos básicos:

- Colecta y preservación de la muestra.
- Extracción (incluyendo saponificación de las grasas) de la materia orgánica de la matriz celular de los -- organismos, de la matriz inorgánica de los sedimen-- tos, y de las fracciones disueltas o particuladas en el agua.
- Separación de los hidrocarburos del petróleo del-- material lipoide mediante cromatografía.

- Identificación y cuantificación de los hidrocarburos del petróleo.

### Colecta y preparación de la muestra.

Debido a que los hidrocarburos están presentes tanto en el ambiente como en el laboratorio, el programa de muestreo deberá estar diseñado para obtener muestras representativas evitando contaminantes que se puedan introducir durante la colecta; la preservación y el almacenamiento de la muestra deberán ser adecuados.

La muestra de agua debe ser pipeteada en el centro de la cámara de prueba, sin incluir espuma, nata superficial ni material del fondo o de los lados del recipiente. La muestra es almacenada en recipientes de vidrio con tapas de rosca, la parte interna de la tapa debe estar recubierta con papel aluminio o de preferencia con teflón.

Todos los recipientes deben ser lavados con detergente y agua caliente, y posteriormente con solventes de alta pureza, primero acetona seguida de hexano, pentano o cloruro de metileno.

### Almacenamiento.

Por lo general, si la extracción y análisis no es inmediato, todos los tipos de muestras (agua y organismos) deben ser congelados; esto reduce la pérdida de hidrocarburos por volatilización y minimiza las modificaciones enzimáticas. La temperatura de almacenamiento debe ser  $-20^{\circ}\text{C}$ ,

(ASTM method D-3324).

### Extracción de la materia orgánica.

**Material biológico:** En los organismos -- los hidrocarburos se encuentran concentrados en la sustancia lipídica. Los lípidos y los hidrocarburos acompañantes son extraídos del material biológico - por uno de los métodos básicos: 1.- Extracción con solventes orgánicos en un sistema de reflujo. 2.- -- Una combinación de digestión alcalina seguida de -- extracción por un solvente orgánico. Warner (1976), utiliza en bioensayos, el método de digestión alcalina acuosa.

**Agua de Mar:** Los hidrocarburos pueden estar disueltos en el agua de mar; absorbidos o -- adsorbidos para la materia viva o bien pueden ser parte de gotas microscópicas suspendidas en la columna de agua. Los hidrocarburos y los compuestos orgánicos (no-hidrocarburos) pueden ser extraídos del agua de mar utilizando: cloruro de metileno,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; cloroformo,  $\text{CHCl}_3$ ; tetracloruro de carbono,  $\text{CCl}_4$ ; pentano,  $n\text{-C}_5\text{H}_{12}$ ; eter de petróleo; o -- freon; sacudiendo el agua de mar en presencia del solvente dentro de un embudo de separación.

### Separación.

El material lipóide de la muestra de -- agua de mar se deberá encontrar en el solvente. El propósito de la separación es aislar a los hidrocarburos del material no-hidrocarburo, para identificar y cuantificar los componentes individuales. El proo

cedimiento es el mismo para todas las muestras. - Farrington et al. (1976), dan una bibliografía extensa al respecto. La columna Cromatográfica de -- gel de silicato ( $\text{SiO}_2$ ) es utilizada para aislar hidrocarburos aromáticos y saturados. Una pequeña capa de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) sobre la columna de silice -- puede ser utilizada para retener los compuestos polares de alto peso molecular. La cromatografía líquida de alta presión, es utilizada por Miles et al. (1975), para analizar hidrocarburos en organismos -- marinos.

Los hidrocarburos pueden ser separados utilizando tamices moleculares, de acuerdo a su configuración y tamaño. Un tamíz molecular con un -- diámetro de poro de 5 Angstrom ( $\text{A}^\circ = 10^{-10} \text{ m}$ ) retiene a los hidrocarburos de cadena recta y excluye a los hidrocarburos ramificados y compuestos que -- contienen anillos de cuatro o más carbonos. Un -- poro de 9  $\text{A}^\circ$  remueve a las isoparafinas, las nor-- males y a las oleofinas de los hidrocarburos aromáticos.

### Análisis.

Algunos métodos proveen y estiman que tanto material está presente en el extracto total -- (gravimétricos), y otros en una porción del extracto, con una respuesta fotométrica específica (espectrofotometría fluorescente, infrarroja y ultravioleta).

Métodos gravimétricos; en este método -- una alicuota del solvente es evaporada hasta secar -- y el residuo es pesado en una balanza sensible, -- (ASTM Method D-2778). Una balanza electrónica --

puede pesar una muestra tan pequeña como,  $10^{-5}$  g. Este método da la cantidad total de material extractable no volátil (parafinas, oleofinas y aromáticos - de peso molecular alto) en cada fracción después de pasar por la columna cromatográfica. Este método está sujeto a errores debido a la posible contaminación por polvo, y debido a que los solventes altamente volátiles no disuelven a todos los compuestos cuantitativamente. También algunos de los hidrocarburos con peso molecular bajo ( $C_{12}$  a  $C_{15}$ ) son tan volátiles que pueden ser perdidos durante la evaporación del solvente. Aún así, el método es rápido y no requiere de equipo analítico costoso.

Espectrofotometría Ultravioleta (UV): puede ser utilizada para medir los hidrocarburos no saturados del petróleo y para determinar las polioleofinas conjugadas e hidrocarburos aromáticos.

Espectrofotometría Infra-roja (IR): es probablemente la más utilizada, nos da una medida del total de hidrocarburos contenidos en el medio, mediante el conteo de ciertas uniones de carbono-hidrógeno. Tanto la UV como la IR no son específicas para determinar la presencia de compuestos individuales.

Espectrofotometría fluorescente: ha sido utilizada para medir cierto tipo de compuestos; aunque, muy pocos compuestos de los hidrocarburos de petróleo fluorescen; y es esta la razón por la cual no es ampliamente utilizada, como lo es la IR y la UV, en análisis rutinarios. Esta técnica es rápida y sensitiva para checar incidentes de contaminación por petróleo conocido, o para monitores de bioensa

yos donde el contenido de hidrocarburos aromáticos presentes puede ser establecido.

Cromatografía de gases (CG): es la más aplicada debido a que puede separar y cuantificar - hidrocarburos desde el metano hasta compuestos - aromáticos de seis anillos.

Cromatografía líquida (CL) y Cromatografía de capa fina (CCF): puede ser utilizada en aplicaciones específicas, en especial con compuestos -- que no son propios para la CG (por ejemplo: que no se volatilizan fácilmente).

Espectrofotometría de masas (EM): es un método utilizado para la identificación de compuestos específicos, y es a menudo interfaseado con la cromatografía de gases.

El procedimiento analítico para la identificación y cuantificación de los hidrocarburos, es - designado en base a la naturaleza y tipo de muestra, el equipo disponible y el tipo de información requerida.

Una discusión detallada de los métodos - analíticos utilizados con hidrocarburos del petróleo es dada por, Clark and Brown (1977); y en el Manual de CARIPOL para la vigilancia de la contaminación por petróleo, (1980).

## Análisis de Dispersantes.

La concentración de dispersantes en la solución de prueba es determinada mediante el método de azul de metileno; este método depende de la formación de una sal azul cuando el azul de metileno reacciona con un surfactante aniónico (LAS, Alquil Sulfatos y Alquil polietoxil sulfatos). La sal es soluble en cloroformo y la intensidad de color es proporcional a la concentración de sustancias activas al azul de metileno "SAAM". La intensidad es determinada por lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 652 nm. Este método es aplicable en un intervalo de concentración de "LAS" 0.025 a 100 mg/lt; el volumen de la muestra de agua depende de la concentración de LAS esperada.

Concentración de LAS	Volumen de la muestra
mg/lt	ml
0.025-0.08	400
0.08 - 0.4	250
0.4 - 2.0	100
2.0 - 10	20
10 - 100	2.0

Si se requiere de una muestra menor a 100 ml, se diluye a 100 ml con agua destilada; si se utilizan 100 ml o más se extrae toda la muestra (APHA, 1976).



## CALCULO DE RESULTADOS

Con los datos obtenidos, se calculará la "CL<sub>50</sub>" y sus límites de confianza de 95%, con base en la mortalidad registrada en las distintas concentraciones (mg/l) del tóxico aplicado en la solución de prueba.

Finney (1964, 1971), presenta una gran variedad de métodos para calcular la CL<sub>50</sub>. Los más utilizados son: el de interpolación; el probit; el logit; el de promedio móvil; y el de Litchfield-Wilcoxon. Si más del 10% de los organismos testigo mueren, ninguno de los métodos previamente mencionados podrán ser utilizados para calcular los valores de CL<sub>50</sub>, y los resultados de las pruebas deberán ser utilizados con precaución al evaluar los efectos de la toxicidad.

Para estimar una CL<sub>50</sub> satisfactoria, los datos utilizados deberán cumplir ciertos requisitos: las concentraciones del tóxico aplicado deberán ser del 55.5 al 57% del siguiente valor inmediato superior; en pruebas de gran precisión y con fines de investigación, es deseable obtener diferentes porcentos de mortalidad a distintas concentraciones, en la cual, cada valor debe ser del 75% del valor mayor inmediato, o una serie en la que cada concentración sea del 85 al 57% del valor mayor inmediato. En pruebas rutinarias, si una concentración produce letalidad menor al 50% y otra concentración produce una mortalidad mayor al 50%, uno de estos valores puede ser la CL<sub>50</sub> estimada.

### Estimación de la CL<sub>50</sub> por Interpolación.

La CL<sub>50</sub> es un valor interpolado, obtenido entre los porcentajes de organismos que mueren en dos o más concentraciones, en las cuales, en una se produce una mortalidad menor al 50% y en la otra mayor.

La estimación de CL<sub>50</sub> incluye el graficado de datos en papel de escala semilogarítmica. Al construir la gráfica, se utiliza el eje "X", con escala aritmética, para el porcentaje de mortalidad, y el eje "Y", con escala logarítmica para la concentración de la sustancia de prueba; posteriormente, se traza una línea recta entre los puntos que representan concentraciones sucesivas, que son letales a más y a menos del 50% de organismos de prueba; la concentración que está relacionada con el 50% de mortalidad en la línea trazada, es el valor de CL<sub>50</sub> estimado. (APHA, 1976).

Se debe dar mayor consideración a los puntos entre 16 y 84% de mortalidad, debido a que estos representan + 1.0 de probabilidad a la respuesta media. Si existe duda al colocar la línea esta es trazada lo más horizontal posible, debido a que esto certifica variabilidad en los datos. Si alguno de los puntos es un valor incongruente, se utiliza el siguiente valor, ya sea el superior o el inferior. (Fig. 1).

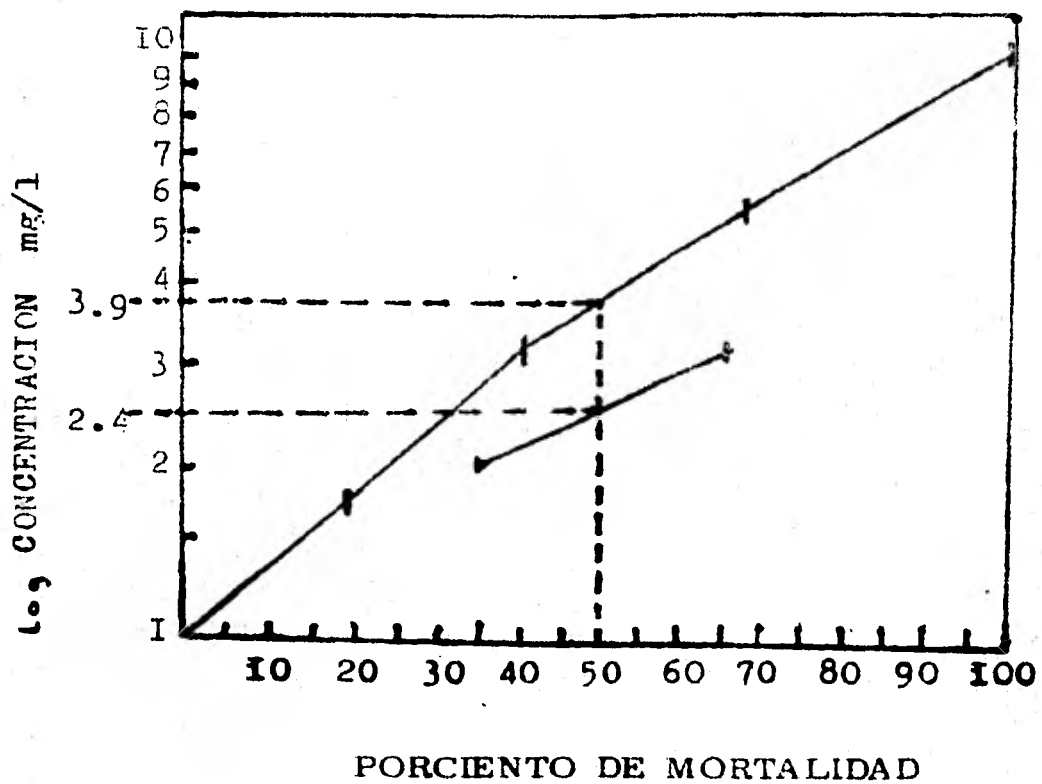


FIG. 1 ESTIMACION DE  $CL_{50}$  POR INTERPOLACION.

### Método Abreviado de Litchfield y Wilcoxon.

El método de Litchfield y Wilcoxon, -- (1949), se ha utilizado para estimar el ajuste de "la línea trazada a ojo", su pendiente, y los límites de confianza de 95% de  $CL_{50}$ . El procedimiento general es:

Paso 1.- Tabular los datos incluyendo: - la concentración del tóxico (mg/l); el número total de organismos expuestos a cada concentración; el - número de organismos afectados; por ciento observado de organismos afectados (ver ejemplo). No es necesario enlistar dos 100% o dos 0% de organismos - afectados por la concentración, mayor o menor, del tóxico a prueba.

Paso 2.- Graficar el por ciento de organismos afectados contra la concentración del tóxico, en papel de probabilidad logarítmica de dos ciclos; el 0 y el 100% no son graficados; se traza una línea temporal a través de los puntos particularmente aquellos en la región del 40 y 60% de organismos - afectados.

Paso 3.- Utilizando la línea trazada se lee y enlista, para cualquier concentración, el por ciento "esperado" de organismos afectados. Utilizando el por ciento esperado, se calcula con la Tabla I - un valor corregido para cada 0 y 100% obtenido en la prueba. Debido a que los valores de la tabla son número enteros, es necesario obtener valores intermedios por interpolación. Los valores corregidos - se grafican y se observa que tanto ajustan a la lí-

nea de los datos graficados; si después de graficar los valores esperados corregidos para el 0 y el 100% de afectados, el ajuste no es satisfactorio, se traza una línea diferente y se obtiene una serie nueva de valores esperados.

Paso 4.- Enlistar las diferencias entre cada valor observado (o corregido) y el valor esperado correspondiente. Utilizando cada una de las diferencias y el valor esperado correspondiente, se lee y enlista el valor de " $X^2$ " en el Nomograma de Fig. 2 (se traza una línea recta que conecta la escala del porciento esperado con la escala de observados menos esperados, el punto de intersección con la escala de " $X^2$ " indicará el valor de  $X^2$ ). Se suman los valores de  $X^2$  y el total es multiplicado por el número promedio de organismos utilizados en la prueba, obteniéndose de esta forma la  $X^2$  calculada de la línea.

Los grados de libertad son el número de puntos graficados menos dos,  $N = K - 2$ . Si la  $X^2$  calculada es menor a la  $X^2$  del nomograma, Para  $N$  grados de libertad, la línea esta bien ajustada y entre los datos no hay diferencias significativas; si la  $X^2$  calculada es mayor, los datos son heterogéneos y la línea no está bien ajustada. Si se presenta este último caso, los datos no pueden ser utilizados para calcular la  $CL_{50}$ .

Paso 5.- Determinación de los límites de confianza de la  $CL_{50}$ ; se lee en la línea ajustada (Fig. 3), la concentración de tóxico para el porciento de afectados correspondientes al 16, 50 y 84% -

(CL<sub>16</sub>, CL<sub>50</sub> y CL<sub>84</sub>); se calcula la función de la pendiente S, según;  $S = \frac{CL_{84}/CL_{50} + CL_{50}/CL_{16}}{2}$ .

De la tabulación de los datos, se determina N' que es definida como: el número total de organismos de prueba afectados en el intervalo del 16 al 84% de organismos afectados. Se calcula el exponente  $(2.77/N')$  para la pendiente y el factor,  $f_{CL_{50}}$ , que es utilizado para establecer los límites de confianza de la CL<sub>50</sub>.  $f_{CL_{50}} = S(2.77/N)'$ .  $f_{CL_{50}}$  puede ser obtenida directamente del nomograma (Fig. 4), trazando una línea recta apropiada a los valores de base y exponente, dando el valor de "f".

#### Cálculo de los límites de confianza de la CL<sub>50</sub>

$$\begin{aligned} & \text{Límite superior con 95\% de probabilidad} \\ = & CL_{50} \times f_{CL_{50}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Límite inferior con 95\% de probabilidad} \\ = & CL_{50}/f_{CL_{50}} \end{aligned}$$

Ejemplo

PASO 1 a 4 : Los datos son tabulados y graficados (Fig. 3) y los valores esperados son leídos en la gráfica.

PETROLEO CRUDO mg/l	NUMERO DE ORGANISMOS	NUMERO DE ORGANISMOS AFECTADOS	% DE ORGANISMOS AFECTADOS	% ESPERADO	OBSERVADO MENOS ESPERADO	X <sup>2</sup>
3.2	20	0	0(.2) <sup>b</sup>	0.6	0.4	0.003
5.6	20	1	5	3.5	1.5	0.006
10.0	20	11	55	(14.5) <sup>a</sup>	Valor Absurdo	
18.0	20	7	35	38.0	3.0	0.004
32.0	20	12	60	67.0	7.0	0.024
56.0	20	18	90	87.5	2.5	0.006
100.0	20	20	100 (99) <sup>b</sup>	97.0	2.0	0.014
					total	= 0.057

(a) El porciento de organismos afectados por la concentración de petróleo crudo = 10 mg/l, obviamente es un valor absurdo y debe ser omitido cuando se ajuste la línea según el Paso. - 2.

(b) Paso.- 3, valor de afectados corregido mediante la Tabla 1.

Paso 4 (cont.)Cálculo de  $X^2$ 

a.- Promedio de organismos utilizados en K (K=6) concentraciones.

$$K = \frac{120}{6} = 20$$

Nótese que el dato para 10 mg/l de tóxico es un -- valor absurdo y no es utilizado. Por lo tanto, K=6, y el total de organismos utilizados es 120.

b.-  $X^2$  calculada =  $20 \times 0.057 = 1.14$

c.- Grados de libertad,  $N = K - 2 = 6 - 2 = 4$

d.- Por la Tabla II, la  $X^2$  para 4 grados de libertad = 9.49

e.- La  $X^2$  calculada es menor que la  $X^2$  tabular, - por lo tanto, se asume que la línea esta bien - ajustada y los datos son homogéneos.

Paso 5.

a.- Mediante la línea ajustada (Fig. 3), se determina la concentración de tóxico correspondiente al 16, 50 y 84% de organismos afectados ( $CL_{16}$ ,  $CL_{50}$  y  $CL_{84}$ ).



b.-  $CL_{84} = 50 \text{ mg/l}$

$CL_{50} = 23 \text{ mg/l}$

$CL_{16} = 10.5 \text{ mg/l}$

c.- Cálculo de la pendiente "S"

$$S = \frac{CL_{84} / CL_{50} + CL_{50} / CL_{16}}{2}$$

$$S = \frac{50 / 23 + 23 / 10.5}{2} = 2.18$$

d.-  $N' = 40$

e.- Cálculo del exponente  $N'$  y de el factor,  $f_{CL_{50}}$

$$f_{CL_{50}} = S^{2.77} / N' = 2.18^{2.77} / 40 = 1.41$$

f.- Cálculo de los límites de confianza de  $CL_{50}$

- Límite Superior con 95% de probabilidad

$$= (CL_{50}) (f_{CL_{50}}) = 23 \times 1.4 = 32.2 \text{ mg/l}$$

- Límite inferior con 95% de probabilidad =

$$CL_{50} / f_{CL_{50}} = 23 / 1.4 = 16.4 \text{ mg/l}$$

## Graficado de las curvas de toxicidad.

La mayoría de los bioensayos pueden dar información de la mortalidad antes del tiempo final seleccionado. Al utilizar las distintas  $CL_{50}$ , obtenidas de los tiempos de observación, se construye una curva de toxicidad; el propósito de la curva de toxicidad, es dar una vista global del proceso y -- cuando se detiene la letalidad aguda, que es cuando la curva se hace asintótica al eje del tiempo. La  $CL_{50}$  para un tiempo de exposición que se encuentra en la parte asintótica, se conoce como "CL<sub>50</sub> Incipiente o Vestíbulo".

El vestíbulo de letalidad aguda, para la media de un grupo de organismos, tiene un valor teórico tan importante, como la  $CL_{50}$  de algunos -- tiempos arbitrarios.

El vestíbulo puede ser determinado, para la mayoría de los macroinvertebrados y peces, antes de las 96 h de exposición. La ausencia de un vestíbulo, para la letalidad aguda, es de gran interés práctico.

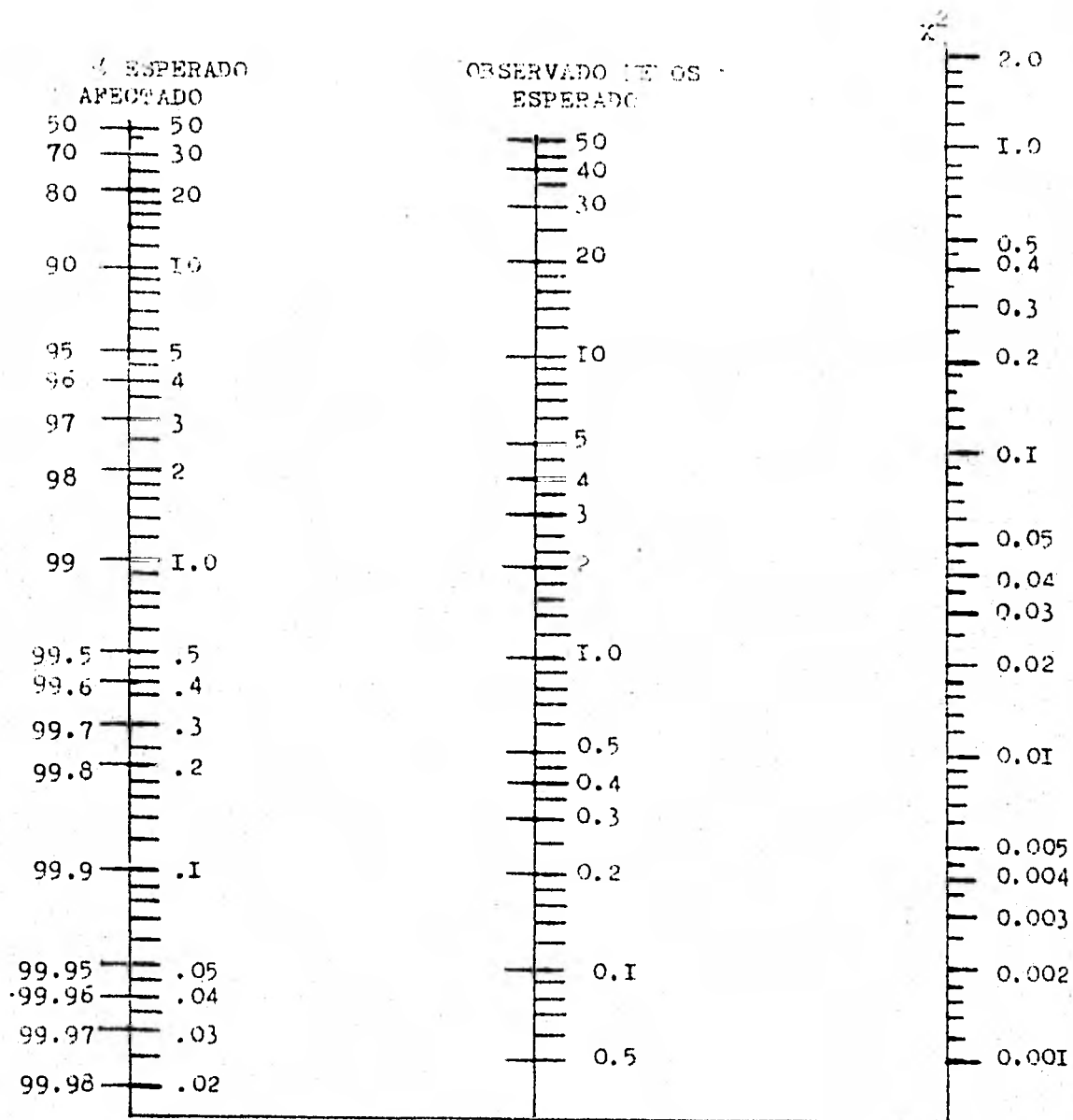


FIG 2 Nomograma para obtener  $X^2$  de el % esperado de afectados, y de observados menos esperados (Paso 4) .

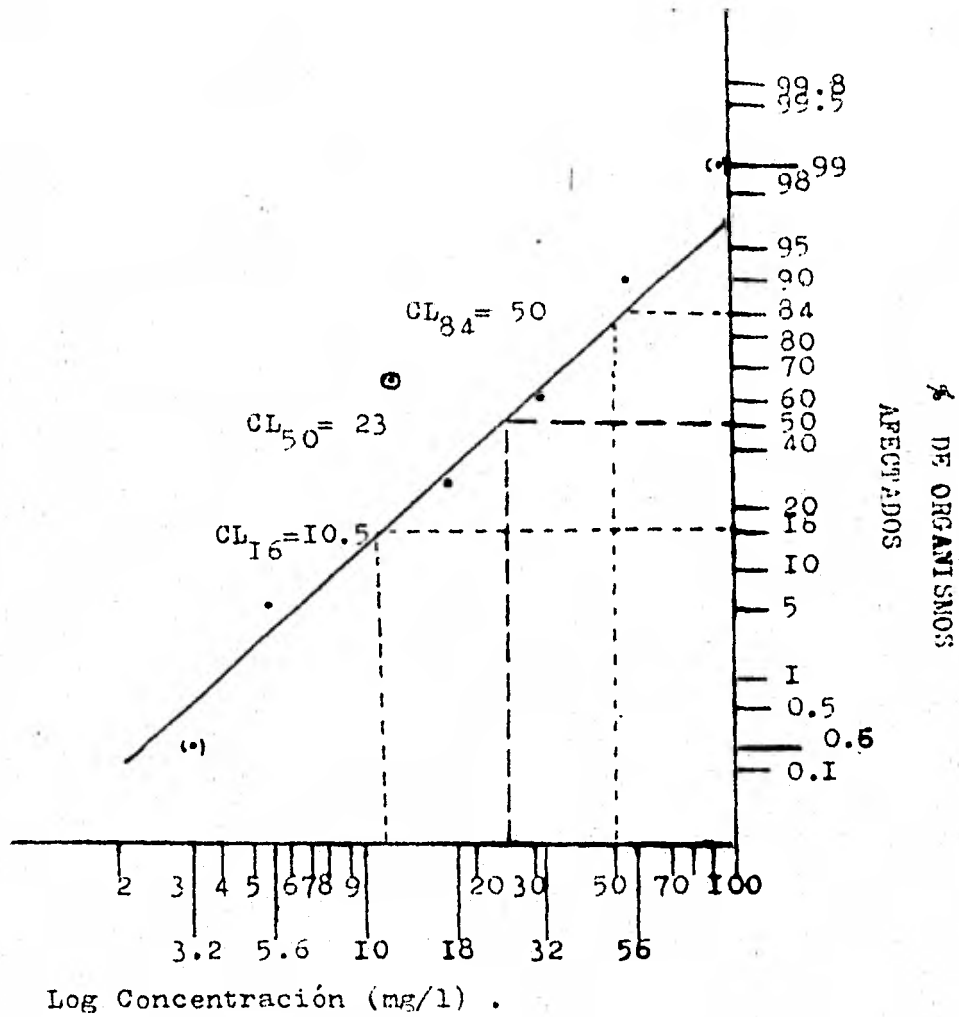


FIG.3 Línea ajustada a los datos, y  $CL_{16}$ ,  $CL_{50}$  y  $CL_{84}$  según se lee en la línea (Pasos, 2,3 y 4).

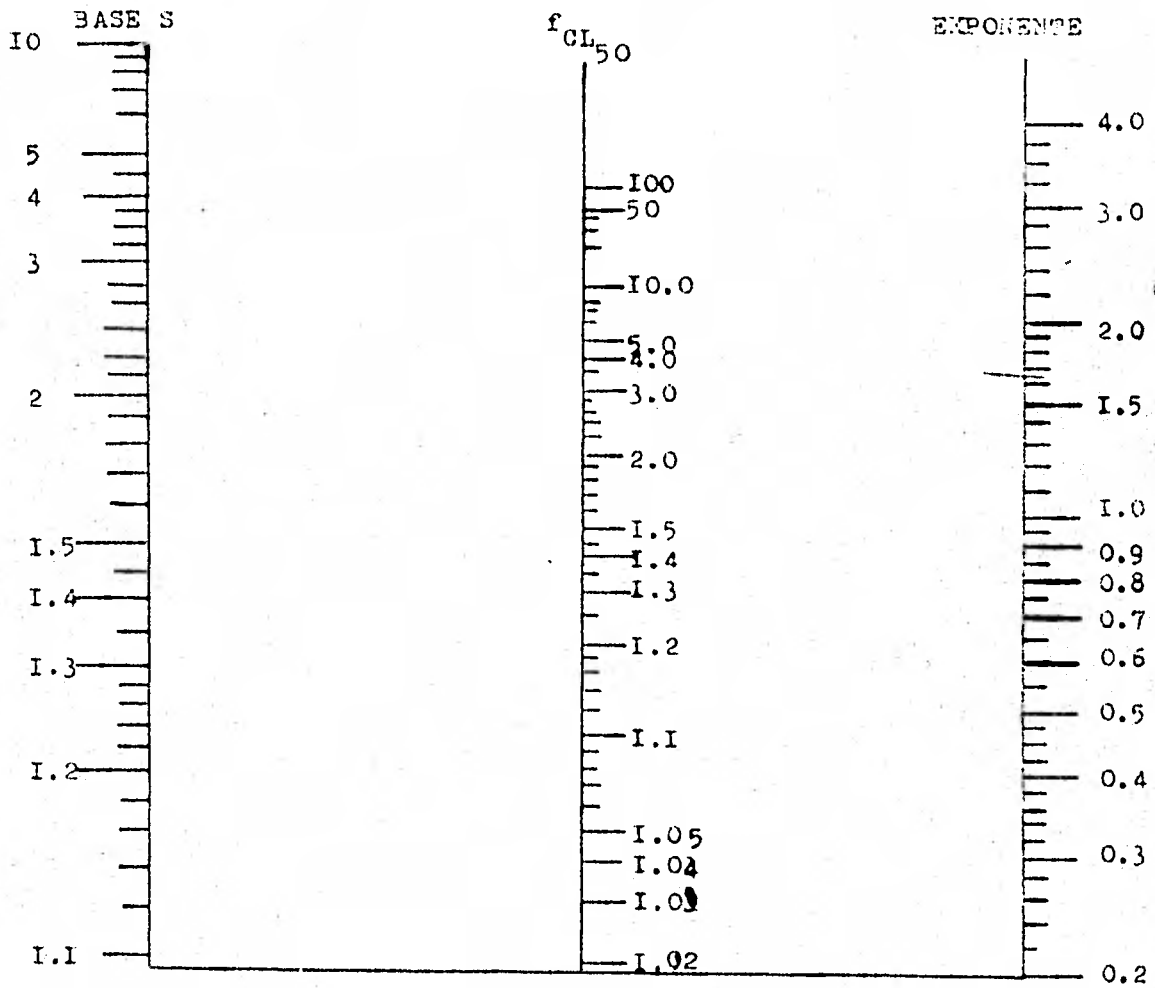


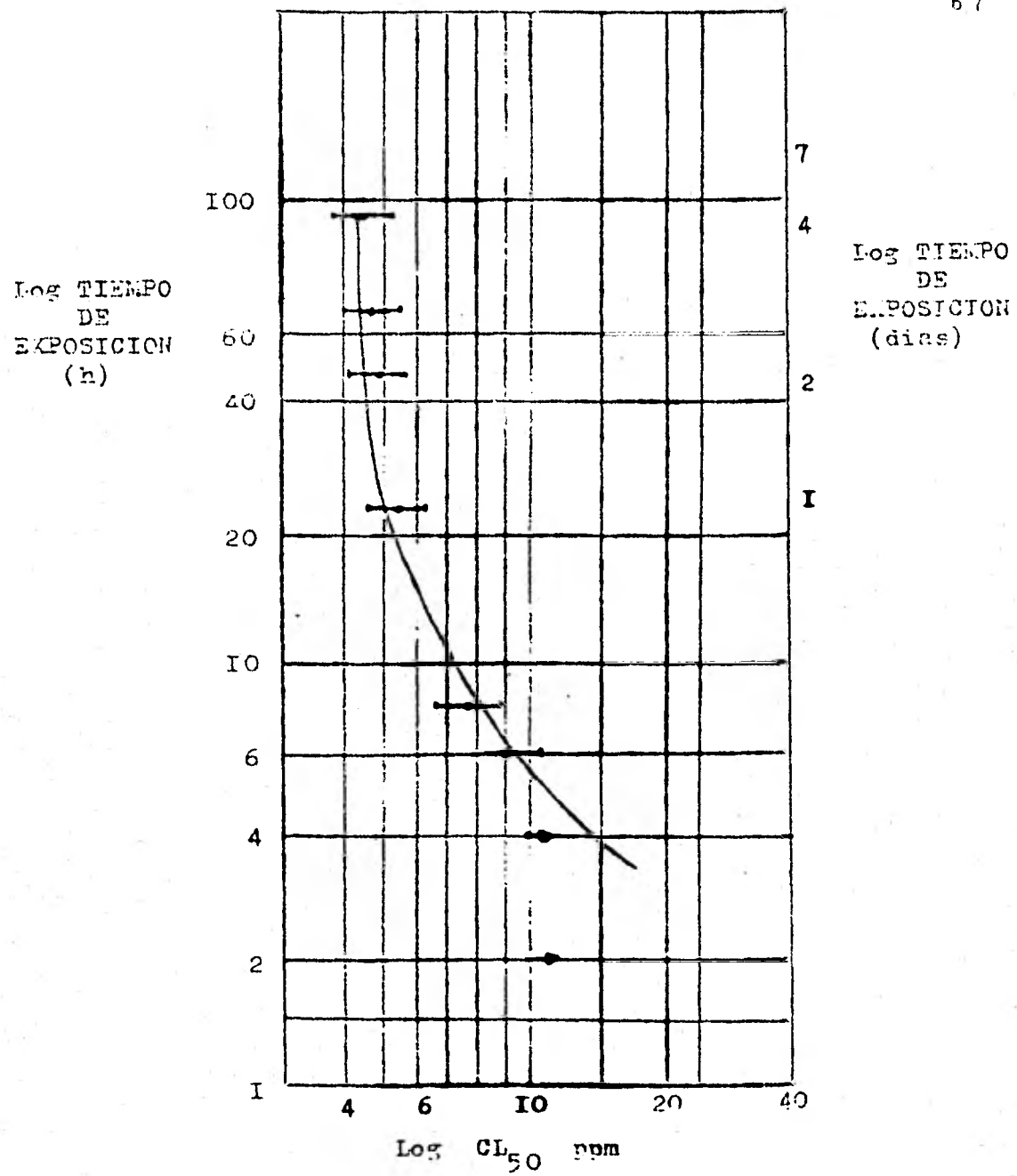
FIG. 4 Nomograma para elevar la BASE S a un exponente fraccional .

TABLA I VALORES CORREGIDOS PARA EL 0 % Y 100 %  
DE AFECTADOS.

Valor Esperado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	---	0.3	0.7	1.0	1.3	1.6	2.0	2.3	2.6	2.9
10	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	4.9	5.2	5.5	5.7
20	6.0	6.2	6.5	6.7	7.0	7.2	7.4	7.0	7.8	8.1
30	8.3	8.4	8.6	8.8	9.0	9.2	9.3	9.4	9.6	9.8
40	9.9	10.0	10.1	10.2	10.3	10.4	10.4	10.4	10.4	10.5
50	---	89.5	89.6	89.6	89.6	89.7	89.7	89.8	89.9	90.0
60	90.1	90.2	90.4	90.5	90.7	90.8	91.0	91.2	91.4	91.6
70	91.7	91.9	92.2	92.4	92.6	92.8	93.0	93.3	93.5	93.8
80	94.0	94.3	94.5	94.8	95.1	95.3	95.6	95.9	96.2	96.5
90	96.8	97.1	97.4	97.7	98.0	98.4	98.7	99.0	99.3	99.7

TABLA II VALORES DE  $X^2$  ( $p = 0.05$ )

Grados de libertad (N)	$X^2$
1	3.84
2	5.99
3	7.82
4	9.49
5	11.1
6	12.6
7	14.1
8	15.5
9	16.9
10	18.8



CURVA DE TOXICIDAD

### Toxicidad Relativa

Cuando se comparan las curvas de toxicidad de diferentes dispersantes probados en las mismas condiciones, se observa que la toxicidad relativa no es constante con el tiempo, y las categorías de toxicidad establecidas a diferentes tiempos difieren significativamente. Un procedimiento estándar es comparar las CL<sub>50</sub> 48 hrs. ó las CL<sub>50</sub> vestibulares. La CL<sub>50</sub> vestibular es aplicada cuando se trata de definir la toxicidad del dispersante en especies oceánicas, debido a que estas concentraciones bajas son las que resultan del uso del dispersante en el mar. Esto no es aplicado con las especies litorales, donde es probable la exposición a concentraciones muy altas de dispersante.

La toxicidad relativa de diez dispersantes puede ser calculada utilizando los datos hipotéticos de la tabla, obteniendo una categoría de toxicidad de acuerdo con un estadio larvario de la especie a prueba. Este orden puede ser comparado con otros estadios utilizando el coeficiente de correlación "r", donde:

$$r = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

n = número de intervalos, y d = diferencia entre cualquiera de los intervalos.



DISPERSANTE	CL <sub>50</sub> 48 hs:	NAUPLIO	PROTOZOEAS	MYSIS	P-LARVA
Slickgone 2	-(3.5)	-1	-1	-4	-4
BP 1002	-(5.8)	-2	-3	-1	-8
Slickgone 1	-(6.8)	-3	-2	-6	-5
Garden CSR	-(8.8)	-4	-7	-3	-2
Essolvene	-(9.6)	-5	-5	-2	-7
Polyclens	-(15.7)	-6	-4	-5	-9
Cleansol	-(44.0)	-7	-8	-7	-3
Slix	-(119.5)	-8	-6	-8	-1
Atlas 1909	-(120.0)	-10	-10	-10	-10
"r" =		--	0.879	0.818	0.152

Los valores del coeficiente de correlación "r" pueden valer de +1 (concordancia completa) a -1 (discordancia completa). Gilles LaRoche, (1970), - Beynon, y Cowell (1974).

## PROYECTO DE TRABAJO

Con el fin de evaluar la toxicidad relativa, sobre los diferentes estadios del camarón rosado, Penaeus duorarum duorarum causada por el petróleo crudo Ixtoc-I y los distintos tipos de dispersantes utilizados en los derrames, se evaluará la Concentración Letal Media "CL<sub>50</sub>" mediante bioensayos estáticos.

Las cámaras de prueba que se utilizan para los organismos adultos son acuarios de vidrio con las siguientes dimensiones: 60 x 40 x 25 cm; los cuales son llenados con la solución de prueba a un volumen de 50 lts. Para las etapas juveniles y fases larvarias se utilizan vasos de precipitados de 1.0 lt a 250 ml, los cuales son colocados flotando en los acuarios de vidrio para mantener la temperatura constante. Es recomendable el uso de cámaras con agitación y temperatura constante. Para organismos con un peso mayor a 0.5 g, la solución de prueba deberá tener una altura de 15 a 30 cm. La relación de área superficial con volumen de la solución de prueba debe ser mínima para limitar la adsorción y absorción de las paredes del recipiente.

El agua de dilución utilizada debe ser agua de mar filtrada y esterilizada, o agua de mar artificial, con las siguientes características físico-químicas: temperatura  $28^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ; salinidad  $35 \pm 1\text{‰}$ ; N -  $\text{NH}_3$  una concentración  $< 0.1$  ppm; oxígeno disuelto a una concentración  $> 4.0$  ppm.

La aereación deberá ser evitada siempre que sea posible debido a que facilita la pérdida de las fracciones volátiles. De ser necesaria, se tiene que correr pruebas paralelas, una serie sin aereación y otra con aereación mediante pipetas Pasteur burbujeando a la misma profundidad en todos los recipientes, por 1.0 lt. del medio de 1.0 a 2.0 ml/seg; observando así el efecto causado por los distintos niveles de oxígeno disuelto. Los parámetros físico-químicos son chequeados durante los conteos de organismos, cualquier anomalía debe ser corregida y registrar en la tabla de datos.

El petróleo utilizado tiene que ser característico del área en estudio, este se coloca en recipientes de vidrio ambas llenando el espacio remanente con Nitrógeno purificado y posteriormente sellados con papel aluminio. El dispersante puede ser mantenido en solución stock (ver preparación de la sustancia de prueba, pág. 33 ).

Las muestras para el análisis químico son tomadas del centro de la solución de prueba, teniendo cuidado de evitar contaminación con la capa superficial de petróleo o de incluir material del fondo o lados del recipiente. Las muestras son tomadas diariamente y se determina si la concentración se mantiene constante en un mismo recipiente y de un recipiente con su réplica; si no es posible realizar diariamente las determinaciones químicas, el análisis se debe llevar a cabo el iniciar y al terminar la prueba, determinando así los cambios en la concentración del petróleo y del dispersante, (ver métodos de análisis químico, pág. 46 ).

La cantidad de organismos expuestos a cada solución de prueba serán 20 como mínimo. Debido a que se trata de una especie tropical, el peso promedio de los organismos o carga de las cámaras de prueba no deberá exceder de 0.40/lit. Los organismos adultos son colectados de los tanques de cultivo mediante mallas o redes; los Nauplios y Protozoeas son agrupados mediante luz y son trasladados a las cámaras de prueba utilizando pipetas Pasteur, evitando así cualquier contaminación y manipulación. La distribución de los organismos por estadio, debe ser al azar.

Los organismos adultos no deberán ser alimentados durante la prueba, los recientemente eclosionados o juveniles serán alimentados de la siguiente forma: Nauplios y Protozoeas se les agregará el alga Skeletonema costatum, a una concentración final de  $10^5$  cl./ml, a las 0 y 24 h de iniciado el bioensayo; con Mysis y Postlarvas se agregan  $10^3$  nauplios de Artemia salina, al iniciar el bioensayo, si es necesario a las 72 h de iniciado el bioensayo agrega la misma cantidad.

El conteo de organismos, en los recipientes de prueba, se realiza a trasluz (evitando contaminación y manipulación) a las siguientes horas: 3, 6, 12, 24, 32, 48, 56, 64, 72, 80, 88 y 96 h; siendo las horas subrayadas las más importantes de observar, anotando en la tabla de mantenimiento la hora exacta de el conteo y el número de larvas vivas. El efecto adverso o muerte se considera cuando el organismo no tenga ningún movimiento muscular, sin importar que aún funcione el sistema

circulatorio y respiratorio.

### Pruebas Exploratorias a Corto Plazo.

Con el fin de disminuir el intervalo de concentraciones utilizadas en las pruebas definitivas a corto plazo se realizarán pruebas de 24 h con cinco concentraciones espaciadas.

Con el petróleo crudo la serie de concentraciones utilizadas, con la fracción soluble y con la dispersión de petróleo en agua, serán: 1.0, 25.0, 50.0, 75.0 y 100.0 ppm. Esta serie es recomendada debido a los resultados obtenidos por Tatem et al. (1978), el utilizar petróleo crudo "South Louisiana" y larvas de Penaeus setiferus y Penaeus aztecus, donde la CL<sub>50</sub> fue de 19.8 ppm al utilizar la fracción soluble del petróleo, y de 37.5 ppm con la dispersión de petróleo en agua.

Con el dispersante se utilizará cinco concentraciones: 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 ppm.

Con la emulsión petróleo-dispersante, las concentraciones utilizadas estarán en una relación de 10: 1 petróleo-dispersante. Debido a que se supone más tóxica, las concentraciones propuestas son: 5.5, 2.2, 1.1, 0.55 y 0.22 ppm. Estas concentraciones expresan el producto total de petróleo + dispersante (5.5 ppm es igual a 5.0 ppm de petróleo + 0.5 ppm de dispersante).

Para las pruebas definitivas se considera la concentración más alta dentro de la cual no hayan muerto organismos o solo unos cuantos, y la concentración más baja donde haya muerto la mayoría o todos los organismos. Todas las concentraciones probadas deben ser determinadas por los métodos

de análisis químico de la Pag. 46 .

Pruebas definitivas a Corto Plazo.

La selección de las cinco concentraciones que se utilizarán en estas pruebas dependerá de los límites obtenidos en las pruebas anteriores. Cada concentración utilizada será del 75 al 80% de su valor inmediato y tendrá tres réplicas. Los bioensayos con Nauplios y Protozoas serán de 48 h., con todos los demás estadios serán de 96h. Con camarón adulto los bioensayos serán estáticos, con renovación de la solución de prueba cada 24 h., en cambio para los estadios anteriores serán estáticos sin renovación.

El cálculo de  $CL_{50}$  y análisis de resultados se hará de acuerdo al paquete estadístico de la pág. 56 .

TABLA DE DATOS

Laboratorio \_\_\_\_\_

Principia \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Finaliza \_\_\_\_\_

Tóxico a prueba Petróleo crudo

Estadío \_\_\_\_\_

CONCENTRACION ppm	RECIPIENTE #	NUMERO DE ORG. VIVOS					OXIGENO DISUELTO mg/l					TEMPERATURA °C					SALINIDAD ‰					pH				
		0	6	12	24	96 h	0	6	12	24	96 h	0	6	12	24	96	0	6	12	24	96	0	6	12	24	96
1.0	1	10					4					28					35					8				
25.0	2	10					4					28					35					8				
50.0	3	10					4					28					35					8				
75.0	4	10					4					28					35					8				
100.0	5	10					4					28					35					8				
TESTICO	6	10					4					28					35					8				
	7	10					4					28					35					8				

## REPORTE DE RESULTADOS

El experimento deberá estar descrito -  
breve y claramente según los siguientes puntos:

-El nombre del método a prueba utilizado, del investigador y laboratorio, fecha en que fue conducido.

-Descripción detallada del tóxico (ver --  
anexo), incluyendo: fuente, hora y fecha de colecta; conocimiento de propiedades físico-químicas.

-Fuente de agua de dilución, la hora y -  
fecha de su colecta; sus características químicas; y descripción de cualquier pretratamiento.

-Información detallada de los organismos a prueba (ver anexo), la hora y fecha de su colecta; talla y peso; edad, estadio vital; fuente; enfermedades observadas, tratamiento.

-Descripción del procedimiento de prueba; recipientes, incluyendo la profundidad y volumen de la solución; la forma como comenzó la prueba y número de organismos por concentración.

-La definición del efecto adverso (muerte, inmovilidad, etc.) utilizado en la prueba y un -  
resumen de otros síntomas.

-El porcentaje de organismos, en cada --  
recipiente a prueba (incluyendo al control), que mueren o muestran el efecto utilizado para medir la toxicidad.



-Los límites del 95% de confianza y el método utilizado para calcularlos.

-El método utilizado para todos los análisis químicos.

## DISCUSION.

Frente a los problemas de contaminación ambiental, se ha hecho indispensable generar información para conocer el comportamiento y distribución, tanto en la parte biótica como abiótica, de -- compuestos tóxicos de origen antropogénico, tal es el caso del petróleo crudo y los dispersantes. Se han llevado a cabo trabajos de campo para determinar los efectos que producen en la estructura de -- las comunidades y sobre la calidad del agua; sin embargo, en cuanto a la determinación de niveles -- que producen efectos letales o subletales, incluyendo a la bioacumulación, solamente pueden ser detectados mediante pruebas de laboratorio o bioensayos. De tal forma que en la actualidad ambas tendencias son complementarias.

Los bioensayos se consideran como una forma de examinar la respuesta, que presentan los organismos a determinadas sustancias o manifestaciones de energía. Para llevar a cabo una investigación sobre los efectos tóxicos producidos por un -- contaminante deben considerarse: los diferentes bioensayos y sus lineamientos; la forma en que debe -- conducirse, la presentación gráfica y estadística de los datos, así como, su interpretación.

La metodología a seguir en la realiza -- ción de los bioensayos está ampliamente descrita -- en la bibliografía, (EPA, 1978 y APHA, 1976), en ella se considera desde la selección del organismo -- de prueba hasta el análisis de resultados.

El medio marino es el sistema que ha --

sufrido más daños debido a la contaminación por petróleo crudo y dispersante. En México en la Sonda de Campeche, debido a la continua perforación y explotación de yacimientos petroleros, se han incrementado las posibilidades de accidentes (derrames), y es por ello que, especies comerciales de gran importancia económica se han visto afectadas; tal es el caso del camarón rosado Penaeus duorarum duorarum, que en esta área presenta las poblaciones más densas.

La especie seleccionada para los bioensayos no se espera que represente a varios grupos taxonómicos, debido a que en respuesta a una toxina ninguna especie puede representar satisfactoriamente a un género. Los trabajos de Crapp, (1971) y Ottway, (1971), muestran la enorme variación que se encuentra dentro de un mismo género, por ejemplo en Littorina. Los mismos argumentos son presentados cuando se trata de escoger especies que representen niveles tróficos o bien distintos mecanismos de alimentación. Los datos sobre una especie nos dicen poco o nada acerca de la respuesta a un mismo tóxico por otra especie, Crapp, (1971), sin embargo, nos pueden dar información sobre los mecanismos de reacción o bien respuestas conductuales.

Es preferible trabajar con una especie cultivada en el laboratorio; debido a que si es colectada en el campo, se tiene que pensar en los factores que gobiernan los sitios de colecta y si es posible que todos los organismos pertenezcan a una misma población, ya que a pesar de tener la misma talla pueden variar ampliamente en cuanto a edad, madurez sexual y estadios. En cuanto al nú

mero de organismos dentro de cada cámara de prueba, existen métodos estandar para calcular el tamaño de muestra adecuado, Wishart y Sanders, (1955). En cuanto a peces y algunos invertebrados se ha establecido que 10 ó 20 organismos son recomendados, siendo el paso inicial el calcular la desviación estandar, y si esta es grande el número de organismos puede aumentarse hasta 50 ó 100.

Una vez seleccionado el número óptimo de organismos, debemos decidir que organismos serán los utilizados. Por ejemplo, en algunos casos puede existir diferencia en la actividad; quedando -- dentro de una concentración los organismos de captura difícil y en otra los de captura fácil, siendo -- la respuesta a la toxicidad diferente en los dos grupos. Para que los resultados tengan una validez estadística es importante distribuir al azar a los organismos, y aún más, su ubicación en el laboratorio. En situaciones donde la temperatura, luz y otros factores no son controlados, la colocación de las cámaras pueden alterar significativamente los resultados.

El número de réplicas depende de la certeza requerida en los datos (Wishart y Sanders, 1955). Las réplicas pueden ser simultáneas o con un intervalo de tiempo para estudiar los cambios estacionales (Crapp, 1971 y Baker, 1971). Existe una vasta información que documenta los errores en los que se puede caer cuando no se ha diseñado el experimento. La selección del diseño, debe ser un compromiso entre lo teóricamente deseable y lo prácticamente posible.

En el desarrollo de la prueba, uno de --

los principales problemas que se presenta es la aereación de las cámaras de prueba, tanto en los experimentos a largo como a corto plazo. Algunos laboratorios la reportan esencial, Crapp (1971); mientras que otros la consideran innecesaria o indeseable, Spooner y Corkett, (1974), debido a que cambia la naturaleza del petróleo mediante el incremento de evaporación de las fracciones ligeras volátiles. En los estudios realizados sin oxigenación, los datos indican que se presenta una disminución de oxígeno; cuando esto sucede, el oxígeno se puede convertir en un factor limitante que enmascara los efectos del contaminante y en algunos casos, aumenta la toxicidad.

La aereación es un problema sin resolver y no se ha llegado a ninguna conclusión, por lo tanto, es necesario reportar los niveles de oxígeno junto con los otros parámetros físico-químicos que inducen al "stress" (temperatura, salinidad, pH, etc.).

Los principales problemas con el petróleo crudo son el tratar de mantener una concentración constante en las cámaras de prueba, y así como los niveles de emulsión y dispersión. La mezcla del petróleo con el agua de mar está relacionada con la energía disponible para mezclarlos, no solo en el momento en que se prepara la dilución, sino también durante su estancia en las cámaras de prueba. Muchas de las discrepancias existentes en las pruebas de toxicidad, puede ser explicadas por no tomar en cuenta las características de la adición, solución, emulsión, dispersión, tamaño de partícula de la emulsión y análisis químico

de la sustancia de prueba.

El equipo seleccionado para cada laboratorio presenta serios problemas, ya sea en pruebas estáticas o de flujo continuo. Las ventajas de las pruebas de flujo continuo son apreciadas cuando se trabaja con materiales solubles; pero los problemas con el petróleo y el dispersante siguen sin resolverse, siendo los principales:

- Poca confiabilidad en la solución y dispersión de la sustancia. El material que es utilizado para construir el equipo puede absorber la sustancia de prueba (los hidrocarburos, pesticidas, etc., son absorbidos por el vidrio, plástico, hule y silicón).

- Debido a la absorción de los hidrocarburos por el plástico, es posible que se liberen productos a las cámaras de prueba, siendo algunos de estos sumamente tóxicos.

- Los cambios de agua, en los equipos de flujo continuo no aseguran la homogeneidad de la sustancia de prueba, debido a los efectos de fricción, remolinos y mezclado ineficiente. Si este es el caso, los organismos podrán seleccionar las áreas del tanque con concentraciones bajas.

En cuanto a la colecta y tratamiento de datos, Sprague (1969), reporta dos procedimientos. En el primero se anota la mortalidad observada en las distintas concentraciones, a intervalos de tiempo fijos (24, 49 y 96 h), y la concentración letal para el 50% de organismos es interpolada de los da

tos. En el segundo método, el tiempo en que muere cada organismo es anotado y el tiempo que toma para obtener el 50% de mortalidad es calculado -- para cada concentración.

La conveniencia de transformar las concentraciones a escala probabilística y el tiempo a -- escala logarítmica, ha sido mostrada por Litchfield (1949), describiendo, como la estadística básica de la línea puede ser obtenida directamente graficando los datos en papel con escala probabilística y logarítmica. Siendo la media,  $\bar{X}$  = al tiempo en el que se obtiene el 50% de mortalidad, y la varianza dada por la función de la pendiente, S.

Siguiendo los lineamientos antes mencionados, el esquema de una investigación para relacionar las pruebas de toxicidad relativa del petróleo crudo y dispersante con las predicciones ecológicas, sería:

- Un bioensayo a corto plazo con una -- sola especie, para estimar  $CL_{50}$ .
- Un bioensayo a corto plazo detallado -- con varias especies (dominante, más abundante, -- etc.).
- Bioensayo a largo plazo o crónico para evaluar efectos subletales.
- Estudios de campo en diferentes comu -- nidades.
- Efecto sobre la composición biótica en

un sistema acuático. Cada uno de los puntos antes mencionados, por sí solo no puede explicar y describir los efectos que el petróleo y los distintos tipos de dispersantes podrían producir sobre la biota.

Las diferentes fuentes de contaminación y las distintas comunidades requieren de investigaciones específicas. Las pruebas de toxicidad aguda no proporcionan información referente a exposiciones continuas de niveles bajos; y las pruebas a largo plazo con una sola especie, tampoco nos brindan información de los efectos que resultan de la competencia interespecífica y de la interacción de comunidades.

Los bioensayos estáticos a corto plazo son relativamente fáciles de conducir y proveen los medios para clasificar al petróleo crudo y al dispersante de acuerdo a su toxicidad. Así mismo estas pruebas son útiles para determinar en que concentraciones deben aplicarse los contaminantes en las pruebas en donde se evalúen efectos subletales. Y más importante aún, decidir que tipo de dispersante no representa riesgos en términos de toxicidad, para el ecosistema en cuestión. Este tipo de información es el que se debe dar al gobierno, compañías petroleras y fabricantes de dispersantes; para controlar los valores relativos o sin riesgos de los materiales utilizados al tratar de controlar la contaminación por petróleo crudo.



## BIBLIOGRAFIA

- Allen, D. y Jones, A., (1974). "Campeche shrimp fishery unit. Fishery description". NOAA, U.S. Dept. of Commerce, Miami, Fla., 56 p.
- American Petroleum Institute, API, (1971). "Development of bioassay procedures for oil and oil dispersant chemical". Contract 212 - B00344, Washington.
- (1973). "Regional survey of marine biota for bioassay standardization of oil and oil dispersant chemicals". Contract 212 - B0034, Washington.
- American Public Health Association, APHA, (1976). "Standard methods for the examination of water and wastewater". New York.
- Anderson, J., Neff, J., Cox, B., Tatem, H. y Hightower, G., (1974). "Characteristics of dispersion and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish." Mar. Biol., 27: 75-88.
- Anderson, J., Neff, J., Cox, B., Tatem, H. y Hightower, G., (1979). "The effects of oil on estuarine animals: toxicity up take and depuration, respiration". In: Pollution and physiology of marine organisms: (Vernberg, J. y Vernberg, B. Ed.). Academic Press, New York: 285-310.
- Baker, J., (1971). "Seasonal effects". In: The ecological effects of oil pollution on littoral communities. (Cowell, B., Ed.). Institute of Petroleum, London: 129-49.

- Bean, R., Vanderhorst, J. y Wilkinson, P., (1974). "Interdisciplinary study of the toxicity -- of petroleum to marine organisms". Pacific Northwest Laboratories, Richland.
- Berridge, S., (1968). "The properties of persistent oil at sea". J. of the Inst. of Petroleum (UK), 54: 300 - 9.
- Blackman, R., Franklin, F., Morton M. y Wilson, K., (1978)". New procedures for the -- toxicity testing of oil slick dispersants in the United Kingdom". Mar. Pollut. -- Bull., 9: 234-38.
- Beynon, T. y Cowell, B. (1974). "Discusión", In: Ecological aspects of toxicity testing of oil and dispersent. (Beynon, T. y Cowell B., Ed.) Applied Science Publisher Ltd., London.
- Botello, A., (1975). "Utilización y degradación del petróleo crudo por dos especies de camarón: Penaeus duorarum y Penaeus aztecus". An. Centro Cienc. del Mar y Limnol., Univ. Nal. Autón. México, 2(1): - 67-72.
- Brown, V., (1973). "Concepts and outlook in testing the toxicity of substances to fish". In : Bioassay techniques and environmental chemistry (Glass, G., Ed.). Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, -- Michigan: 73-76.

- Burdick, G., (1966). "Use of bioassay in determining levels of toxic wastes harmful to aquatic organisms". American Fisheries Society, Spec. Pub. No. 4, Supplement 96 (I).
- Carthy, J. y Arthur, D., (1968). "The biological effects of oil pollution on littoral communities". Suppl. to 2 of "Field studies". Field Studies Council, London.
- Clark, C. y Brown, W., (1977). "Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems". In: Effects of petroleum on Arctic and Subarctic marine environments and organisms (Malins, C., Ed.). Academic Press, Inc, New York: 1-75
- Corner, E., (1978). "Pollution studies with marine plankton, part I: petroleum hydrocarbons and related compounds". Adv. Mar. Biol. 15: 289-380.
- Cox, B., (1974). "Responses of the marine crustaceans Mysidopsis almyra Bowman, Penaeus aztecus Ives and P. setiferus Linn. to petroleum hydrocarbons". Ph.D. Dissertation, Texas A.M. University College Station, Texas.
- Craddock, R., (1977). "Acute toxic effects of petroleum on Arctic and Subarctic marine organisms". In: Effects of petroleum on Arctic and Subarctic marine environments

- and organisms, 2, (Malins, C., Ed.). -  
Academic Press, Inc., New York: 1-94.
- Crapp, G., (1971). "Laboratory experiments with -  
emulsifiers". In: The ecological effects -  
of oil pollution on littoral communities -  
(Cowell, B., Ed.). Institute of Petro -  
leum, London: 129-49.
- Cummings, W., (1961). "Maturation and spawning -  
of the pink shrimp, Penaeus duorarum -  
Burkenroad". Trans. Amer. Fish. Soc.,  
90: 462-468.
- Dobkin, S., (1961). "Early development stages of -  
pink shrimp, Penaeus duorarum, from -  
Florida waters". U.S. Fish Wildl. Serv.,  
Fish. Bull., 61: 321-349.  
-(1970). "Manual de métodos para el es -  
tudio de larvas y primeras postlarvas -  
de camarones y gambas". México. Inst.  
Nal. Invst. Biol. Pesq., Serie Divulga -  
ción. Instructivo (4).
- Boudoroff, P. y Katz, M., (1951). "Bioassay - -  
methods for the evaluation of acute toxic -  
ity of industrial wastes to fish". Sew.  
and Ind. Wastes, 23: (II).
- Eldred, B., (1958). "Observation on the structural - -  
development of the genitalia and the - -  
impregnation of the pink shrimp, Penaeus  
duorarum Burkenroad". Fla. State Bd. -  
Conserv., Tech. Ser., 23.

- Eldred, B., Ingle, M., Woodburn, L., Huton, F. y Jones, H., (1961). "Biological observations on the comercial shrimp, Penaeus duorarum Burkenroad, in Florida waters" Fla. State Bd. Conserv. Prof. Parp. -- Ser. 3: 139.
- Eldred, B., Williams, J., Martin, T. y Joyce, A., (1965). "Seasonal distribution of penaeid larvae and postlarvae of the Tampa Bay área, Florida". Fla. State. Conserv., - Tech. Ser. 44: 47.
- Farrington, J., Teal, J., y Parker. P., (1976). - "Petroleum Hydrocarbons". En: Strate- - gies for marine pollution monitoring - - (Golber, E., Ed.). Wiley Interscience, - New York: 3-34.
- Finney, D., (1964). "Statistical method in biological assay". 2a. ed. Hafner Publ. Company, New York.
- Finney, D., (1971). "Probit analysis". Cambridge - Univ. Press, London.
- Fuentes, D., Castro, R., Scultz, L., Portugal, R. y Oropeza, M., (1976). "Pesquería de camarón de altamar en el Golfo de México". Mem. Simp. Sobre Biol. y Dinam. de Camarones, Guaymas, Son., Mex.: - 187-223.

- Guilles LaRoche, Eisler, R. y Tarzwell, C., (1970). "Bioassay procedures for oil and dispersant toxicity evaluation". J. Wat. Pollut. Control Fed. 42: 1982-89.
- Gunter, G., (1956). "Principles of shrimp fishery -- management". Proc. Gulf Caribbean Fish. Inst., 8th Annu. Sess., :99-106.
- Hart, W., Doudoroff, P. y Greenbank, B., (1945). "The evaluation of the toxicity of industrial wastes, chemicals and other substances to fresh-water fishes". The Atlantic Refining Company, Philadelphia.
- Hazel, C., (1969). "First progress report - Development of testing procedures for evaluating oil spill cleanup agents". State of California, Fish and Game Water Pollution Central Laboratory.
- Higashihara, T. y Sato, A., (1979). "Distribution and abundance of hydrocarbons degrading bacteria in western North Pacific Ocean, Eastern India Ocean and South China Sea". Bull. Jap. Sci. Fish., 45: 473.
- Hildebrand, H., (1954). "A study of the fauna of -- the brown shrimp (Penaeus aztecus Ives) grounds in the western Gulf of México". Publ. Inst. Mar. Sci., Univ. Texas, 3 (2): 231-366.

- (1955). "A study of the fauna of the - - pink shrimp (Penaeus duorarum Burkenroad) grounds in the Gulf of México". Publ. Inst. Mar. Sci., Univ. Texas, 4 (I): 169-232.
- Huet, M., (1965). "Water quality criteria for fish life, biological problems in water - - pollution, Seminar Trans. P.H.S. Publication 999-P-25, Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, Cincinnati.
- Ingle, M., Eldred, B., Jones, H. y Hutton, F., - (1959). "Preliminary analysis of Tortugas shrimp sampling data 1957-58". Fla State Bd. Conserv., Tech. Ser. 32: 45
- Iocaribe, (1980). "Manual de CARIPOL para la vigilancia de la contaminación por petróleo". U.S. Department of Commerce, NOAA, Miami, Florida.
- Johnston, R., (1976). "Marine Pollution". Academic Press Inc., London.
- Jones, C., Dimitriou, E., Ewald, J. y Tweedy, - H., (1964). "Distribution of pink shrimp larvae (Penaeus duorarum Burkenroad) - in water of the Tortugas shelf; Gulf of - México". Inst. Mar. Sci., Univ. Miami.
- Kühl, H. y Mann, H., (1967). "Die Toxizität - - verschiedener Öl Bekämpfungsmittel für -- see- und süss-wassertiere". Helgo. Wiss Meeresunters, 16: 321.

- Litchfield, J. y Wilcoxon, F., (1949). "A Simplified method of evaluating dose-effect experiment". J. Pharm. Exp. Ther., 96: 99--113.
- Laughlin, R., (1979). "A study on the effects of -- salinity and temperature on the disappearance of aromatic hydrocarbons from -- the water soluble fraction of No. 2 Fuel Oil". Chemos., 8: 741.
- Leynaud, (1976) "Efectos tóxicos de la polución en la fauna piscícola". In: La contaminación de las aguas continentales. (Pesson, P. Ed.) Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Lloyd, R., (1965). "Factors that affects the tolerance of fish to heavy metal poisoning, biological problems in water pollution, Seminar Trans., P.H.S. Publication 999-WS-25, - Robert A. Taft Sanitary Engineering - Center, Cincinnati.
- Maciorowski, A., (1980). "Bioassay-procedures and results" Literature review. Journal - - WPCF, 52 (6): 1630-1655.
- Marine Science Institute, (1979). "Final report-Ixtoc I-Chemical characterization and biological effects". Univ. of Texas Port. Aransas
- McLeese, D., (1979). "Structure-lethality relationships for phenols, anilines and other aromatic compounds in shrimp and clams".



Chemos., 8: 53

- Malins, D., (1977). Effects of petroleum on arctic and subarctic marine environments and organisms. Vol. I: Nature and fate of petroleum, Vol. II: Biological effects. Academic Press, Inc., London.
- Marty, D., (1979). "Effects of three oil spill dispersant on marine bacterial populations. Preliminary Study. Quantitative evolution of aerobes". Mar. Pollut. Bull. (G.B.), 10: 285.
- Miles, D., Coing, M. y Brow., L., (1975). "The estimation of the amount of Empire Mix crude oil in mullet, shrimp, and oysters in liquid chromatography". In: Proceedings of 1975 conference on prevention and control of oil pollution. American Petroleum Institute, Washington, D.C.: 149-54.
- Mock, C. y Neal, A., (1974). "Sistemas de cultivo de camarón". Papel presentado a la FAO/CARPAS, Simposium on Aquaculture in Latin America, Montevideo, Uruguay. SE/29: 220-227.
- Neff, F., Cox, B., Dixit, D. y Anderson, J. (1976) "Accumulation and release of petroleum derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals". Mar. Biol.

Numes, P. y Benville, P., (1979). "Effects of the water soluble fraction of Cook Inlet - - crude oil on the marine alga Dunalliella teriolecta". Bull. Environ. Contam. Toxicol., 21: 727.

Programa Coordinado de estudios ecológicos en la sonda de Campeche, (1980). "Informe -- de los trabajos realizados para el control del pozo Ixtoc-1, el combate del -- derrame de petróleo y determinación de sus efectos sobre el ambiente marino". México

Ottway, S., (1971). "The comparative toxicities of crude oil". In: The ecological effects of oil pollution on littoral communities, - - (Cowell, B., Ed.). Institute of Petroleum, London.

Pauley, G., (1975). "Introductory remarks on diseases of crustaceans". MFR Paper 1139. Marine Fisheries Review, 37 (5-6).

Pérez-Farfante, I., (1969). "Western Atlantic - - shrimp of the genus penaeus". U.S. - - Fish and Wildlife Serv., Fish Bull., 67 1-591.

(1970). "Claves ilustradas para la identificación de los camarones marinos comerciales de América Latina". México Inst. Nal. Invest. Biol. Pesq., - Series Divulgación, Instructivo (3):50.

- Pérez, L., (1979). "Enfermedades importantes detectadas en el cultivo de camarón con ambiente controlado en Puerto Peñasco" Memorias del Simposio sobre Biología y Dinámica Poblacional de Camarones, Guaymas, Son., Méx.: 117-124.
- Perkins, E., (1968). "The toxicity of oil emulsifiers to some inshore fauna". The biological effects of oil pollution on littoral communities, 1968 Symp. Proceedings, Field Studies Council, London, 2: 81-90.
- Poliakoff, M., (1969). "Oil dispersing chemicals - A study of the composition, properties and use of chemicals for dispersing oil spills". U.S. Dept. of Int., FWPCA Contract - 14-12-549.
- Rice, L. y Hann, R., (1978). "Comportamiento del Petróleo en el agua". In: Taller internacional sobre métodos para prevenir, disminuir y combatir la polución por barcos en el Caribe. Presentado en Cartagena, Colombia. Texas A & M University.
- Rice, S., Short, J. y Karine, J., (1976). "Toxicity of Cook Inlet crude oil and No. 2 oil to several alaskan marine fish and invertebrates". In: Symposium on sources, effects, and sinks of hydrocarbons in the aquatic environment, AIBS., American University, Washington, D.C.

- Rice, S., Short, J., Broderson, C., Mecklenbur, T., Moles, D., Misch, C., Cheatham, D. y Karine, J., (1975). "Acute toxicity and uptake-depuration studies with Cook Inlet crude oil, Prudhoe Bay crude oil, No. 2 Fuel Oil and several subarctic marine organisms". Northwest and Alaska Fisheries Center, NMFS, NOAA, U.S. Dep. of Commerce, Auke Bay Fisheries Laboratory, Processed Report.
- Rossi, S., y Anderson, J., (1976). "Toxicity of water-soluble fraction of No. 2 Fuel Oil and Louisiana crude oil to selected stages in the life history of the polychaete, Neanthes arenaceodentata". Bull. Environ. Contam. Toxicol., 16: 18-24.
- Rossi, S., Anderson, J. y Ward, G., (1976). "Toxicity of water soluble fractions of four tested oil for the polychaetous annelids, Neanthes arenaceodentata and Capitella capitata". Environ. Pollut., 10: 9-18.
- Schmidt-Bleek, F., y Wagenknecht, P., (1979). "The problem surrounding environmental chemicals prior the passage of a general chemical product control act in the Federal Republic of Germany". Chemos., 8: 583.
- Soto, L., (1979). "Decapod crustacea shelf-fauna of the Campeche banks: fishery aspects and ecology". Contribution 206 from the

Centro de Ciencias del Mar y Limnología, Univ. Nal. Autón. México.

- Smith, A., (1973). "Oil pollution and marine ecology". Plenum Press, New York.
- Smith, J., (1968). "Torrey Canyon, pollution and marine life". Cambridge Univ. Press, London.
- Spooner, M., (1968). "Preliminary work on comparative toxicities of some oil spill dispersant and a few test with oils and Corexit". Marine Biological Laboratory, Plymouth.
- Spooner, M., (1979). "Effects of Kuwait oil on the feeding rates of copepods". Marine Poll Bull. (G.B.), 10: 197.
- Spooner, M. y Corkett, (1979). "A method for testing the toxicity of suspended oil droplets on planktonic copepods used at Plymouth". En: Ecological aspects of toxicity testing of oils and dispersant (Beynon, R. y Cowell, B., ed.), Applied Science Publishers, LTD, London: 69-74.
- Sprague, J., (1969). "Measurement of pollutant toxicity to fish. In: Bioassay methods for acute toxicity". Wat. Res. 3: 793-821.
- Sprague, J., (1973). "The ABC's of pollutant bioassay using fish". En: Biological methods for assessment of water quality.

Am. Soc. Test. Mater., Spec. Tech. --  
 Publ. 528: 6-30.

- Springer, S. y Bullis, R., (1952). "Exploratory -  
 shrimp fishing in the Gulf of Mexico, --  
 1950-51". U.S. Fish Wildl. Serv., Fish.  
Leafl. 406: 1-34.  
 -(1954). "Exploratory shrimp fishing in -  
 the Gulf of México, summary report for -  
 1952-54". Commer. Fish. Rev., 16 (10):  
 1-16.
- Sverdrup, H., (1942). "The oceans; their physics, -  
 chemistry and general biology". Prentice-  
 Hall, Inc.
- Tagatz, M., (1961). "Reduced oxygen tolerance of -  
 petroleum products to juvenil american -  
 shad". Chesapeake Science, 2: 65-71.
- Tatem, H., y Anderson, J., (1973). "The toxicity  
 of four oils to Palaemonetes pugio (Hol-  
 huis) in relation to uptake and retention  
 of specific petroleum hydrocarbons".  
Amer. Zoo., 13: 26.
- Tatem, H., (1977). "Accumulation of naphthalenes -  
 by grass shrimp: Effects on respiration,  
 hatchings and larval growth". In: Fate -  
 and effects of petroleum hydrocarbons --  
 in marine organisms and ecosystems. --  
 Pergamon Press, New York.

Tatem, H., Cox. B. y Anderson, J., (1978). "The toxicity of oils and petroleum hydrocarbons to estuarine crustaceans". Estuarine and Coastal Marine Science, 6: 365--373.

Tokuda, H., (1979). "Fundamental studies on the influence of oil pollution upon marine organisms-IV. The toxicity of mixtures of oil products and oil spill emulsifiers to Phytoplankton". Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45: 289.

United States environmental Protection Agency, EPA, (1978). "Methods for measuring the acute toxicity of effluents to aquatic organisms". 600/4-78-012.

-(1978, a). "First American-Soviet symposium on chemical pollution of the marine environment". 600/9-78-038.

-(1978,b). "Directory of short term test for Health and ecological effects". - - 600/1-78-052.

-(1978, c). "Procedures for evaluation of environmental laboratories". 600/4-78- - 017.

-(1979, a). "Report of the wordshop on biological screening test". 600/9-79-004.

-(1979,b). "Oil pollution abstracts". --  
600/7-79-160.

Ustach, J., (1979). "Effects of sublethal oil concentration on the copepod, Nitocia affinis". Estuaries, 2: 273.

Vanderhorst, J., Gibson, C. y Moore, L., (1976). "Toxicity of No. 2 Fuel Oil to coon - - stripe shrimp". Mar. Pollut. Bull., 7: 106-108.

Vaughan, B., (1973). "Effects of oil and chemically dispersed oil on selected marine biota. - Laboratory Study". American Petroleum Inst. Publ., 4191.

Warner, J., (1976). "Determination of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine orga- - nisms". Anal. Chem., 48: 578-583.

Wishart, J. y Sanders, H., (1955). "Principles and practice of fiel experimentation". Common wealth Agricultural Bureau, London.



## APENDICE

## 1.- GENERALIDADES DEL CAMARON.

Cuando se trabaja con estadíos larvarios de crustáceos, el método más práctico para la obtención de larvas es el de coleccionar hembras de camarón con óvulos maduros, induciendo el desove en el laboratorio. Actualmente existen numerosas -- publicaciones técnicas del cultivo de camarón, y so -- bre todo, métodos específicos para el cultivo de -- larvas.

En México, en la unidad experimental -- de Puerto Peñasco, se utiliza el método desarrollo en los laboratorios de Galveston, E.U. por Mock -- y Neal, (1974). Esta técnica depende de una fuente segura de alga Skeletonema costatum, pudiendo tam -- bién utilizarse Tetraselmis.

Especies.

La pesquería del camarón en el Golfo -- de México ha presentado un desarrollo ascendente -- desde su inicio en 1947, actualmente contribuye a -- la producción nacional con un 45% del total.

Bajo el nombre genérico de camarón, -- en el Golfo de México, se conocen al menos siete -- especies, con sus respectivas denominaciones popu -- lares cuya correspondencia científica es la siguien -- te:

Camarón rosado	<u>Penaeus duorarum</u> Burkenroad
Camarón café	<u>Penaeus aztecus</u> Ives
Camarón blanco	<u>Penaeus setiferus</u> Linnaeus
Camarón de roca o conchudo	<u>Sicyonia brevirostris</u> Stimpson
Camarón siete barbas	<u>Xiphopenaeus kroyeri</u> Heller.
Camarón sintético	<u>Trachypenaeus constrictus</u> Stimpson
Camarón rojo gigante	<u>Humenopenaeus robustus</u> Smith

Esta relación está hecha en orden de importancia de las especies, de tal forma que las tres primeras constituyen el sostén económico de las pesquerías, por su volumen y su valor. (Pérez Farfante, 1970; Allen y Jones, 1974).

#### Ciclo de Vida.

En general, el ciclo de vida del camarón es bastante complejo y presenta diferencias de una especie a otra; por lo que solo se citarán a los Penaeus del Golfo de México.

Los camarones adultos se localizan normalmente en el ambiente marino. Entre los 6 y 3 meses de edad ya están en posibilidad de reproducirse. Para esto el macho adhiere un "paquete" de espermatozoides al vientre de la hembra; la copulación tiene lugar (como en todos los Penaeus con el Tellico complicado) entre un macho con exoesqueleto duro y una hembra con exoesqueleto blando, Eldred

(1958). Las hembras preñadas de Penaeus duorarum duorarum, llevan el espermátforo dentro del receptáculo seminal, los óvulos son fecundados al momento de ser expulsados convirtiéndose en huevos esféricos de tamaño microscópico. El número de huevecillos varía de una especie a otra según el tamaño de las hembras; por ejemplo, una hembra de camarón rosado puede desovar un promedio de  $2 \times 10^5$  huevecillos en un desove. Los huevos permanecen en el fondo y 12 ó 14 h después, de cada uno eclosiona una larva capaz de nadar. Durante los siguientes 15 a 20 días, el nuevo organismo pasa por unos once estadios larvarios: 5 Nauplios de 0.025 mm. (Fig. 5 y 6); 3 Protozoeas de 0.7 a 2.7 mm. (Fig. 7); y 3 Mysis de 2.2 a 4.5 mm (Fig. 8). Posteriormente, se forma una Postlarva (Fig. 9) que entre los 5 y 12 mm sufre modificaciones para dar lugar a un camarón juvenil de 10 a 15 mm que vive en el fondo. (Dobkin, 1970).

En todo este tiempo las distintas larvas son arrastradas por las corrientes desde las áreas de reproducción en alta mar hacia la costa. Aquí y en el interior de las lagunas costeras y desembocadura de ríos, el camarón juvenil crece y aumenta de peso rápidamente, posteriormente emigra mar adentro hacia las zonas donde, ya adulto, cierra su ciclo de vida con una nueva reproducción. (Fig. 10).

Pérez Farfante (1969), da una diagnosis y descripción detallada de la subespecie (Penaeus duorarum duorarum, presenta: ilustraciones; su distribución geográfica y batimétrica; las distintas fases del desarrollo genital en los estadios juveniles

y el tamaño promedio para alcanzar el estadio sub-adulto. Revisa y resume detalles de su ecología, ciclo de vida e importancia comercial.

### Alimento y Alimentación.

La alimentación durante los primeros estadios se hará de acuerdo a la técnica recomendada por Mock, (1974), en estadios posteriores la recomendada por A P H A (1976).

El número de células-alga y Artemia necesarias para el cultivo o crecimiento de una población de camarón, de larvas a postlarvas es la siguiente:

Skeletonema.- Protozoa I: desde las primeras 36 h hasta las 60 h, mantener un nivel mínimo de  $7.5 \times 10^4$  cél/ml; un nivel máximo de  $2.5 \times 10^5$  cél/ml; o un nivel normal de  $1.5 \times 10^5$  cél/ml.

Artemia.- Protozoa III hasta Postlarva IV: mantener un nivel mínimo de 1.0 art/ml; un nivel máximo de 3.5 art/ml; o un nivel normal de 2.5 a 3.0 art/ml; el tamaño aproximado de cada Artemia debe ser entre 140 y 160 micras.

El cultivo de fitoplancton es la parte difícil de la operación, puede ser mantenido, tanto en cultivo continuo, o cosechado y congelado para ser usado en una fecha posterior.

Las algas se dan en la misma concentrau

ción, tanto fresco como congelado; debido a que el medio de cultivo es tóxico para el camarón, debe ser removido, las algas pueden ser concentradas -- por centrifugación.

El camarón juvenil es alimentado con -- pedazos de pescado fresco, almejas o moluscos. La comida seca preparada ha sido utilizada con buenos resultados, aunque es importante conocer la textura adecuada, contenido protéico y digestibilidad de estos alimentos, al igual que su estabilidad en el agua. El uso de conductos de agua cerrados, la recirculación con el removimiento de desechos y la provisión adecuada de alimento y oxígeno son indispensables -- para el crecimiento de postlarvas y juveniles de camarón.

#### Control de Enfermedades.

Si el conteo de células (Skeletonema) -- ayuda en la alimentación, el conteo de larvas tiene un papel importante para alertar al responsable del cultivo de la presencia de enfermedades. Las enfermedades en los cultivos pueden ser tan activas que toda la población del tanque puede desaparecer en -- una noche.

Se debe mantener una vigilancia continúa en el cultivo, y cuando aparezca una enfermedad o anomalía, debe ser notada inmediatamente, evaluada y tomar la decisión adecuada. Si ocurre el -- ataque de una epizootia (enfermedad masiva producida por un patógeno) deben seguirse los siguientes -- pasos: Determinar que provocó la infección; el gra-

do de infección (menos del 5%, no aplicar tratamiento); en que fase está la larva; cuál es la salud de la población en general; y determinar si la infección es una causa secundaria que produce la mortalidad junto con otro problema más importante.

El tratamiento que se recomienda si surgen problemas con patógenos, es la aplicación de VERDE MALAQUITA a una concentración de 0.006 ppm contra Vibro, Lagenidium, o protozoarios ciliados; y a las 24 h hacer un cambio de agua mayor al 50%. Para mayor información consultar: Pauley (1975) y Pérez (1976).

Cuando se desea esterilidad en el cultivo, cheque ésta periódicamente, añadiendo 1 ml de los cultivos-prueba inoculados a tubos con medios para checar esterilidad e incubar en la oscuridad, a la temperatura de prueba, por dos semanas. Si aparece opalescencia en el medio indica la presencia de contaminación. (APHA, 1976).

El medio a prueba es preparado para que cada litro contenga:

Glutamato de Sodio	-----	250 mg
Acetato de Sodio	-----	"
Glicina	-----	"
Sucrosa	-----	"
Lactato de Sodio	-----	"
L y D Alanina	-----	"
Agar Nutriente	-----	50 mg

### Técnicas para el Conteo de Organismos.

La técnica para el conteo de larvas de camarón, de alga Skeletonema, y Artemia salina. consiste de tres muestras tomadas al centro y a los lados de sus recipientes de crecimiento, mediante un tubo de plástico transparente (de diámetro interno 3/8" por 50 cm); la muestra debe ser tomada desde la superficie hasta el fondo, homogenizando la distribución mediante una aereación vigorosa antes de muestrear.

Con larvas de camarón y de Artemia, la muestra es filtrada por un cedazo (malla de 0.18 mm) y se cuentan todas las larvas con ayuda de un microscopio de disección y pipetas capilares. Se recomiendan dos muestreos diarios (08:00 y 16:00), en períodos críticos se debe realizar un tercer muestreo a las 24:00 h. Debido a que las larvas de camarón están mudando de un estadio a otro y sus hábitos cambian, se debe ser constante en el método de muestreo, el lugar utilizado y la hora.

Para determinar la concentración de algas se utiliza una muestra de 90 ml. y es colocada en un vaso de precipitado de 250 ml, se uniforma mediante aereación vigorosa y se toma una alícuota para el conteo con el hemocitómetro.

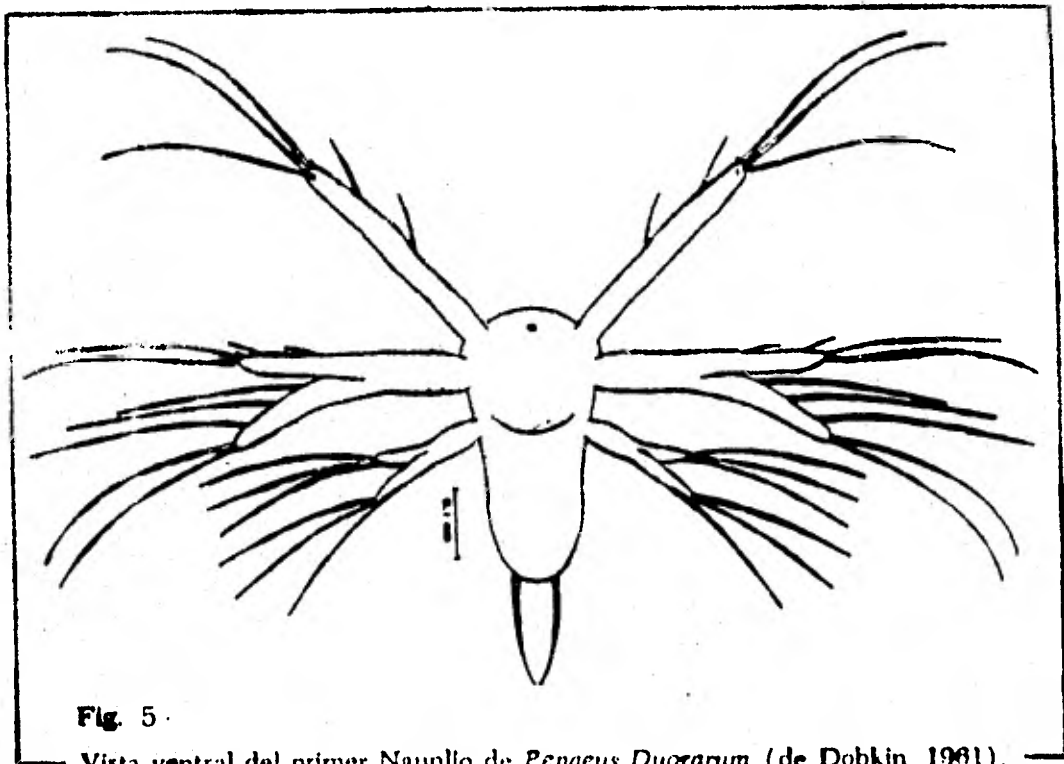


Fig. 5.

Vista ventral del primer Nauplio de *Penaeus Duorarum* (de Dobkin, 1961).

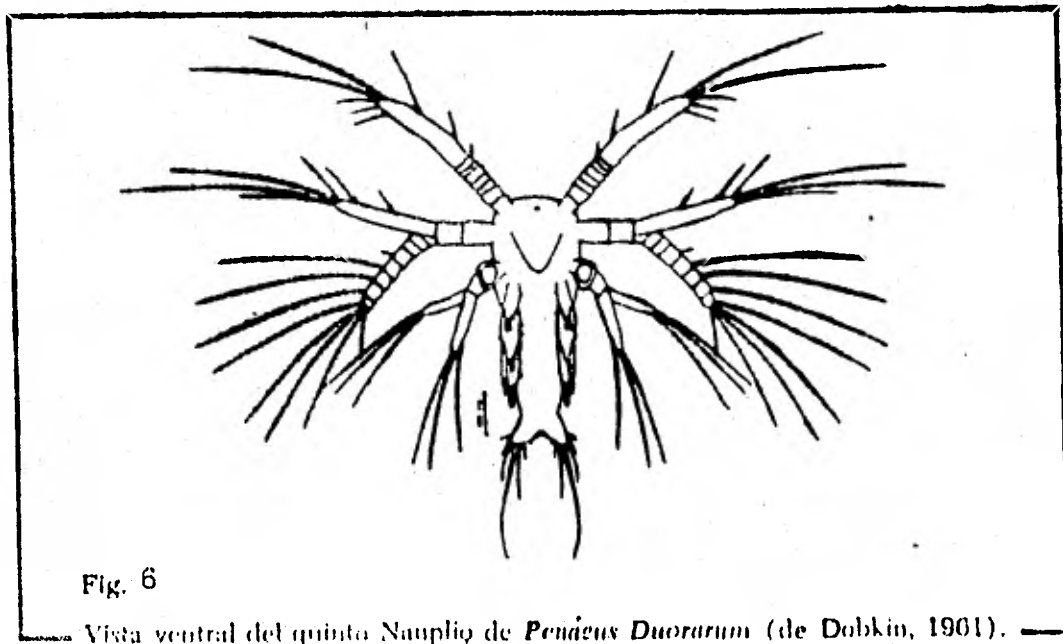


Fig. 6

Vista ventral del quinto Nauplio de *Penaeus Duorarum* (de Dobkin, 1961).



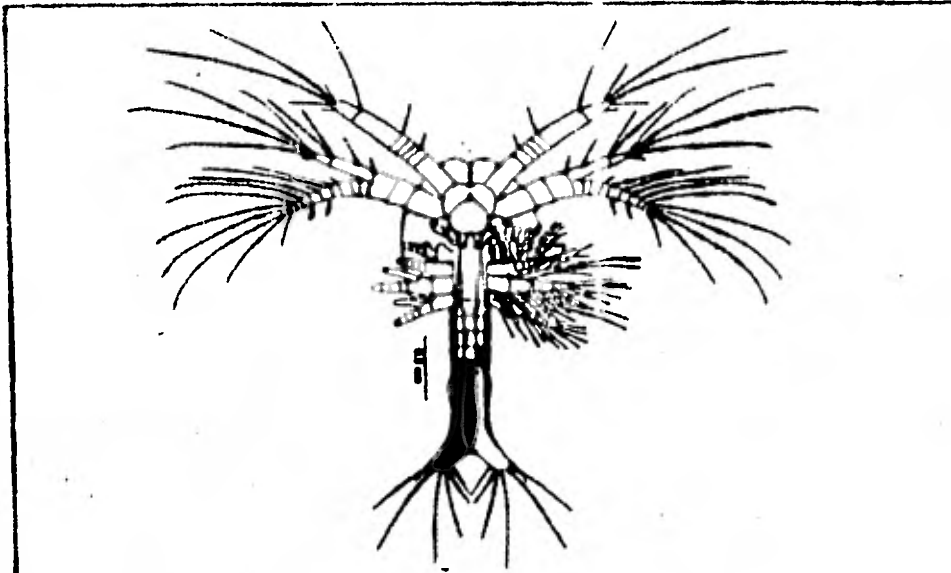


Fig. 7

Vista ventral de la primera Protozoea de *Penaeus duorarum*. En los apéndices torácicos del lado izquierdo se han omitido las setas (de Dobkin, 1961).

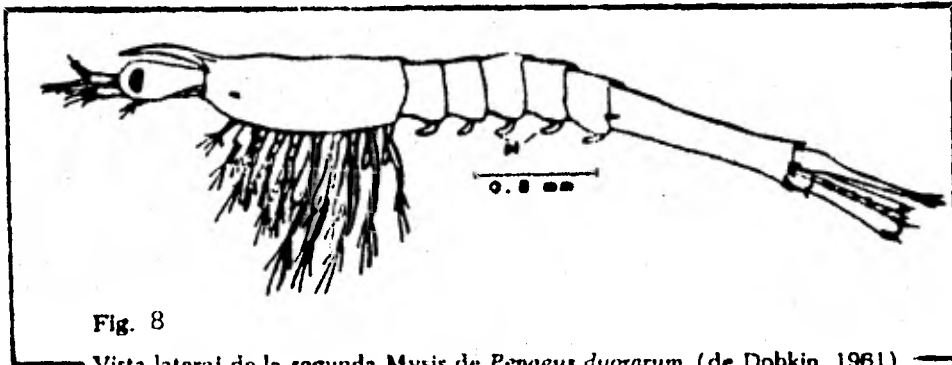


Fig. 8

Vista lateral de la segunda Mysis de *Penaeus duorarum* (de Dobkin, 1961).

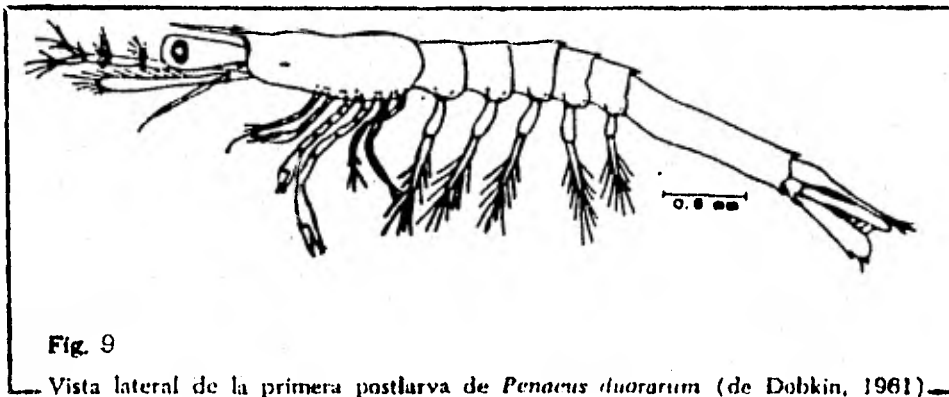


Fig. 9

Vista lateral de la primera postlarva de *Penaeus duorarum* (de Dobkin, 1961).

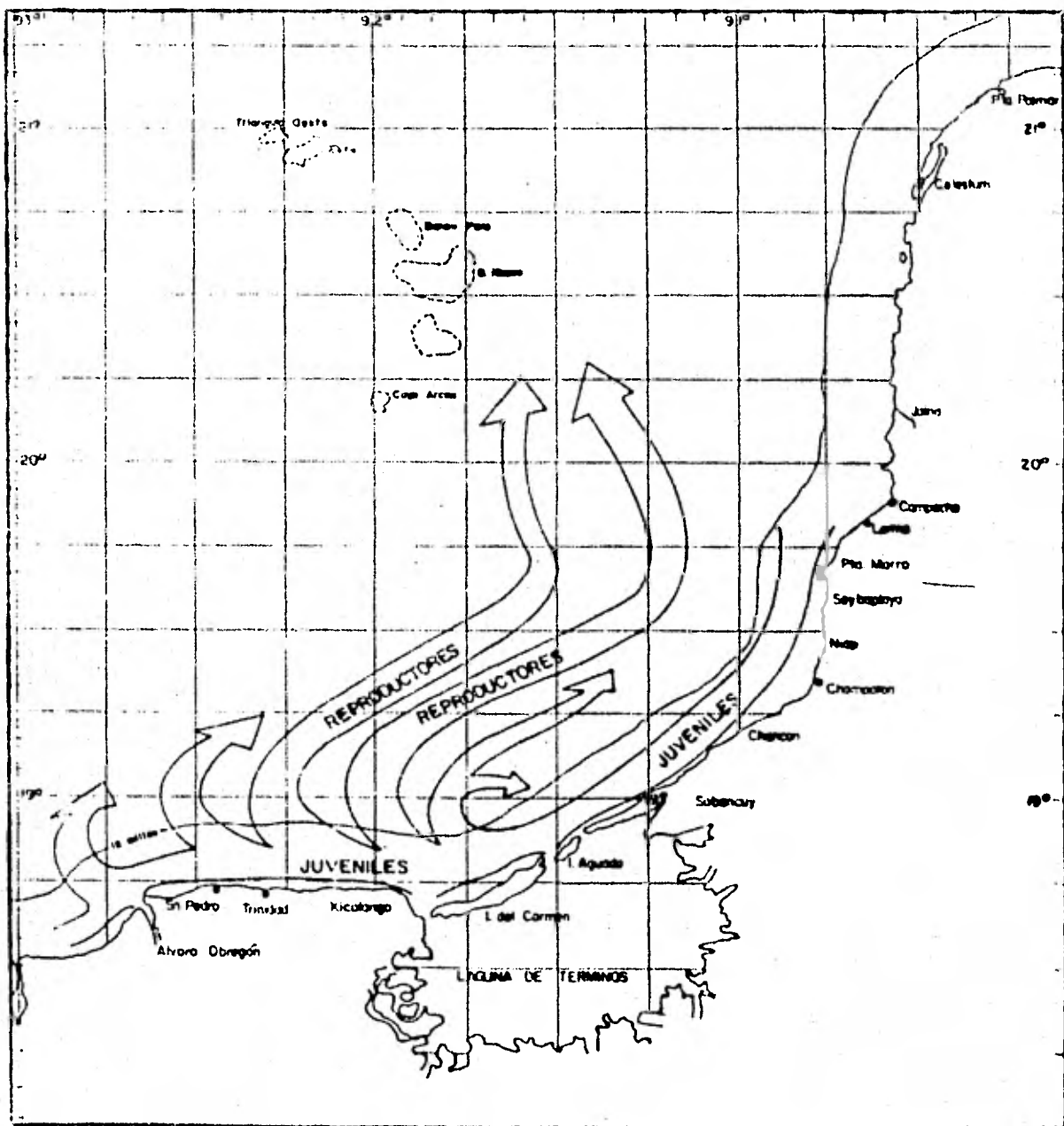


Fig. 10 Patrón general de migración de camarones juveniles y reproductores en el SW del Banco de Campeche

CULTIVO LARVARIO

TABLA DE DATOS No. 1

No. DE HIELERA	FECHA Y HORA	ESPECIE	PESO LONG.	GRADO DE GRAVIDEZ	GRADO DE FERTILIDAD	DESOVE	No. DE HUEVOS	% DE HUEVOS VIABLES	TEM. °C	S. %	O <sub>2</sub> mg/l

CULTIVO LARVARIO

HOJA DE DATOS No. 2

CULTIVO No. \_\_\_\_\_

HEMBRA \_\_\_\_\_

HIELERA \_\_\_\_\_

FECHA \_\_\_\_\_

FUENTE \_\_\_\_\_

NUMERO \_\_\_\_\_

ESPECIE \_\_\_\_\_

TEMP DEL AGUA \_\_\_\_\_

FECHA	HORA	LARVA		ALGA		ALIMENTO			AGUA				OBSERVACIONES	
		FASE	CONTEO	COLOR	CONTEO	TIPO	TANQUE	NIVEL ALIMENTICIO	TEMP °C	NH <sub>3</sub> PPM	pH	S %		

## 2.- COMPORTAMIENTO DEL PETROLEO EN EL AGUA

### Introducción.

"Weathering" y "Fate" son dos términos que se utilizan para expresar cualitativamente la -- idea de los cambios físico químicos que sufren los hidrocarburos del petróleo derramado en el mar. -- Estos cambios se deben a las propiedades del petróleo y a las fuerzas que existen en la naturaleza. El término "weathering" o "intemperismo" se usa para describir varios mecanismos de cambio que actúan en el mar, mientras que "fate" se refiere a la última disposición del petróleo en el ambiente.

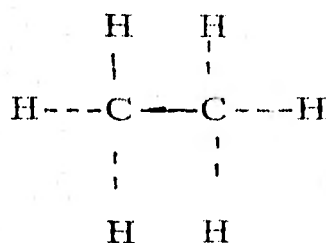
Antes de discutir estos términos, se presentan algunas de las propiedades físicas y químicas del petróleo.

### Química Orgánica.

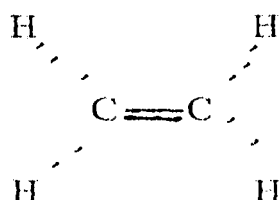
El estudio de la química del petróleo crudo es esencialmente la química de los hidrocarburos puesto que representan el 95% o más del petróleo. Los hidrocarburos son compuestos que contienen únicamente los elementos carbono e hidrógeno. La clasificación y química de los hidrocarburos se basa en la forma de unión de los átomos de carbono e hidrógeno dentro de los compuestos. Los átomos de carbono pueden estar unidos por uno, dos o tres enlaces.

Un hidrocarburo saturado es un compuesto en el cual no hay sino enlaces simples como los

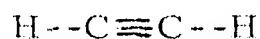
de la molécula de etano. Un hidrocarburo no-saturado tiene por lo menos un enlace doble o triple. El único lugar donde puede ocurrir un enlace doble o triple es entre dos átomos de carbono, dando el etno (etileno) y etino (acetileno).



etano

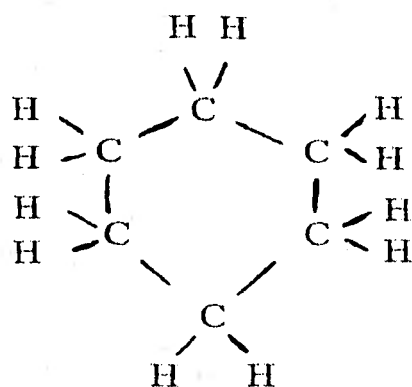


eteno (etileno)

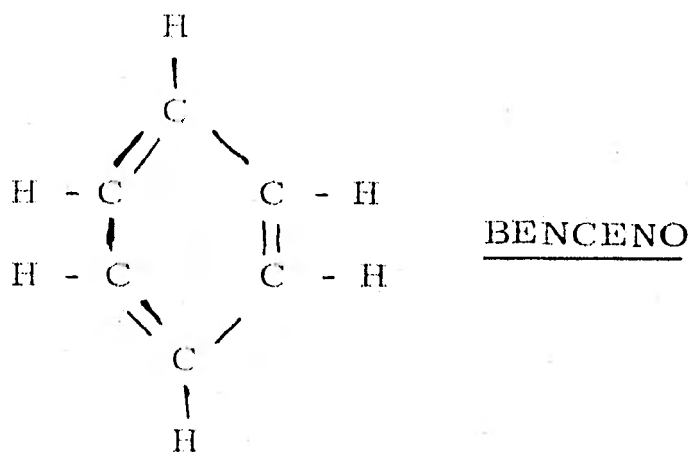


etino(acetileno)

Los hidrocarburos también tienen otras formas que se conocen como hidrocarburos cíclicos y aromáticos. Hidrocarburos cíclicos son cadenas de carbono que forman un anillo que contiene generalmente 4, 5 ó 6 átomos de carbono:

CICLOEXANO

Los otros hidrocarburos en forma de anillo en los cuales hay seis carbonos entre los cuales alternan enlaces dobles y simples, se llaman aromáticos.



### Composición Química del Petróleo.

El petróleo crudo varía en cuanto a su composición, pero consiste principalmente de hidrocarburos y compuestos que además de carbono contiene oxígeno, nitrógeno, azufre y trazas de metales. Los hidrocarburos del petróleo se agrupan en cuatro clases:

Parafinas (alcanos), que son compuestos estables y saturados. No tienen sino enlaces simples que pueden formar cadenas rectas o ramificadas.

Naftenos (ciclo parafinas o ciclo alcanos), estos hidrocarburos están también saturados, pero los extremos de la cadena se unen para formar una

estructura de anillo. Algunos átomos de hidrógeno se pueden reemplazar por otros elementos como nitrógeno, oxígeno o azufre.

Aromáticos, son compuestos cíclicos -- no saturados en cuyos anillos los enlaces dobles -- alternan con enlaces simples. En estos compuestos los hidrógenos pueden ser reemplazados por -- otros elementos como en el caso de los naftenos, o por grupos funcionales. Dos o más moléculas de benceno se pueden unir para formar compuestos multianulares como el naftaleno.

El nombre para este grupo de compuestos aromáticos, se debe al hecho de que tienen -- olor y aroma muy fuerte y característico. Los alifáticos saturados de cadenas rectas prácticamente -- no tienen olor.

Oleofinas, son compuestos no cíclicos y no saturados que contienen por lo menos un enlace doble o triple. Estos pueden formar cadenas rectas o ramificadas y aunque no están presentes en petróleos crudos, si ocurren en los petróleos refinados como producto del proceso de "cracking". La composición "promedio" de un barril de petróleo crudo dividido en las clases de hidrocarburos que se acaban de describir, es la siguiente: Parafinas (alcanos) 30%; Naftenos (cicloalcanos) 50%; aromáticos -- 15%; Nitrógeno Azufre y Oxígeno (NSO) 5%.

El mismo barril de petróleo crudo dividido en sus fracciones más grandes con base en el número de átomos de carbono presentes en las mo-



léculas de cada fracción es: Gasolina ( $C_5 - C_{10}$ ) -- 30%; Keroseno ( $C_{10} - C_{12}$ ) 10%; Aceite Destilado -- Ligero (Light" ( $C_{12} - C_{20}$ ) 15%; Aceite Destilado -- Pesado "Heavy" ( $C_{20} - C_{40}$ ) 25%; Aceite Residual - ( $C_{40}$ ) 20%.

Como se puede observar en la Tabla I, las fracciones con un punto de ebullición más bajo tienen menos átomos de carbono y las fracciones -- con un punto de ebullición más alto tienen más átomos de carbono en la molécula. La tabla muestra un análisis más detallado de petróleo crudo, la estructura química de sus componentes y sus puntos -- de ebullición. La tabla II muestra un método de -- clasificar al petróleo crudo de acuerdo a su composición química.

TABLA I  
PRINCIPALES CONSTITUYENTES DEL PETROLEO CRUDO

FRACCION	COMPOSICION (APROXIMADA)	INTERVALOS DE EBULLICION °C
ETER DE PETROLEO	$C_5 H_{12} - C_6 H_{14}$	20 - 60
LIGHT NAPHTHA	$C_5 H_{14} - C_7 H_{16}$	50 - 100
GASOLINA	$C_5 H_{12} - C_9 H_{20}$	40 - 205
KEROSEN	$C_9 H_{20} - C_{16} H_{34}$	180 - 320
FUEL OIL	$C_{12} H_{32} - C_{20} H_{42}$	300 - 375
ACEITES LUBRICANTES	$C_{20} H_{42} - C_{25} H_{52}$	SOBRE 300
VASELINA	MAS DE $C_{25} H_{52}$	SOBRE 300
PARAFINAS (CERAS)	MAS DE $C_{25} H_{52}$	SOBRE 300
ALQUITRAN	MAS DE $C_{25} H_{52}$	SOBRE 300
COQUE DE PETROLEO	MAS DE $C_{25} H_{52}$	SOBRE 300

## TABLA II

PETROLEO CRUDO DE ACUERDO CON SU COMPOSICION-CLASIFICACION

Parafínico

Nafténico

Parafínico - Nafténico

Parafínico - Nafténico - Aromático

Nafténico - Aromático

Nafténico - Aromático - Asfáltico

Aromático - Asfáltico\*

\* El término Asfáltico se refiere a alquitranes sólidos con un punto de ebullición muy alto, contenidos en petróleos crudos.

### Características Físicas del Petróleo.

El color de los petróleos crudos varía - desde el negro, a través de diferentes matices de - café y verde, hasta amarillo claro. Pudiendo ser - muy pesados y viscosos o claros y volátiles. Las - principales características físicas que se utilizan -- para especificar un petróleo son su densidad relati- va, densidad API "American Petroleum Institute", -- viscosidad, punto de congelación, punto de chispa, - punto de nebulosidad.

Densidad relativa: es la razón de las -- densidades de petróleo y agua, midiéndose estas a -- la misma temperatura:

$$S = \frac{D_{\text{Petróleo}}}{D_{\text{Agua}}}$$

donde S es la densidad relativa; la D densidad, se define como masa por unidad de volumen.

Densidad API: es definida por la siguien- te fórmula:

$$\text{Densidad API} = \frac{141.5}{S_{15.6^{\circ}\text{C}}} - 131.5$$

donde  $S_{15.6^{\circ}\text{C}}$  es la densidad relativa del petróleo a  $15.6^{\circ}\text{C}$ .

Viscosidad: se define como la resisten- cia de un fluido al flujo.

**Viscosidad Absoluta:** es la fuerza requerida para mover una superficie plana de un centímetro cuadrado por encima de otra superficie plana de un centímetro cuadrado a una velocidad de un centímetro por segundo, cuando las dos superficies están separadas por una capa de líquido que tiene un espesor de un centímetro.

**Viscosidad Cinemática:** es la razón de la viscosidad absoluta del petróleo y su gravedad específica a la temperatura a que se determina la viscosidad absoluta.

**Punto de Congelación:** es la temperatura más baja a la cual el petróleo fluye.

**Punto de Chispa:** es la temperatura a la cual el petróleo despidе una cantidad suficiente de vapores para producir una llama pasajera. Esta característica no se debe confundir con el Punto de Encender que es la temperatura a la cual el petróleo sigue ardiendo. El punto de encender corresponde a una temperatura que es 70°C más alta que la del punto de chispa.

**Punto de Nebulación:** es la temperatura a la cual las parafinas de un petróleo que normalmente están disueltas se empiezan a cristalizar. Al formarse los cristales el petróleo se vuelve nublado.

**Contenido de Ceniza:** es la cantidad de material no combustible en un petróleo.

Cada una de estas propiedades describe y clasifica al petróleo. El sistema más extensamente usado para clasificar petróleo crudo es el de señalar el lugar del cual provienen, por ejemplo, si se refiere a un petróleo como "Louisiana Light" (Louisiana Liviano), este petróleo viene de un campo petrolero del Sur de Louisiana. Las propiedades físicas y químicas de la mayoría de los petróleos crudos, registrados con su nombre de origen, han sido catalogados y pueden encontrarse en muchas publicaciones.

#### Ultima Disposición y Comportamiento del Petróleo Derramado.

A lo largo de playas y costas de casi cualquier área del mundo, se pueden encontrar bolas negras de alquitrán y capas de petróleo espeso y viscoso. Estos son los productos finales de un proceso natural llamado en inglés "weathering" o in temperismo. Las etapas principales en este proceso, en su orden de ocurrencia, son: esparcimiento, evaporación, solución, emulsificación, degradación microbiológica, hundimiento y nueva subida a la superficie.

Esparcimiento: este proceso ocurre rápidamente en un principio y resulta en la formación de una película cuyo espesor puede variar de 0.001 mm sobre agua de mar limpia a 1.0 mm sobre aguas contaminadas. La velocidad de esparcimiento depende tanto de las características del petróleo derramado como de las condiciones de viento, corrientes y otros factores ambientales.

Evaporación: es el proceso durante el cual los compuestos de bajo peso molecular, con puntos de ebullición relativamente bajos, se volatilizan y pasan a la atmósfera. La velocidad de este proceso es controlado por muchos parámetros ambientales como la velocidad del viento, viscosidad y composición del petróleo, y su presión de vapor. Cuanto más grande es la razón y extensión del esparcimiento, tanto más grande es la razón de evaporación.

Experimentos simulados de evaporación indican que todos los hidrocarburos que contienen menos de 15 átomos de carbono en la molécula (punto de ebullición de  $250^{\circ}\text{C}$ ) se volatilizarán de la superficie del océano en diez días. Los hidrocarburos entre 15 - 25 átomos de carbono (punto de ebullición  $250 - 400^{\circ}\text{C}$ ) muestran una volatilidad más bien limitada y la fracción que hierve sobre  $400^{\circ}\text{C}$  ( $\text{C}_{25}$  ó más) no muestran casi ninguna volatilidad.

Solución: es otro proceso físico en el cual los hidrocarburos de un bajo peso molecular y algunos de los compuestos polares se pierden del petróleo y pasan al agua debajo de la película; la razón de este proceso es controlada por muchos parámetros como el tipo de petróleo, su viscosidad, las condiciones del viento y del mar, el grado de oxidación que ha sufrido el petróleo antes, durante y después del derrame, y el tiempo que ha pasado después del derrame. Aunque este proceso empieza inmediatamente, es un proceso a largo plazo y continua durante el intemperismo debido a que la autooxidación y los procesos biológicos de degrada-

ción producen continuamente nuevos compuestos polares que se disuelven en el agua. La solubilidad de las fracciones del petróleo en el agua disminuye al aumentar el número de átomos de carbono en la molécula. La tabla muestra el efecto del aumento de carbono.

Solubilidad de los Hidrocarburos en la Agua Destilada

Alcanos Concentración (ppm)

C <sub>5</sub>	40
C <sub>6</sub>	10
C <sub>7</sub>	3
C <sub>8</sub>	1
C <sub>12</sub>	0.01
C <sub>30</sub>	0.002

Aromáticos

C <sub>6</sub>	1800
C <sub>7</sub>	500
C <sub>8</sub>	175
C <sub>9</sub>	50
C <sub>14</sub>	0.075
C <sub>18</sub>	0.002

las solubilidades en agua de mar son menores en un 12 ó 30% en comparación a las del agua destilada.



El efecto de la solución es muy semejante al que produce la evaporación. Los compuestos de cadena corta y de menor número de átomos de carbono en la molécula, son los que más rápidamente se pierden en comparación con las moléculas pesadas. Este aumento causará un aumento en la viscosidad, gravedad específica y otras características del petróleo.

Emulsión: es otro factor que ayuda la dispersión del petróleo, la emulsión es el proceso en el cual un líquido se dispersa en otro líquido en forma de gotas microscópicas. La emulsión puede ser agua dispersada en petróleo, llamada emulsión agua en petróleo, o petróleo dispersado en agua, llamada emulsión petróleo en agua. Las emulsiones petróleo en agua se pueden dispersar muy fácilmente por corrientes y condiciones turbulentas en la superficie del mar. Las emulsiones agua en aceite se pueden formar, particularmente de petróleos crudos asfálticos. Estas emulsiones toman la forma de trozos semisólidos a los cuales se les llama "mousse de chocolate". Se ha sugerido que estos trozos pueden haber sido el origen del alquitrán en playas "beach tar" y pelotas de alquitrán. La razón de que se formen las emulsiones agua en petróleo depende de la naturaleza del petróleo. En experimentos, algunos petróleos crudos han incorporado agua correspondiente al 50% por volumen en 2 a 4 hrs., mientras que otros petróleos necesitan de 7 a 8 días para incorporar la misma cantidad de agua. El destino final "fate" de las emulsiones petróleo en agua depende de su solubilidad en el agua, de su asociación con partículas de materia suspendida y a la degradación microbio-

biológica.

Fotooxidación: es una reacción catalizada por la luz solar en la cual ciertos hidrocarburos reaccionan con el oxígeno de la atmósfera para formar varios derivados de hidrocarburos que contienen oxígeno. Estos derivados son casi en su totalidad compuestos polares, lo que quiere decir que son mucho más solubles en agua. Los rayos ultravioleta de la luz solar son la fuente principal de la energía de auto-oxidación. La fotólisis teóricamente podría eliminar el petróleo de la superficie del agua en una semana.

Degradación Microbiana: es un proceso complejo, en el cual ciertas bacterias, actinomicetos, hongos filamentosos y levaduras utilizan a los hidrocarburos oxidándolos. Hay dos tipos principales de oxidación microbiana; Primero cuando el oxígeno se encuentra en el agua, los aereóbicos oxidan a los hidrocarburos. En la superficie hay suficiente oxígeno para causar la máxima degradación biológica. Cuando la degradación se lleva a cabo a cierta profundidad o en el fondo, la baja concentración de oxígeno limita el proceso aeróbico, predominando el segundo método de degradación, el anaeróbico, en el cual se utilizan a los compuestos nitrogenados y sulfurosos. Este tipo es bastante común en sedimentos de bahías donde hay poca mezcla del agua del fondo con la de la superficie. El resultado de la degradación microbiológica es convertir biológicamente, los hidrocarburos en una masa micróbica.

Los procesos finales de hundimiento y

nueva salida a la superficie, son el resultado de la combinación de los otros procesos del intemperismo. La evaporación, solución y oxidación tienden a eliminar las fracciones ligeras y menos viscosas, lo que resulta en un residuo denso. Al aumentar la densidad del residuo éste finalmente se hunde y se asienta en el fondo. En áreas donde el sedimento se encuentra en suspensión por escurrimiento de tierra o la acción de olas, el petróleo cubre a veces estas partículas suspendidas. Este material cubierto con petróleo es más pesado que el agua y se precipita al fondo. En el fondo, la oxidación aeróbica o anaeróbica empieza. Si la densidad del residuo en el fondo disminuye lo suficiente por la degradación, el residuo puede volverse menos denso que el agua y subir a la superficie. El ciclo de hundimiento y subida a la superficie puede continuar hasta que el petróleo haya sido completamente degradado o haya llegado a una costa. (Rice y Hann, 1978).

### Metabolismo.

La presencia de hidrocarburos no biogénicos en los tejidos de organismos como peces, crustáceos y moluscos, los enfrenta a problemas fisiológicos. Las enzimas metabólicas responsables de la oxidación de compuestos extraños son conocidas como oxidasas de funciones mixtas (OFM) que han sido descritas in vitro en algunos mamíferos, insectos, invertebrados de agua dulce y en peces marinos y de agua dulce. Los productos oxidados por las OFM, son más polares que el sustrato lipídico en que se encuentran y pueden ser eliminados

del cuerpo por difusión a través de las membranas en conjugación con compuestos del citoplasma, para ser excretados, (Burns, 1976).

La degradación de hidrocarburos saturados es conocida en relación con el metabolismo de los ácidos grasos en algunos invertebrados y peces (Blumer y Thomas, 1965; Lee et al. 1972; Vázquez 1975; Farrington, 1978).

En algunos peces o invertebrados se han detectado vías metabólicas para la oxidación de ciertos hidrocarburos aromáticos que involucran la enzima aril-hidrocarburo-hidroxilasa, formada en los microsomas de las células del hígado de vertebrados y en órganos homólogos de invertebrados (hepatopaneas) (Lee et al., 1972; Malins, 1977).

### 3. - DISPERSANTES .

En derrames de petróleo crudo es común el uso de dispersantes, los cuales generalmente están compuestos por un surfactante mezclado con un solvente (constituido por hidrocarburos) y algunas veces con estabilizadores.

El "BP1002", fue uno de los primeros dispersantes que apareció en el mercado, está compuesto de un 12% de alquifenol etoxilado, disuelto en un solvente compuesto por hidrocarburos aromáticos (60 ó 70%), más 3% del ácido graso etanolamida como estabilizador. Aunque la mayoría de los dispersantes registrados presentan un solvente constituido por hidrocarburos, algunos otros solo contienen uno con gran solubilidad en agua como es el alcohol isopropílico; el "Dispersol OS" es un ejemplo de este tipo, en el cual el 10% de compuestos no-iónicos polioxietilenados están disueltos en el isopropanol.

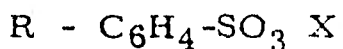
Los surfactantes tienen la cualidad de modificar la tensión superficial de los líquidos en los cuales se disuelven y como consecuencia, la tensión interfacial entre el disolvente del tensoactivo y el material suspendido. La modificación en la tensión superficial e interfacial, es la que produce los fenómenos de: humectación (el esparcimiento de agua sobre la superficie sólida); emulsificación (la penetración de la fase en otro líquido no soluble en agua); suspensión (el englobamiento de partículas sólidas por una capa de moléculas orientadas); y detergentencia (como resultado conjunto de los fenómenos anteriores).

Las moléculas de los productos tensoac-  
tivos pueden disociarse en el agua, denominándose -  
iónicos, y pueden ser no disociables denominándose  
surfactantes no-iónicos. Los surfactantes iónicos -  
están constituidos por una parte orgánica de alto --  
peso equivalente y una inorgánica u orgánica de ba-  
jo peso equivalente, que al disociarse se separan -  
produciendo radicales con diferentes carga eléctrica.  
Cuando la carga del radical orgánico de alto peso -  
equivalente, que es la parte hidrofóbica de la molé-  
cula, es negativa, el compuesto se denomina "anió-  
nico" y cuando es positiva "catiónico".

Surfactantes Aniónicos: constituyen un --  
grupo ampliamente utilizado en los detergentes do--  
mésticos. Los dispersantes inicialmente contenían  
alquil bencen sulfonato, en la actualidad los más uti-  
lizados contienen en diferentes porcentaje los siguien-  
tes compuestos:



Alquil Sulfatos



Alquil Aril Sulfonatos

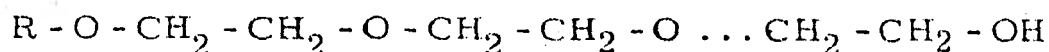
En donde R representa un radical alquili-  
co y X un neutralizante alcalino. El anión es el --  
surfactante.

Surfactantes Catiónicos: el catión es el -  
surfactante y está basado en alquilaminas y estruc-  
turas piridin. No son utilizados en los dispersan-  
tes debido a que presentan menor actividad superfi-  
cial.

Superfactantes No-Iónicos: los más utili-

zados como dispersantes son los obtenidos por condensación de cadenas largas de alquil alcoholes y - alquil fenoles con óxido de etileno.

El óxido de etileno es un compuesto petroquímico, de fórmula  $C_2H_4O$  altamente reactivo, - que se combina en condiciones especiales con los - compuestos que disponen de hidroxilos activos como los alquil fenoles, los alcoholes grasos y los ácidos grasos para formar amplias series de productos, - cuyas propiedades varían de acuerdo al compuesto - inicial y al número de moles de óxido de etileno -- que se combinan con él, para producir alcoholes po- lieterificados con fórmula:



#### Compuestos Polioxietilenados.

En donde R es un radical alquil fenol, alcohol graso, ácido graso, etc. Considerando como parte hidrofóbica de la molécula el radical inicial, y - - como hidrofílica a la cadena formada por el óxido - de etileno. Debido a la presencia de ambos grupos en la molécula del surfactante, este se orienta en - la interfase de petróleo-agua con el grupo lipofílico hacia el petróleo y el hidrofílico hacia el agua, pro- duciendo gotas de petróleo cuando se mezclan.

Los dispersantes pueden emplear un sol-  
vente miscible en agua con un surfactante compati-  
ble con ella, o un solvente compuesto de hidrocarburo  
s con un surfactante compatible con el petróleo. -  
En el primer caso, se producen pequeñas gotas de-

petróleo cuando el contacto es máximo y existe energía mezcladora. En el segundo caso, para una dispersión activa el material necesita ser esparcido sin diluir sobre la capa de petróleo, y la función del solvente es facilitar la distribución del surfactante; si este es previamente mezclado con el agua, se forma una dispersión solvente en agua y es difícil que el surfactante se transfiera de esta localización, termodinámicamente estable, a la interfase de petróleo en agua.

La prevención de coalescencia de las gotas de petróleo o sea, la estabilidad de la emulsión del petróleo en agua es debida al balance entre las características lipofílicas e hidrofílicas, y a la resistencia de primera a la remoción de la molécula-surfactante de la gota de petróleo dispersa en el agua. Este efecto de estabilidad puede ayudar a minimizar la adhesión de gotas de petróleo dispersas a superficies, mientras que el aumento de la interfase petróleo agua incrementa la velocidad de degradación del petróleo.

La relación de estructura química y toxicidad de los dispersantes con surfactantes basados en la condensación de óxido de etileno, ha sido atribuida al grado de polimerización. La toxicidad intrínseca es atribuida al radical alquil fenol y a la acción diluyente de la cadena polioxietilenada, entre más larga es la cadena menor es la toxicidad.

Al examinar la toxicidad relacionada con el solvente, se ha observado que las concentraciones de las que se obtiene un efecto letal medio son:



"BP 1002" 6 ppm (constituido por hidrocarburos - - aromáticos en un 60 ó 70%); "BP 1100" 3300 ppm, esto se debe al tipo de solvente no aromático; "Co-rexit y Dispersol" 3300 ppm, están basados en hi--drocarburos alifáticos o en vehículos miscibles en - agua como el alcohol isopropílico. Dodd, (1974).