

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

“DETERMINACION DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LA FRACCION
SOLUBLE DE COMBUSTOLEO SOBRE ALCUNOS ESTADIOS DEL
CAMARON AZUL Penaeus stuiirostris (STIMPSON)”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA:
RAMON ALBERTO NENNINGER CHECK CINCO

ENSENADA, B. C., JUNIO DE 1986.

BIBLIOTECA CENTRAL ENSENADA


RESUMEN

Se realizaron bioensayos estáticos con medio renovable con el fin de evaluar la toxicidad aguda del combustóleo sobre algunos estadios larvales y postlarvales de Camarón Azul *Penaeus stylirostris*. Se utilizó la Fracción Soluble de Combustóleo en agua de mar (solución FSC) con diferentes concentraciones (volumen/volumen) y se determinó la concentración del hidrocarburo aromático naftaleno por Espectrometría de Ultravioleta. Se calcularon las Dosis Letales Medias (DL 50) por medio del Análisis Probit. Las DL 50 para el estadio nauplio a la 36 horas se determinó al 75.8 % de concentración del contaminante (sol. FSC) (v/v) y 0.44 ppm de naftaleno; para el estadio protozoa a las 18 horas a 58.8 % y 0.23 ppm de naftaleno. Para postlarvas a las 48 horas no se alcanzó la letalidad media por lo que se calculó la DL 16 en 35.5 %. Se estableció amplias diferencias en sensibilidad entre los tres estadios probados resultando protozoa el estadio más sensible y las postlarvas las más tolerantes. Estas constituyen las primeras pruebas de toxicidad de este contaminante que se efectúan con poblaciones de camarón originarias del Golfo de California.

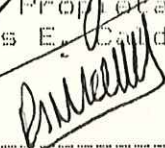
DETERMINACION DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LA FRACCION
SOLUBLE DE COMBUSTOLEO SOBRE ALGUNOS ESTADIOS DEL CAMARON
AZUL Penaeus stylirostris (STIMPSON)


T E S I S
QUE PRESENTA:
RAMON ALBERTO NENNINGER CHECK CINCO

Aprobada por:


Presidente del jurado
M.C. Gilberto Gaxiola C.


Sinodal Propietario
M.C. Luis E. Calderón A.


Sinodal Suplente
M.C. Jesús Paniagua M.


Sinodal Propietario
Dc. Roberto Inclán R.


Sinodal Suplente
M.C. Roberto Millán N.

AGRADECIMIENTOS

Deseo hacer patente mi agradecimiento al M. en C. Luis Eduardo Calderón Aguilera por la dirección de este trabajo, por sus enseñanzas desinteresadas y por brindar su confianza y apoyo para mi participación en el proyecto: Efectos del Petróleo sobre algunas especies de importancia comercial del Golfo de California.

Al M. en C. Gilberto Gaxiola Castro por la codirección de esta tesis, por dedicarme en tantas ocasiones su tiempo y en general por todas sus atenciones.

A la comisión de tesis: Roberto Millán N., Roberto Inclán R., y Jesús Paniagua M. por sus correcciones.

Al Maestro Walter Dionni G. y al M. en C. Jacobo Sánchez M. por sus sugerencias y correcciones al trabajo.

Al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS), a su director Dr. Enrique Ramos S. y con especial cariño a mis amigos de la UEP quienes me brindaron su ayuda, amistad y compañía.

A los químicos Fernanda Bernal D., Lorena Bringas A., Noheми Games M., y Felipe Castellón B. por su asesoría.

Al Ing. León Armando Pérez A. por sus pláticas constructivas y por el material bibliográfico.

Al Dr. Motomichi Inohue por permitirme utilizar el equipo del Centro de Investigaciones sobre Polímeros y Materiales de la UNISON.

Finalmente a todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis y que han escapado de mi mente al escribir estas líneas.

a todos ellos GRACIAS.

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO CON PROFUNDO
CARINO Y RESPETO A MI PADRE Y HERMANOS:

JESUS HECTOR,

ANA LILIA,

LETICIA FRANCISCA

Y MARIA ELSA

A MI MADRE QUIEN SIEMPRE HA SOSTENIDO SU FE
EN MI Y ME HA BRINDADO SU APOYO ETERNAMENTE,

Y CON AMOR Y AMISTAD A PATRICIA.

INDICE

	Página
1.- INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes	5
1.2 Objetivo	8
2.- MATERIALES Y METODOS	9
2.1 Obtención de los organismos de prueba	9
2.2 Obtención de la solución de prueba	10
2.3 Análisis químico de la solución de prueba	11
2.4 Bioensayos	12
2.5 Análisis estadístico	16
3.- RESULTADOS	19
3.1 Análisis de la solución FSC	19
3.2 Resultados del estadio nauplio	22
3.3 Resultados del estadio protozoa	29
3.4 Resultados de postlarvas	36
3.5 Dosis Letales e Indices de Toxicidad	41
4.- DISCUSION	43
5.- CONCLUSIONES	56
6.- RECOMENDACIONES	57
LITERATURA CITADA	58
APENDICES	71

LISTA DE TABLAS

	Página
I.- Concentraciones de Naftaleno (ppm) de las soluciones FSC determinadas por Espectrometría de Ultravioleta	21
II.- Mortalidad (%) de estadio nauplio expuesto por 36 hrs. a la FSC en medio renovable.	24
III.- Ecuaciones de regresión (log. de la concentración vs. mortalidad en unidades Probit) (Método de Máxima Probabilidad) y Análisis de Covarianza de las pendientes (b).	27
IV.- Mortalidad (%) del estadio protozoa expuesto por 36 hrs. a la FSC en medio renovable.	32
V.- Mortalidad (%) de postlarvas expuestas por 48 hrs. a la FSC en medio renovable.	38
VI.- Regresión Lineal Simple de estadio postlarva y Dosis Letales 16 a 48 hrs. con sus límites de confianza (Ls. y Li.) al 95 %.	40
VII.- Dosis Letales Medias (DL 50) e Índices de Toxicidad (IT) con sus límites de confianza (Ls. y Li.) al 95 %.	
a) FSC b) naftaleno	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
1.- Diagrama de flujo de los bioensayos para los estadios larvarios nauplio y protozoa y las postlarvas.	13
2.- Espectros de Absorbancia a) solución FSC b) Naftaleno c) Combustóleo	20
3.- Bioensayo estático preliminar de 24 hrs. de exposición a la FSC de los estadios nauplio (N) y postlarva (PL).	23
4.- Curva de Toxicidad estadio nauplio expuesto a la FSC en medio renovable.	25
5.- Rectas ajustadas por Análisis Probit de los bioensayos 2, 3 y 4 del estadio nauplio expuesto a la FSC por 36 hrs.	28
6.- Recta ajustada de los bioensayos 2, 3 y 4 del estadio nauplio expuesto a la FSC por 36 hrs.	30
7.- Bioensayo estático preliminar de 24 hrs. de exposición a la FSC del estadio protozoa.	31
8.- Curva de toxicidad del estadio protozoa, expuesta a la FSC en medio renovable.	34
9.- Rectas ajustadas por Análisis Probit de los bioensayos 1, 3 y 4 del estadio protozoa expuesto a la FSC por 18 hrs.	35
10.- Recta ajustada de los bioensayos 1, 3 y 4 del estadio protozoa expuesto a la FSC por 18 hrs.	37

1.- INTRODUCCION

Mientras mayor es la utilización del petróleo, mayor resulta también los desechos que penetran al medio ambiente acuático. La concentración de hidrocarburos de petróleo en áreas marinas fluctúa entre valores de 10 a 100 ppb. Los niveles más altos de hidrocarburos se encuentran precisamente en estuarios y habitats intermareales (Neff et al., 1976; Clark y MacLeod, 1977 citado por Connell y Miller, 1984). Los hidrocarburos se presentan en la columna de agua con mayor abundancia en los sedimentos (Botello, 1979 a y b; Botello, 1980; Salas, 1984), donde pueden alcanzar altas concentraciones en el orden de partes por millón (Galindo, 1986).

El Combustible Pesado (CoPe), el Diesel y la gasolina Nova son los tres aceites mas utilizados en el estado de Sonora (datos de Superintendencia de Transportación Maritima de PEMEX). En ciertas áreas costeras como la bahía de Guaymas, la mayor contaminación por aceites durante el verano coincide con la mayor utilización del CoPe por la industria eléctrica y de transformación. También se ha observado que la mayor concentración de hidrocarburos en las dársenas portuarias se encuentra en

areas donde se manejan estos aceites (Salas, 1984; Calderón-Aguilera, 1985; Galindo, 1986).

El efecto de los hidrocarburos de petróleo sobre invertebrados marinos, depende de diversos factores como el grupo zoológico, los estadios de desarrollo, el estado patológico, el tiempo y la frecuencia de exposición, la exposición simultánea a más de un tóxico, los efectos sinérgicos, antagónicos y las diferencias en sensibilidad intra e interespecificas (Rice et al., 1974; Tatem, 1974; Connell y Miller, 1984).

Miller (1982 citado por Connell y Miller, 1984) ha sintetizado un rango de respuestas de organismos marinos a concentraciones de hidrocarburos disueltos en agua de mar: en concentraciones de 0 a 10 ppb algunos organismos presentan bioacumulación de hidrocarburos en los tejidos; entre 10 y 100 ppb hay alteraciones de comportamiento como afectaciones en la percepción, apareamiento, migración, búsqueda de alimento, etc.; de 100 a 1000 ppb alteraciones de metabolismo repercutiendo en las funciones reproductivas y de crecimiento; de 1000 a 10 000 ppb letalidad en estadios larvarios y juveniles, y en el extremo del rango letalidad en organismos adultos.

La información sobre el impacto ecológico de los

hidrocarburos de petróleo procede básicamente de dos fuentes:

- a) de observaciones de campo que frecuentemente se realizan para describir los efectos causados por algún derrame de petróleo y
- b) de estudios de experimentos de bioensayos (dosis-respuesta) donde se seleccionan los organismos y las condiciones experimentales (APHA, 1975; Connell y Miller, 1984).

Los bioensayos son el método más utilizado para evaluar las respuestas de algún organismo ante alguna sustancia tóxica, desechos o factores ambientales. El parámetro que se determina generalmente es la toxicidad aguda. Se estima la concentración de una sustancia tóxica que permite la sobrevivencia del 50 % de los organismos expuestos después de un cierto periodo de tiempo. Se expresa como Concentración Letal Media (CL 50), Dosis Letal Media (DL 50) o Limite de Tolerancia Media (LT m) (EPA, 1973; APHA, 1975).

En los bioensayos donde se estima la toxicidad del petróleo crudo o de aceites refinados se presentan algunos problemas que dificultan la comparación de resultados (Rice et al., 1974; Neff et al., 1976). Estos compuestos portan una gran cantidad de hidrocarburos entre alifáticos y aromáticos. En un aceite crudo se han identificado mas de 200

elementos (Anderson et al., 1974 a). Se ha evaluado la toxicidad de diversos aceites dependiendo del interés del investigador generando una gran cantidad de datos que difícilmente son comparables. A partir de 1970 se desarrollaron técnicas analíticas para cuantificar hidrocarburos para este tipo de estudios (Vaughan, 1973; Rice et al., 1974; Carlberg, 1975; ASTM, 1978). Estas técnicas como espectrofotometría de infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), fluorescencia y las diversas cromatografías varían en precisión, complejidad y costos de operación. Esto ha provocado que las DL 50 se reporten de diversas formas: como concentración de hidrocarburos totales (HT), de fracciones aromáticas (HA) o como el volumen de aceite añadido al medio de prueba (Anderson et al., 1974 a; Neff et al., 1976; Tatem et al., 1978; Perez et al., 1982).

El camarón es uno de los recursos pesqueros más importantes para México y el azul *Penaeus stylirostris* es importante para el Golfo de California por su volumen de captura y su talla (Rodríguez de la Cruz y Rosales, 1977; Rodríguez de la Cruz, 1981). Este organismo se reproduce en el Golfo a finales de primavera y verano (Valverde, 1986). Una vez que los huevos han eclosionado y el organismo finalizado el estadio larvario, migra a zonas costeras y estuarias para alimentarse (Lawrence et al., 1983) (ver apéndice

A1). Este recurso está sujeto a la sobreexplotación y ha logrado recuperarse por su potencial reproductivo y por su alta tasa de crecimiento (Rodríguez de la Cruz y Rosales, 1977). Por lo que cualquier alteración en su medio ambiente como la contaminación por hidrocarburos de petróleo puede afectar gravemente a su ecología.

El presente trabajo plantea evaluar el efecto de hidrocarburos derivados de petróleo y concretamente del aceite residual denominado Combustóleo Pesado sobre el camarón azul *P. stylirostris* en algunos de sus estadios. Fué motivado por la inminente perforación de pozos para la extracción de gas natural en la región norte del Golfo. Así se pretende contar con información básica de laboratorio antes de que se produzca alguna perturbación del medio marino, para poder prevenir y en lo posible evitar el impacto.

1.1- Antecedentes

Los trabajos de laboratorio sobre toxicidad de aceites de petróleo han mostrado que los estadios larvarios de los crustáceos son la etapa más sensible (Lee, 1977; Mecklenburg, et al., 1977; Tatem et al., 1978; Anderson, 1979). Las larvas al igual que los adultos incrementan su sensibilidad

durante los periodos de muda o ecdysis (Katz, 1973; Mecklenburg et al., 1977).

Mecklenburg et al. (1977) determinaron la Dosis Letal Media (DL 50 a 24 hrs) de la fracción soluble de petróleo en agua (FSP) sobre larvas de *Paralithodes camischaticus* y *Pandalus hypsinotus* en 2.0 y 7.9 ppm de HT respectivamente.

Posteriormente Tatem et al. (1978) estimaron la DL 50 a 96 hrs del aceite combustible No. 2 sobre larvas zoeas del camarón estuarino *Palaeomonetes pugio* en 1.2 ppm de HT. En postlarvas de camarón café (*Penaeus aztecus*) se estableció la toxicidad aguda (DL 50 a 96 hrs) del aceite No. 2 en 6.6 ppm, del residual bunker C en 1.9 ppm y del aceite crudo de Louisiana en 19.8 ppm (Anderson et al., 1974 b). El camarón del Golfo de México *Penaeus duorarum* al exponerlo a FSP mostró el siguiente orden de sensibilidad: protozoa > nauplio > mysis > postlarva > adulto (Perez et al., 1982).

Anderson et al. (1974 b) al exponer a los camarones estuarinos *P. pugio* y *P. aztecus* a FSP, encontraron una acumulación de hidrocarburos en los tejidos con mayor abundancia del aromático naftaleno. Al colocarlos nuevamente en agua limpia hubo una rápida liberación de naftaleno pero una permanencia indefinida de naftalenos metilados. Sanborn y Malins (1977) reportan una acumulación de naftaleno en los tejidos de larvas de *Cancer magister* y *Pandalus platycerus*

de 4 veces la concentración del medio en un periodo de exposición de 24 horas.

Los análisis de las soluciones FSP y de tejidos han mostrado que los hidrocarburos aromáticos son las fracciones que determinan la toxicidad de los aceites y de las FSP en agua (Rice et al., 1974; Neff et al., 1976).

Los hidrocarburos penetran al organismo principalmente por la superficie branquial, por el tracto digestivo y por las superficies externas (Lee, 1974; Stegeman, 1977). Se menciona que los copepodos pueden consumir petróleo en suspensión y contribuir hasta con un 10 % del aceite particulado sedimentado via heces fecales (Conover, 1971).

Los hidrocarburos se acumulan principalmente en los tejidos con alto contenido de lípidos. En los crustáceos se presentan en el hepatopáncreas, en el estómago, glándula verde y superficie branquial (Lee, 1977; Stegeman, 1977). Estos organismos poseen un mecanismo de detoxificación conocido como sistema oxidasa, el cual transforma a los hidrocarburos en derivados hidrofílicos lo que facilita su excreción (Botello, 1975; Lee, 1977).

La información sobre la sensibilidad de crustáceos a hidrocarburos de petróleo abunda sobre especies de zonas subárticas, templadas y del Golfo de México, sin embargo, la información sobre especies del Golfo de California es muy escasa, por lo es imprescindible iniciar este tipo de estudios.

1.2- Objetivo.

En este trabajo se evalúa el efecto de diferentes concentraciones de Combustóleo Pesado (fracción soluble en agua de mar) sobre los estadios larvales de nauplio, protozoea y postlarvas del camarón azul *Penaeus stylirostris* determinando los valores de Dosis Letales Medias (DL 50) mediante bioensayos estáticos con medio renovable.

2.- MATERIALES Y METODOS

2.1.- Obtención de los organismos de prueba.

Los estadios larvales de camarón azul se obtuvieron en la Unidad Experimental Peñasco (UEP) del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS). Se siguieron los procedimientos descritos por Almada et al. (1984).

Los organismos utilizados como reproductores se extrajeron de una población de organismos cultivados. Las hembras (un total de 50) se eligieron al azar de tres acuarios de maduración, presentando espermátóforos completos y una madurez gonadal que variaba entre 62 y 64, de acuerdo a la escala de madurez gonadal (1 al 5) para hembras del género *Penaeus*, basada en la apariencia física y la coloración del ovario (Mendoza, 1985). Las larvas obtenidas procedieron de desoves múltiples de por lo menos tres hembras. Los estadios utilizados fueron estadio nauplio (2 hrs. después de la eclosión), estadio protozoea (2 hrs. después de alcanzar el estadio) y postlarva (de 4 a 6 días) de 8 a 11 mm de longitud promedio.

2.2.- Obtención de la solución de prueba.

El combustible utilizado fue proporcionado por Petróleos Mexicanos de la Planta de Almacenamiento y Distribución de Guaymas, Sonora. El combustible se colocó en frascos de cristal color ámbar, en refrigeración (4°C) y en ausencia de luz para minimizar su degradación (La Roche et al., 1970).

La Fracción Soluble de Combustible (solución FSC) en agua se preparó agregando un 5 % de combustible (50 ml) a agua de mar (950 ml) en recipientes de cristal color ámbar de 3 000 ml. Se empleó agua de mar filtrada ($5.0\ \mu$) con salinidad de 36 ppmil, agitando suavemente por espacio de 18 hrs., con un imán y una plancha magnética (Corning PC 353). Se procuró que el vórtice formado por la agitación fuese continuo de la superficie al fondo para asegurar un mejor mezclado. La temperatura durante la agitación se mantuvo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La solución FSC se obtuvo inmediatamente antes del inicio de cada bioensayo (empezando la agitación 18 hrs. antes) sifoneando por debajo de la capa de aceite y desechando el sobrante.

Una vez obtenida la solución FSC se procedió a hacer diluciones con agua de mar, con el objeto de obtener diferentes concentraciones de hidrocarburos en la solución de prueba.

2.3.- Análisis químico de la solución de prueba.

Se determinó la concentración del hidrocarburo aromático naftaleno de la solución FSC de acuerdo a la metodología propuesta por Neff y Anderson (1975); el material de cristalería fue tratado conforme a lo establecido por ASTM (1978).

Se tomaron alícuotas de la solución FSC de 10, 20, 30, 40 y 50 ml y se aforó a un volumen de 50 ml con agua de mar filtrada (5 u), obteniendo una concentración de 20, 40, 60, 80 y 100 %. Las soluciones se colocaron en embudos de separación de 1000 ml y se agregó 1 ml de ácido clorhídrico concentrado. Posteriormente se agregó 20 ml de n-hexano grado cromatográfico y se agitó por 30 minutos. Se dejó reposar por un lapso igual de tiempo y se drenó la fase acuosa (inferior); la superior se colocó en frascos erlenmeyer de 50 ml con tapón.

Las lecturas se realizaron en la región de los 200 a 240 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 25.

El estándar naftaleno (Supelco 93-99 % de pureza) se disolvió en n-hexano y se prepararon soluciones de 0.1 a 10 ppm. Las concentraciones de naftaleno de la solución FSC se calcularon interpolando los valores de absorción en la curva de calibración del estándar a 220 nm. Las determinaciones se realizaron para 4 diferentes soluciones FSC.

Para determinar diferencias entre las concentraciones de naftaleno encontradas en cuatro diferentes soluciones FSC, se aplicó una prueba de Análisis de Varianza de un Factor (prueba de Kruskal y Wallis) con un alfa = 0.05 y 0.01 (Zar, 1974).

2.4.- Bioensayos.

Los bioensayos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en APHA (1975).

Se llevaron a cabo bioensayos estáticos preliminares de 24 hrs. Posteriormente se realizaron bioensayos con renovación del medio cada 12 hrs. (Fig. 1). La duración de los bioensayos se eligió de acuerdo al tiempo normal de desarrollo de cada estadio y a su sensibilidad a la solución tóxica. El tiempo de exposición para los estadios larvales nauplio y protozoa fue de 36 hrs. y 48 hrs. para postlarvas.

Se emplearon vasos de precipitado de 250 ml dentro de acuarios de cristal de 50 l de capacidad con agua a temperatura ambiente (27 a 29 °C). Los vasos experimentales se dispusieron aleatoriamente dentro de cada acuario con la ayuda de una tabla de números al azar (Little y Hills, 1981). Se colocaron 10 organismos por vaso de precipitado

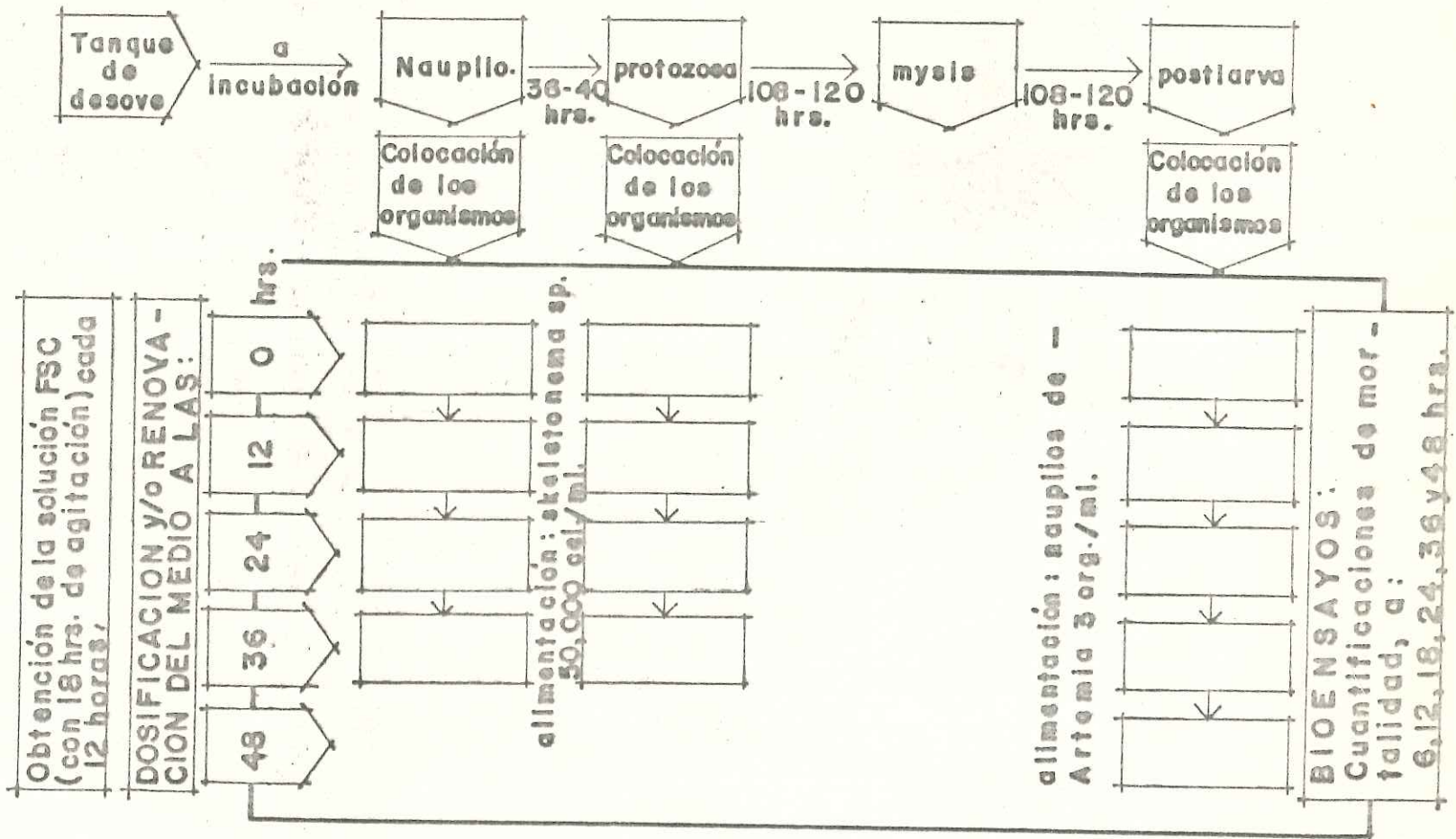


FIG. 1... Diagrama de flujo de los bioensayos para los estadios larvarios nauplio y protozoa y las postlarvas.

conteniendo un volumen total de 200 ml de medio.

Se mantuvo una oxigenación no menor de 5 ppmil mediante líneas de aereación individual para cada vaso. Los niveles de oxígeno disuelto fueron determinados cada 12 horas con un oxímetro YSI modelo 54 A.

El estadio protozoa se alimentó con la diatomea *Skeletonema sp.* a una concentración de 50 000 cel/ml. La densidad de células se estableció por estimaciones directas en un Hemacitómetro 0.1 mm de profundidad (Bright Line AO) (Reprieto, 1984). Las postlarvas se alimentaron con nauplios de *Artemia* a una concentración de 3 organismos/ml.

Se realizaron cuantificaciones de organismos sobrevivientes a las 6, 12, 18, 24, 36, y 48 hrs. de haberse iniciado los bioensayos. Al inicio de cada prueba se colocaron los organismos en forma individual por medio de tubos de cristal de 4 mm de diámetro, conectados a pipetas hidráulicas de plástico (Propipetas mod. Gr 10.). De igual forma se realizaron los cambios a los nuevos medios cada 12 hrs. Se utilizó una lámpara de luz blanca tipo "cool white" Sylvania para realizar las cuantificaciones, aprovechando el fototropismo positivo que presentan los estadios larvales.

El criterio de muerte se estableció como la ausencia de movimiento de los apéndices, falta de respuesta al estímulo físico y cambio del color natural traslúcido del tejido

normal a color blanco opaco. Al finalizar cada bioensayo se hicieron observaciones al microscopio estereoscópico (Baush & Lomb) para corroborar la mortalidad.

En cada bioensayo se probaron 5 concentraciones y un control todos por triplicado. Para los bioensayos preliminares se eligió un factor de incremento igual a la raíz cúbica del número de organismos probados (10) para cada réplica, de tal forma que el incremento logarítmico de las dosis es una simple fracción (1/3), según lo sugiere Horn (1956). Así las primeras concentraciones probadas fueron 10, 20, 50, y 100 % de la sustancia de prueba (v/v). Con base a los resultados de los bioensayos preliminares se eligió un rango definitivo de concentración (v/v): 20, 40, 60, 80 y 100 %. Se realizaron un total de 4 bioensayos para los estadios nauplio y protozoa y 3 para postlarva. Para la estimación de las dosis letales, se empleó un total de 720 organismos para cada uno de los dos primeros estadios y 520 para postlarva. El periodo experimental fué del 9 de Julio al 2 de Septiembre de 1985.

2.5.- Análisis estadístico.

Los valores de Dosis Letales Medias (DL 50) se calcularon en una computadora (Prime 700) que posee el programa de calculo de Dosis Letales Medias por el Análisis Probit (Finney, 1971) con las siguientes características:

- a) trabaja en unidades logarítmicas de concentración y mortalidad en unidades Probit.
- b) realiza el ajuste por el método de Máxima Probabilidad en forma iterativa hasta obtener los mejores coeficientes de regresión.
- c) considera la mortalidad natural de los organismos de prueba mediante la fórmula de Abbott (Finney, 1971):

$$\text{mortalidad corregida} = (b - a) / (1 - a)$$

donde:

- a = porcentaje de organismos testigo afectados.
- b = porcentaje de organismos experimentales afectados.
- d) realiza prueba chi cuadrada para heterogeneidad de respuesta.
- e) Una vez realizado el ajuste expresa la pendiente y el valor de intercepción de la línea de regresión, la varianza de la pendiente, chi cuadrada y el valor de Dosis Letal Media (DL 50) y su varianza.

Los intervalos de confianza se estimaron de acuerdo a la varianza de la DL 50 que es igual a:

$$V(m) = 1/b^2 \left(1/\sum. n w + (m - \bar{X})^2 / \sum. n w (X - \bar{X})^2 \right)$$

donde:

- V(m) = varianza del valor medio.
 m = valor de la dosis (log.) que produce el 50 % de mortalidad.
 b = pendiente de la línea de regresión.
 n = número de organismos por concentración.
 $\frac{w}{X}$ = coeficiente de ponderación.
 \bar{X} = valor medio de la mortalidad en unidades probit.

Se calculó el Error Estandar (E.E.) con la raíz cuadrada de la varianza y se calcularon los límites de confiabilidad al 95 %.

$$V(m) = E.e(m)^2$$

$$(m) (E.e (m)) = E.E. (DL 50)$$

$$DL 50 \pm EE = \text{antilog } (m) \pm EE$$

Las Dosis Letales (DL 16) se estimaron para los bioensayos de postlarva, donde no se produjo mortalidad mayor o igual al 50 %. Se hizo el calculo con una microcomputadora Printaform (1600) utilizando un programa estadístico (Stat Pak) de regresión lineal simple.

Los datos originales se transformaron a logaritmos de base 10 de la concentración y los porcentajes de mortalidad a unidades Probit (Finney, 1971).

Las Dosis Letales (DL 50 y 16) se expresan en una relación volumen-volumen, especificando el tiempo de duración

para cada estadio y sus límites de confianza calculados al 95 %. Posteriormente se estableció la relación entre las DL 50 (v/v) y la concentración de naftaleno en ppm.

Se calculó el Índice de Toxicidad (IT) propuesto por Anderson et al. (1980) multiplicando el valor de la DL 50 por el tiempo de duración del bioensayo expresado en días [(v/v) (días) y (ppm) (días)].

3.- RESULTADOS.

3.1. Análisis de la solución FSC.

La Fracción Soluble de Combustóleo (solución FSC) preparada con el 5 % de combustóleo en agua de mar, se presentó como una solución acuosa, cristalina, con una fina capa aceitosa en su superficie. Exhibe un olor característico a aceite el cual desaparece en un periodo de 18 a 24 hrs. cuando la solución se encuentra a la intemperie.

En el análisis de Espectrometría de Ultravioleta, el espectro de la FSC (Fig. 2 a) presenta el máximo de absorción a los 224 nm, el estándar de naftaleno (Fig. 2 b) a los 220 nm y el del combustóleo pesado (Fig. 2 c) a los 230 nm.

Las concentraciones de naftaleno de las soluciones FSC se muestran en la Tabla I. En las soluciones de 20 %, no se determinó valores de naftaleno mientras que en las soluciones más concentradas los valores se encuentran cercanos a 0.6 ppm.

Análisis de Varianza de las Concentraciones.

En el Análisis de Varianza de un Factor (prueba de Kruskal-Wallis) se encontró que las FSC probadas (40, 60, 80 y 100 % v/v) (Tabla I) difieren muy significativamente en su contenido de naftaleno ($H_c = 12.50 **$ $P < 0.01$ para $N = 16$ y $K = 3$ grados de libertad).

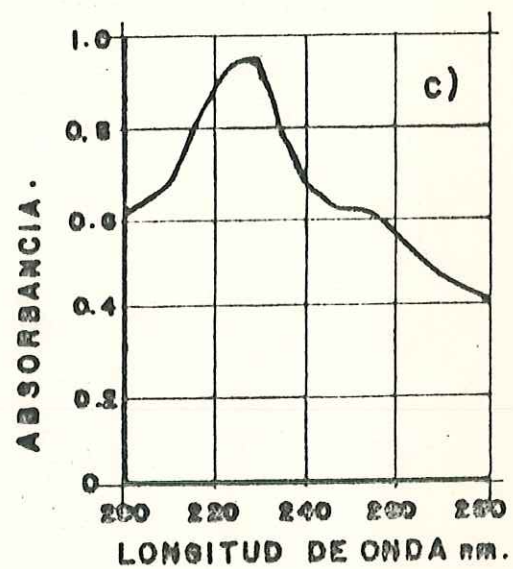
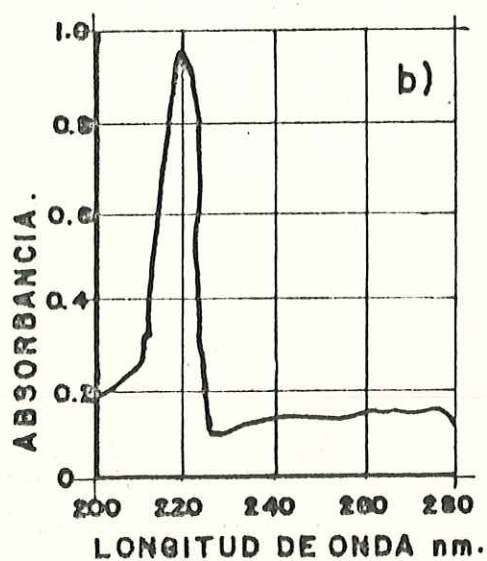
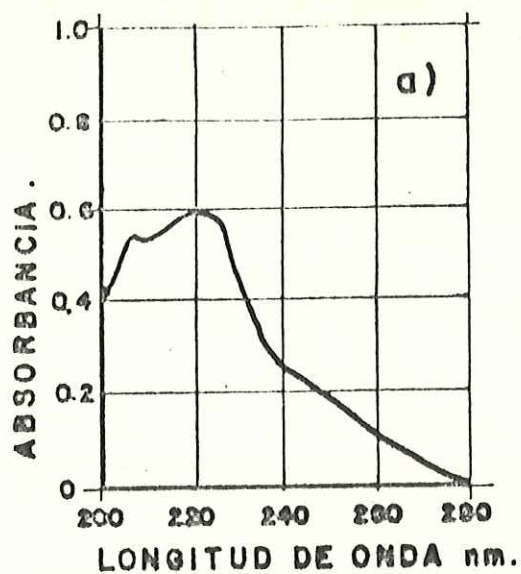


FIG. 2.- ESPECTROS DE ABSORBANCIA.
a).- Solución FSC. b).- Naftaleno.
c).- Combustoleo.

TABLA I . - . Concentraciones de Naftaleno (PPM) de las soluciones FSC determinadas por Espectrometría de Ultravioleta.

Solución	Soluciones de FSC (Concentración v/v)			
	40 %	60 %	80 %	100 %
1	0.10	0.23	0.80	0.61
2	0.28	0.28	0.40	0.61
3	0.12	0.13	0.60	0.60
4	0.13	0.30	0.43	0.54

3.2 - Resultados del estadio nauplio.

La FSC en los bioensayos estáticos preliminares de 24 horas produce poco efecto nocivo sobre el estadio nauplio, provocando 10 % de mortalidad (Fig. 3). La mortalidad en los bioensayos con medio renovable fuè en aumento con respecto a la concentración de la FSC (Tabla II).

El bioensayo no. 1 presentó la respuesta mas extrema con 100 % de mortalidad en las soluciones de 100 %. En términos generales la respuesta de los organismos sigue el gradiente de concentración, pero ciertas soluciones provocan mortalidades menores a las esperadas. Debido a esto la reacción se nota heterogènea con las bajas: 20, 40 y 60 %.

Al inicio de los bioensayos las larvas presentaron fototropismo positivo. Al final de los experimentos solo los organismos control y los expuestos a las más bajas concentraciones (20 %) respondieron al fototropismo en igual magnitud. Los organismos que sobrevivieron, frecuentemente permanecieron en el fondo de los recipientes y a partir de las 18 horas de exposición algunos de ellos se aglomeraron en grupos de 3, 4 y 5 individuos entre organismos vivos y muertos.

En la Curva de Toxicidad (Fig. 4), la sobrevivencia promedio de los organismos (considerando los bioensayos 2,

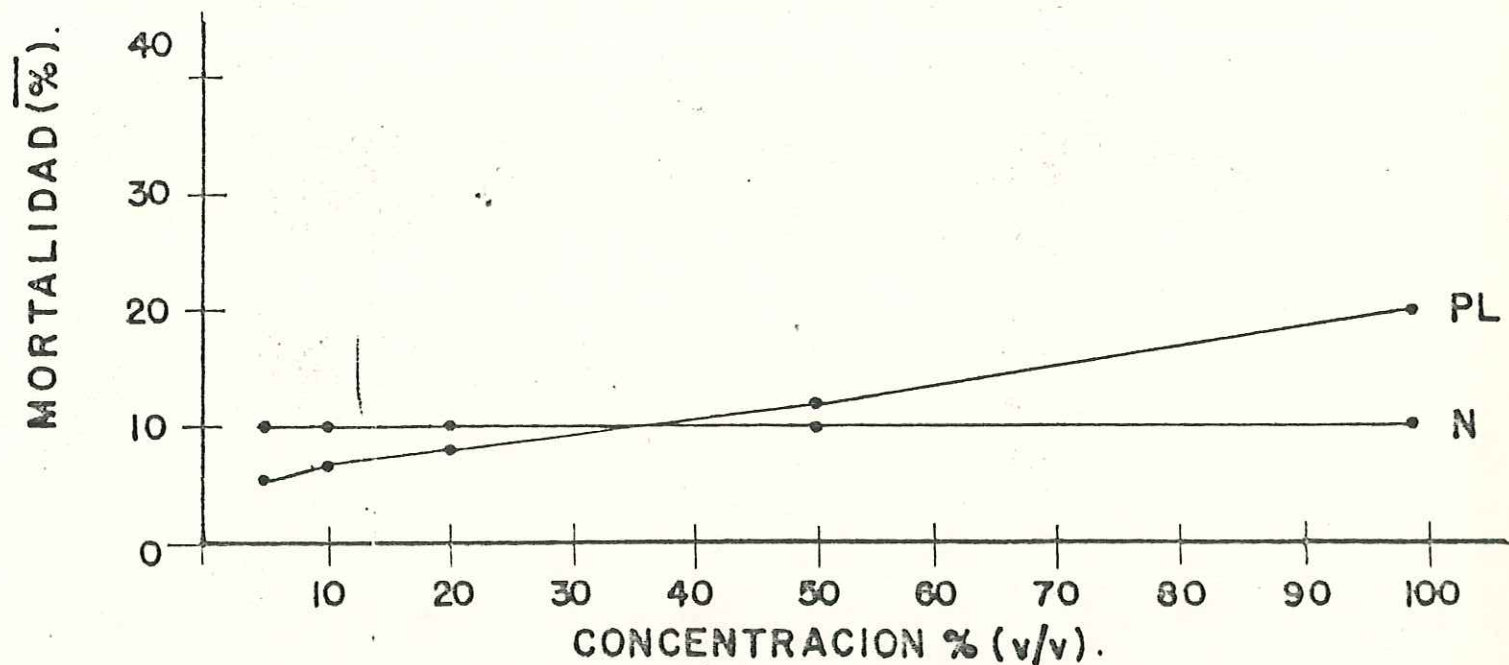


FIG. 3.— Bioensayo estático preliminar de 24 hrs. de exposición a la FSC de los estadios nauplio (N) y postlarva (PL).

TABLA II.- Mortalidad (%) de estadio nauplio expuesto por 36 hrs. a la FSC en medio renovable.

BIO_ ENSAYO	FECHA	CONCENTRACION (v/v)	MORTALIDAD (%)		
			1)	réplicas 2)	3)
1	09/VII/85	0	0	0	0
		20	20	10	10
		40	70	40	30
		60	30	90	80
		80	100	90	100
		100	100	100	100
2	16/VII/85	0	0	0	0
		20	20	0	0
		40	0	10	10
		60	20	20	30
		80	40	70	40
		100	70	50	60
3	03/VIII/85	0	20	10	10
		20	0	10	10
		40	30	0	0
		60	0	0	10
		80	70	60	60
		100	70	70	80
4	21/VIII/85	0	20	0	10
		20	0	0	20
		40	0	30	20
		60	30	40	40
		80	70	40	60
		100	80	60	70

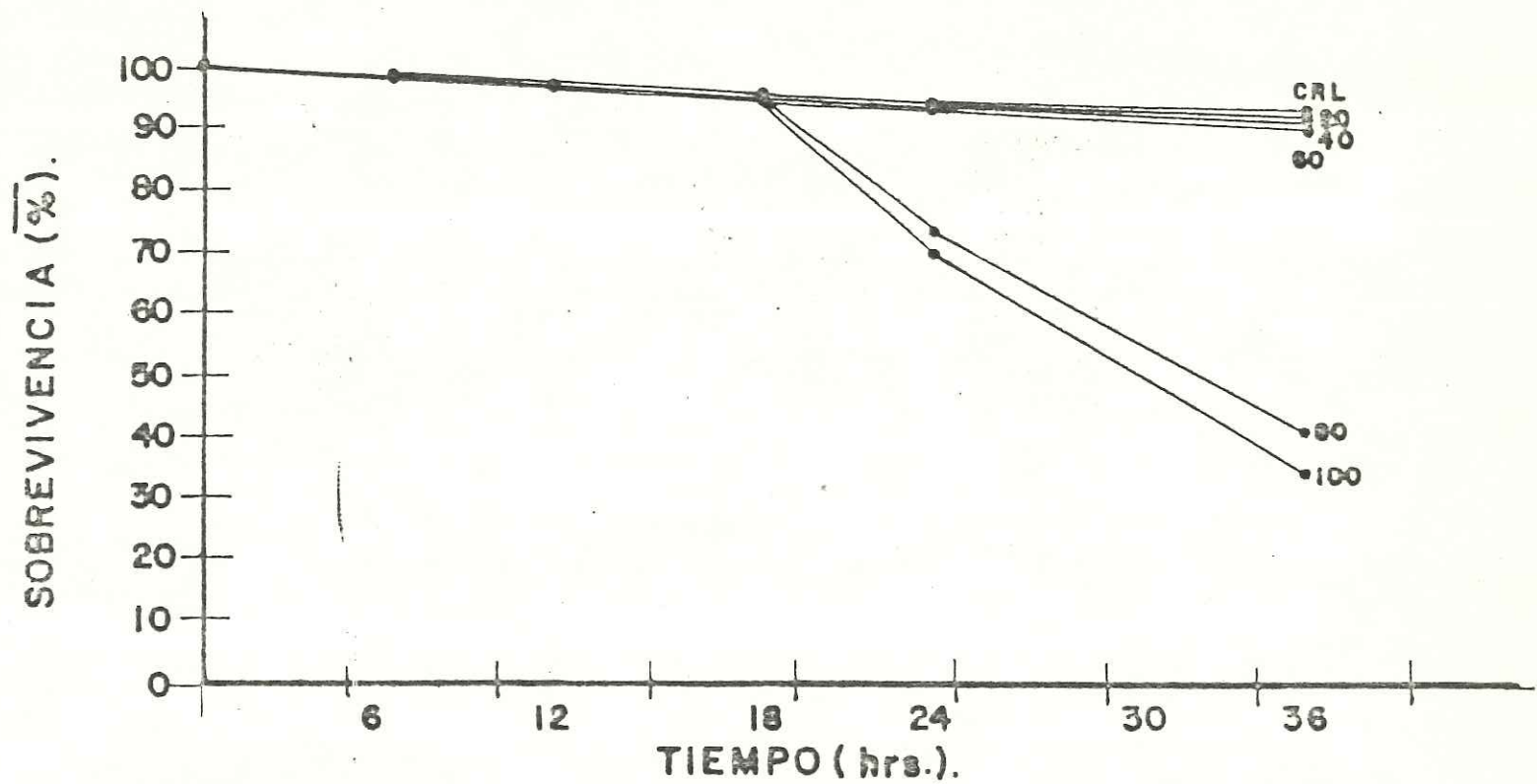


FIG. 4._ Curva de toxicidad del estadio nauplio expuesto a la FSC _ en medio renovable

3 y 4) ante la solución tóxica durante las 36 horas de las pruebas, se ve ligeramente abatida por las concentraciones de 20, 40 y 60 %. Con las soluciones de 80 y 100 %, se observa una declinación muy acentuada a partir de las 18 horas. Estas soluciones reducen la sobrevivencia al finalizar las pruebas hasta valores de 40 y 30 % respectivamente.

Los organismos muertos presentaron una coloración negro opaco y se retiraron cada 12 horas al momento de hacer los cambios de medio. La mortalidad en los recipientes control se mantuvo entre 0 y 13 %.

Las ecuaciones de regresión de los ajustes por Máxima Probabilidad y el Análisis de Covarianza con base a sus pendientes (b) se muestran en la Tabla III. Las ecuaciones de los bioensayos 2, 3 y 4 representan rectas con pendientes positivas que interceptan la ordenada en valores negativos. Las rectas se interceptan entre sí en valores de concentración cercanos a 1.88 (Fig. 5). Los tres ajustes presentan pocos grados de libertad y altos valores de varianza. La prueba de Chi cuadrada ($\alpha = 0.05$) no mostró diferencias significativas entre los valores experimentales y los ajustes. El análisis de covarianza muestra un valor de $F = 0.38$ con diferencias no significativas a un nivel de 95 % entre las pendientes de las ecuaciones de regresión para los tres bioensayos de estadio nauplio.

El nuevo ajuste por regresión lineal simple sobre los

TABLA III.- Ecuaciones de regresión (log. de la concentración vs. mortalidad en unidades Probit) (Método de Máxima Probabilidad) y Análisis de Covarianza de las pendientes (b) n.s.= no significativa .

BIOENSAYO	ECUACION	VARIANZA	χ^2	g.l.	b	SUMA DE CUADRADOS	N	F $\alpha=0.05$
NAUPLIO								
2	Y= -5.45 + 5.39 X	2.72	7.4 n.s.	10	5.39	4.24	12	0.38 n.s.
3	Y= -7.05 + 6.23 X	5.84	5.3 n.s.	8	6.32	10.65	10	
4	Y= -2.94 + 4.16 X	1.73	5.9 n.s.	9	4.16	1.39	11	
PROTOZOEIA								
1	Y= 2.27 + 1.51 X	0.44	9.7 n.s.	8	1.51	1.20	10	0.45 n.s.
3	Y= -1.17 + 3.43 X	0.46	16.2 n.s.	12	3.43	1.39	14	
4	Y= -7.97 + 7.83 X	6.84	8.4 n.s.	6	7.83	7.29	8	

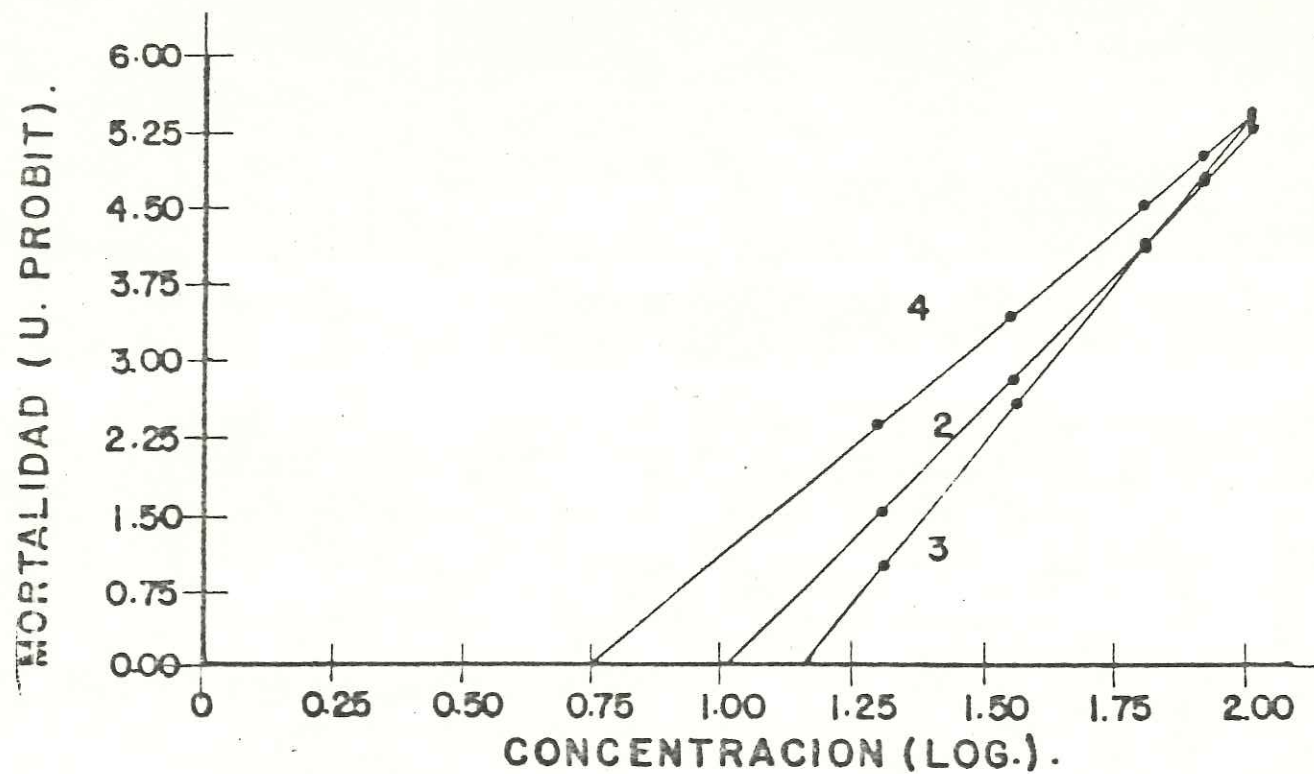


FIG. 5.- Rectas ajustadas por Análisis Probit de los bloensayos 2,3 y 4 del estadio nauplio expuesto a la FSC por 38 hrs.

datos de los bioensayos ajustados por Máxima Probabilidad se observa en la Fig. 6. La ecuación de la recta ajustada muestra coeficientes de regresión bastantes similares a la ecuación no. 2 que se presenta en la Tabla III. A partir de ésta recta se estimó el valor de concentración (en escala logarítmica) que provoca el 50 % de mortalidad sobre la población: $m = 1.88$.

3.3 - Resultados del estadio protozoa.

El estadio protozoa muestra mayor sensibilidad a la FSC en los bioensayos estáticos que el estadio de nauplio. En bajas concentraciones de 5 y 10 % (v/v) se muestra muy poco efecto, mientras que la soluciones de 100 % provocan mortalidades de 50 a 100 % (Fig. 7).

En los bioensayos con medio renovable (Tabla IV) hay altas mortalidades al finalizar las pruebas. En bajas concentraciones (20 y 40 %) se observa la mayor dispersión en la respuesta de los organismos. Con soluciones de 60, 80 y 100 % se alcanza la mortalidad total.

El efecto de la FSC también es evidente a las 18 horas de iniciadas las pruebas. En el bioensayo No. 2 no hay sobrevivencia en soluciones con 60, 80 y 100 % y en el no. 3 nunca se presenta la mortalidad total.

La mortalidad en los recipientes control varió de 6.6 a 33 %, excepto en el bioensayo No. 2 donde alcanzó valores de 73 % a las 18 hrs. y de 90 % a las 36 hrs..

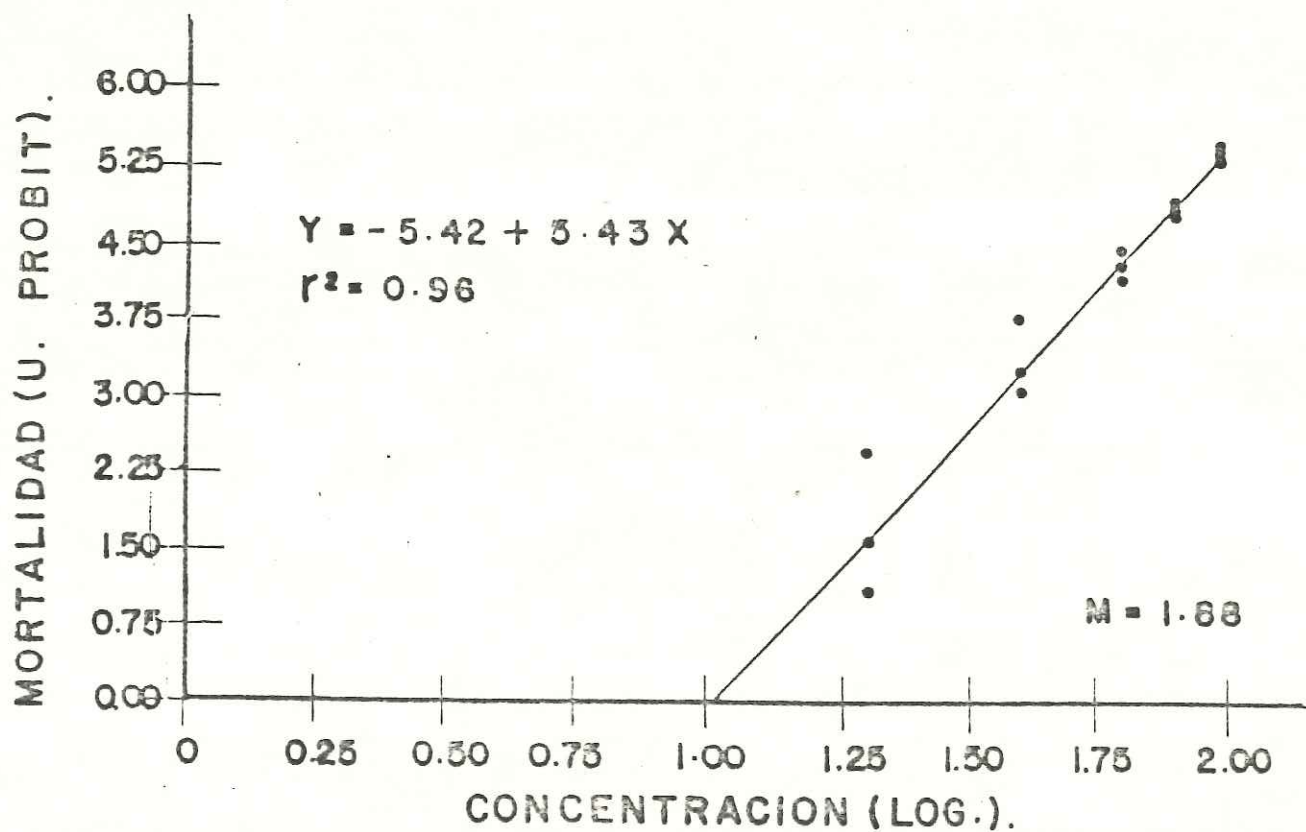


FIG.6.- Recta ajustada de los bioensayos 2,3y4 del estado nauplio expuesto a la FSC por 36 hrs.

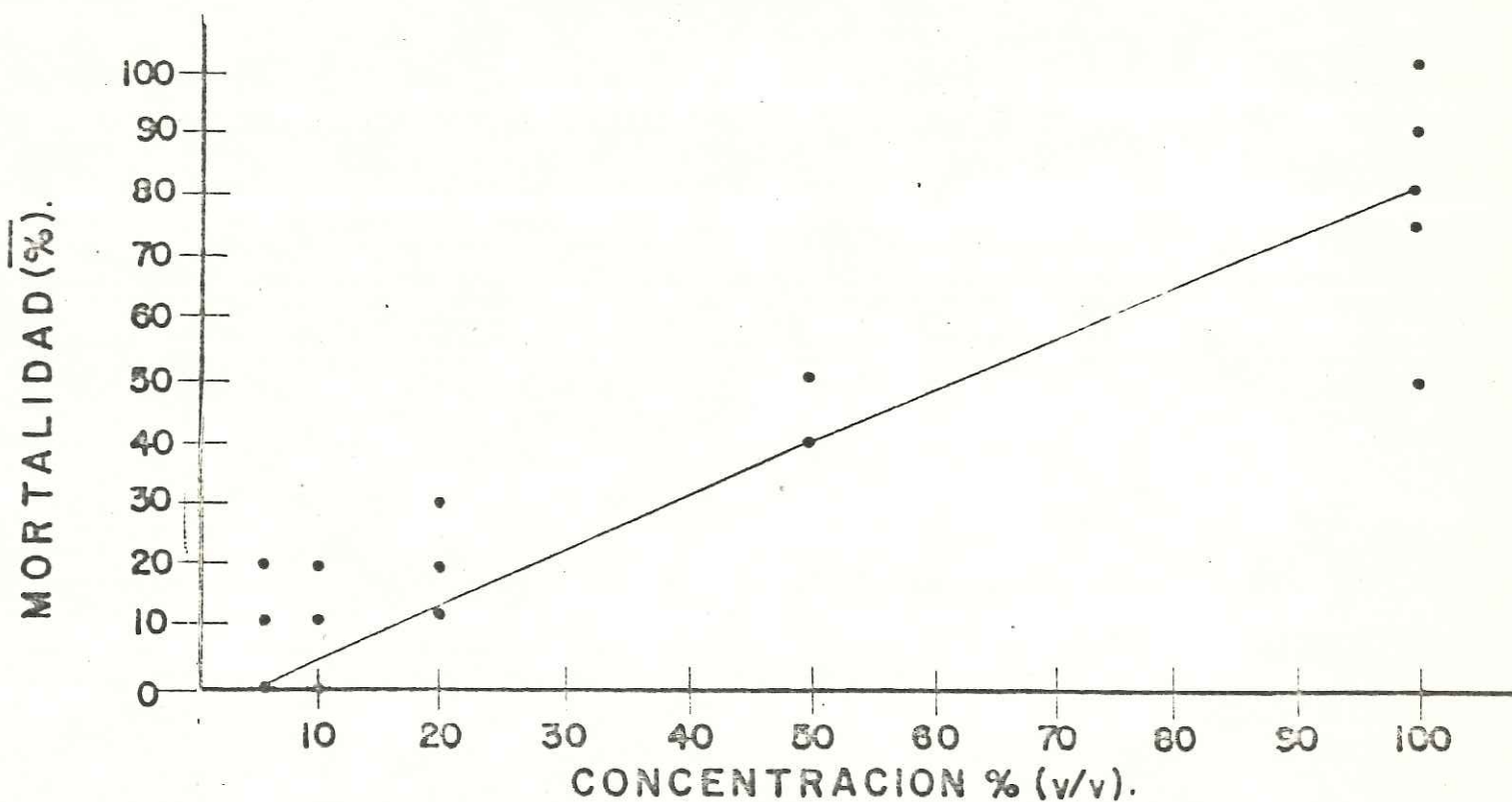


FIG. 7.— Bloensayo estático preliminar de 24 hrs. de exposición a la FSC del estadio protozoa.

TABLA IV.- Mortalidad (%) del estadio protozoa expuesto por 36 hrs, a la FSC en medio renovable.

BIO- ENSAYO	FECHA	CONCENTRACION (v/v)	M O R T A L I D A D (%)					
			18 hrs. :	r é p l i c a s			36hrs,	
			1)	2)	3)	1)	2)	3)
1	11/VII/85	0	10	30	20	10	30	60
		20	30	40	60	100	50	80
		40	50	30	40	100	100	100
		60	100	80	100	100	100	100
		80	100	50	100	100	100	100
		100	100	90	60	100	100	100
2	18/VII/85	0	70	30	20	90	50	80
		20	60	70	30	100	50	90
		40	70	70	70	90	100	100
		60	100	100	100	100	100	100
		80	100	100	100	100	100	100
		100	100	100	100	100	100	100
3	05/VIII/85	0	10	0	0	10	0	10
		20	10	10	10	10	10	50
		40	10	30	30	40	60	60
		60	30	30	80	70	60	10
		80	90	80	80	100	100	100
		100	60	60	80	100	100	100
4	16/VIII/85	0	20	20	0	30	20	10
		20	20	20	0	10	20	30
		40	90	50	70	100	70	90
		60	90	80	100	100	100	100
		80	100	100	100	100	100	100
		100	100	100	100	100	100	100

La Curva de Toxicidad presenta el comportamiento de la sobrevivencia promedio de los bioensayos 1, 3 y 4 (Fig. 2). A partir de las 6 horas del inicio de las pruebas la sobrevivencia es afectada por las soluciones con concentraciones de 40, 60, 80 y 100 %. A las 24 horas las soluciones más concentradas de 80 y 100 % han terminado con la totalidad de los organismos y las soluciones de 40 y 60 % han abatido la sobrevivencia hasta a un 15 y 25 % a las 36 horas.

Las larvas presentaron fototropismo positivo durante las pruebas. La actividad se vió disminuida conforme transcurria la experimentación, hasta permanecer en el fondo de los recipientes y mostrar mortandad a partir de las 6 horas de exposición.

Los ajustes por el método de Máxima Probabilidad para los bioensayos no. 1, 3 y 4 del estadio protozoa (Tabla III), muestran ecuaciones de rectas con pendientes positivas entre las que destaca la del bioensayo No. 4 por su alto valor (7.83). Presenta además los valores más altos de varianza (6.84) y los grados de libertad menores de los tres ajustes. Las rectas interceptan la ordenada en valores negativos, excepto la recta del ajuste no. 1 que intercepta en valores de 2.27 (Fig 9). En términos generales las rectas se muestran contrastantes. La no. 4 exhibe una pendiente muy pronunciada mientras que la no. 1 una suave. Sin embargo, las rectas se cruzan entre sí en valores de concen-

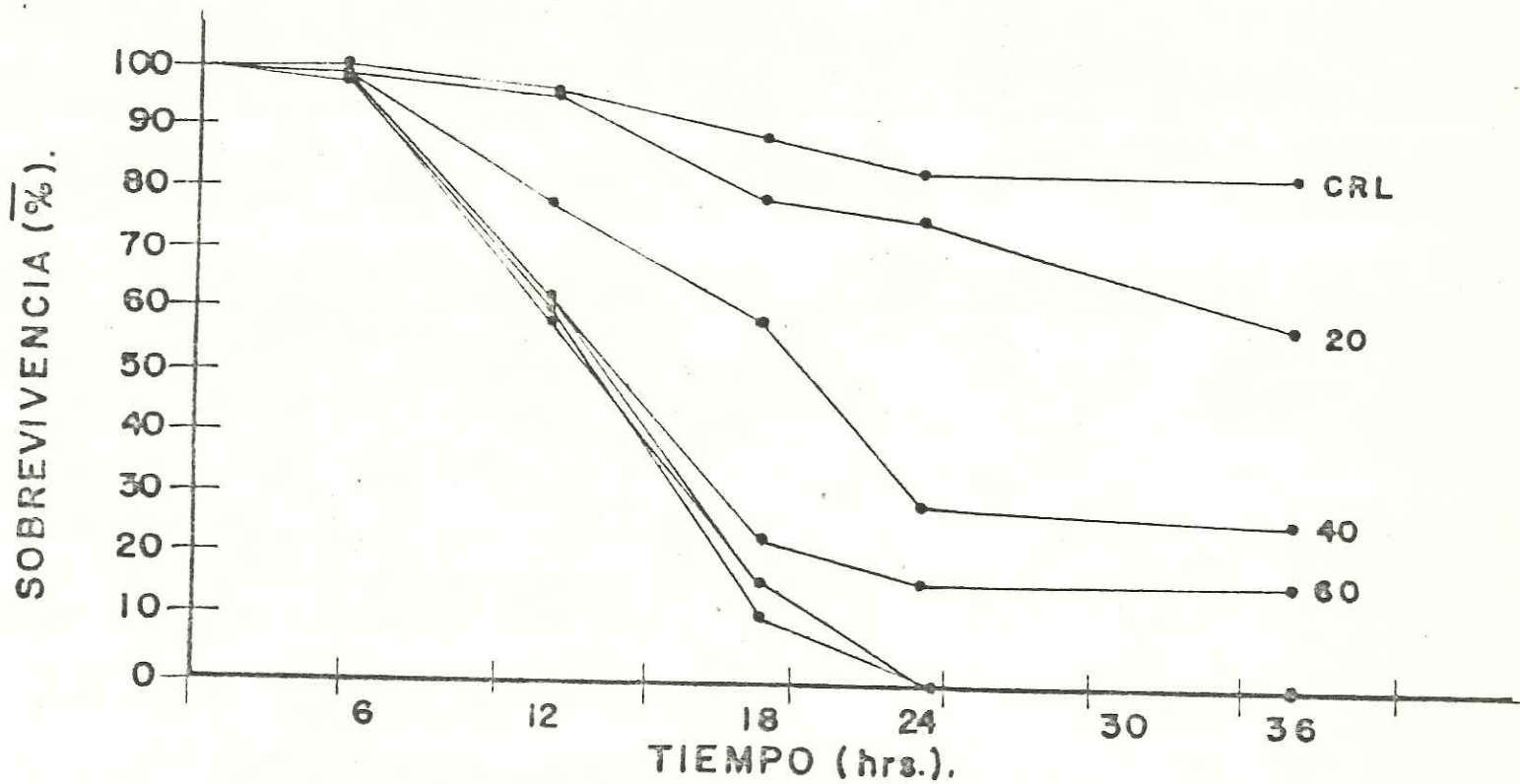


FIG. 8._ Curva de toxicidad del estadio protozoa expuesta a la FSC _ en medio renovable.

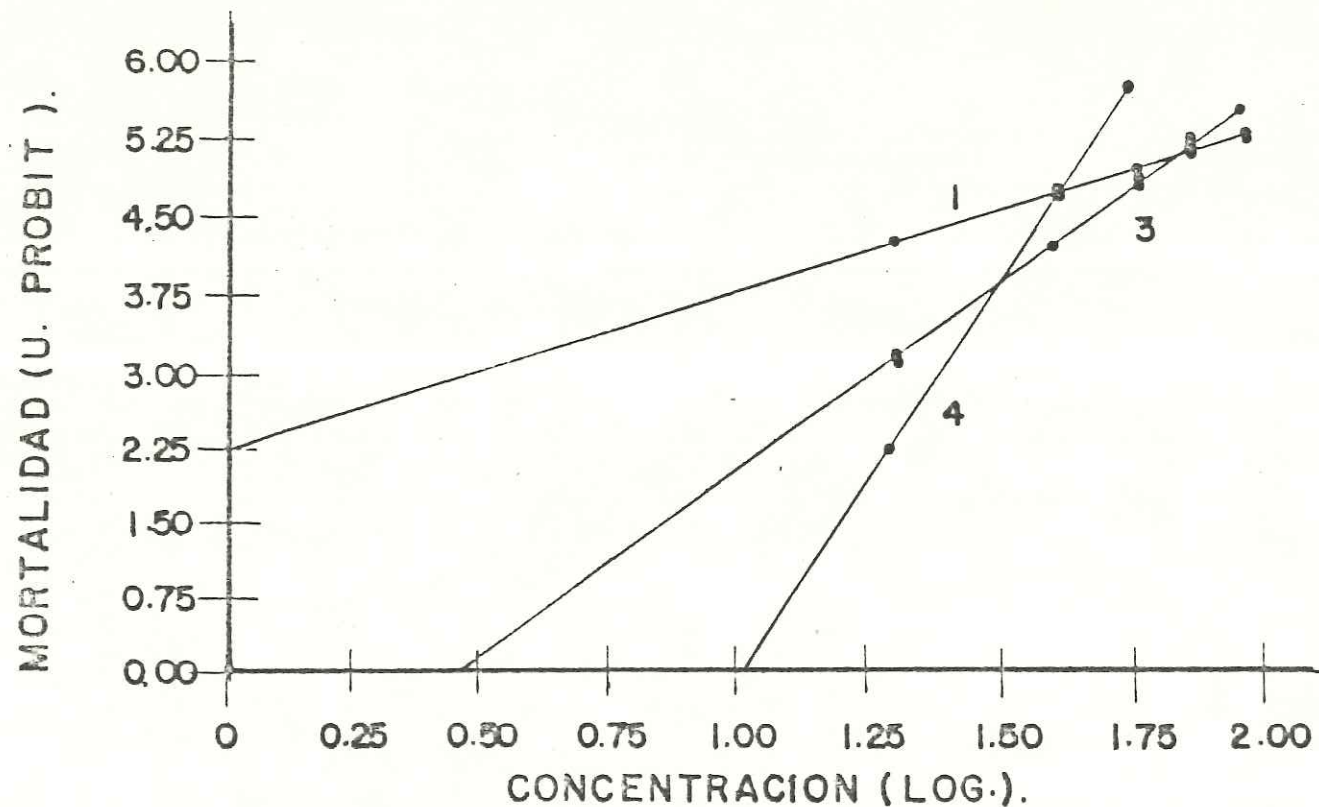


FIG. 9. — Rectas ajustadas por Análisis Probit de los biensayos 1, 3 y 4 del estadio protozoa expuesto a la FSC por 18 hrs.

tración cercanos a 1.6 . La prueba Chi cuadrada muestra no haber significancia entre los datos de los bioensayos y los ajustes. El Análisis de Covarianza con base en las pendientes estima un valor de $F = 0.45$, resultando no significativo a un alfa de 0.05 .

Al igual que para el estadio nauplio se trazó una nueva línea sobre los datos de los bioensayos 1, 3 y 4 (Fig. 10) de la cual se estimó el valor de $m = 1.77$ como el valor que causa el 50 % de mortalidad sobre la población. El nuevo ajuste muestra similitud con la ecuación no. 3 que se presentó en la Tabla III.

3.4- Resultados de postlarvas.

Las postlarvas en los bioensayos preliminares muestran poca sensibilidad a la solución tóxica. La mortalidad máxima alcanzada es de solo un 20 % (Fig. 3).

En los bioensayos con medio renovable (Tabla V), la mortalidad observada aumenta a 30 y 40 % en las soluciones con las máximas concentraciones. En forma similar a la respuesta del estadio nauplio a bajas concentraciones, el efecto de la solución tóxica no es muy evidente sobre las postlarvas. Solo que en este caso ninguna concentración empleada afectó al 50 % de la población. En forma general, la mortalidad de este estadio no corresponde al aumento en concentración de la solución FSC.

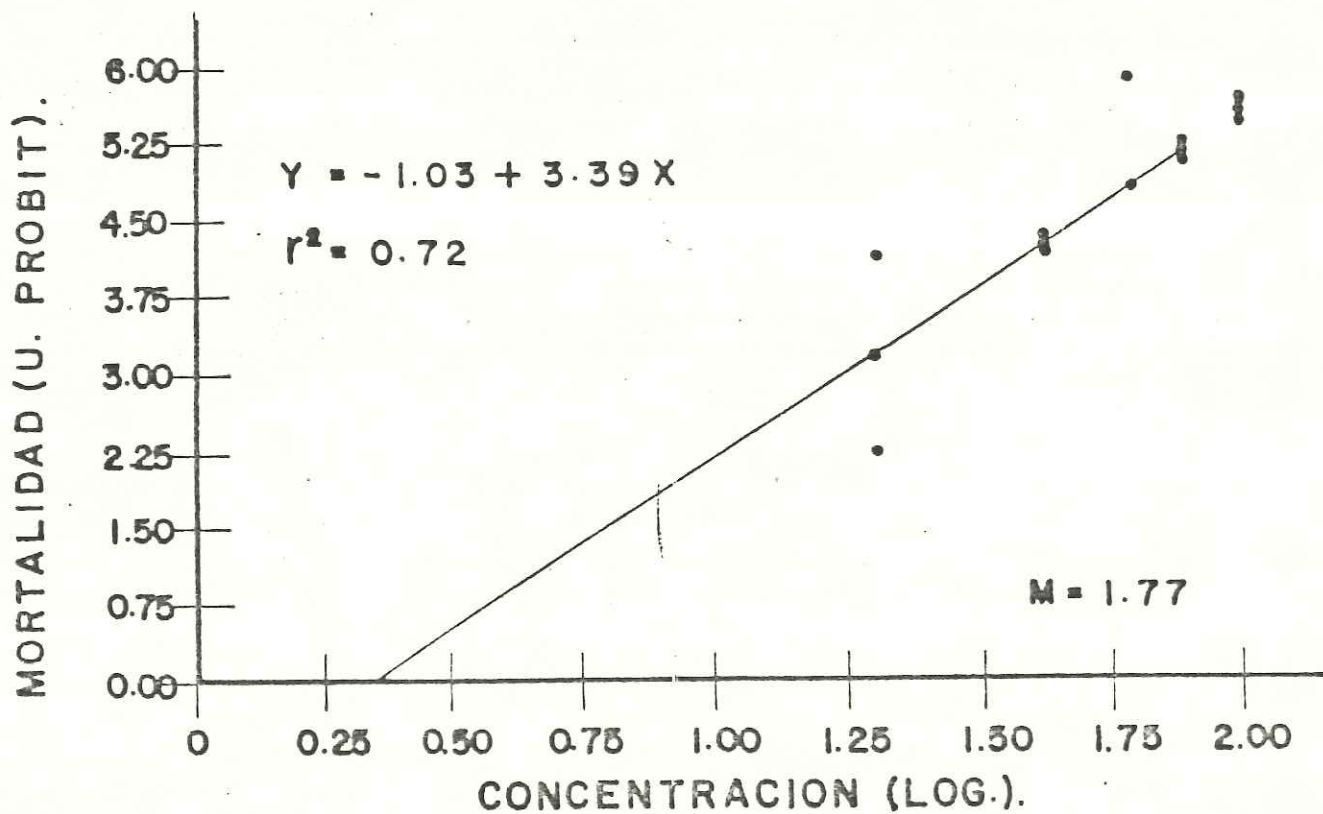


FIG. 10.- Recta ajustada de los biensayos 1,3 y 4 del estado protozoa expuesto a la FSC por 18 hrs.

TABLA V.- Mortalidad (%) de postlarvas expuestas por 48 hrs. a la FSC en medio renovable.

BIO ENSAYO	FECHA	CONCENTRACION (v/v)	MORTALIDAD (%)		
			1)	réplicas 2)	3)
1	23/VIII/85	0	0	20	10
		20	10	20	0
		40	10	20	10
		60	30	40	10
		80	30	10	20
		100	30	40	30
2	26/VIII/85	0	0	10	10
		20	10	20	0
		40	10	0	20
		60	10	10	0
		80	30	60	20
		100	30	60	20
3	02/IX/85	0	10	0	10
		20	10	10	10
		40	10	30	20
		60	30	30	10
		80	10	20	30
		100	30	30	40

La mortalidad en los recipientes control fué menor o igual al 10 %. Los organismos durante la exposición se mostraron bastante activos y presentaron frecuentes mudas (sin determinarse el promedio por organismo). En algunos recipientes se encontraron organismos muertos en la pared del recipiente por arriba del nivel de la solución de prueba.

Los ajustes para los datos de los bioensayos se realizaron por Regresión Lineal Simple. Las ecuaciones ajustadas (Tabla VI) presentan los menores valores de pendiente (0.86 a 1.24) y las intercepciones a la ordenada son cifras positivas y alrededor de 2.5. Los valores de varianza son pequeños (0.27 a 0.41) y los ajustes presentan los grados de libertad mas altos. Sin embargo, el coeficiente de determinación r^2 presenta valores muy pobres de 0.26, 0.33 y 0.54 . No se estimó la Dosis Létal Media para el estadio postlarva por presentar bajos niveles de mortalidad. Se estimó el parámetro de Dosis Létal 16 de las tres ecuaciones, obteniendose cifras muy consistentes 35 y 36 %. La ecuación que representa la recta con mayor pendiente posee los límites de confianza mas estrechos y ocurre lo inverso con la ecuación con el menor valor de pendiente.

TABLA VI.- Regresión Lineal Simple de estadio postlarva y Dosis letales 16 a 48 hrs., con sus límites de confianza (Ls. y Li.) al 95%.

BIO ENSAYO	ECUACION	VARIANZA	g.l.	r^2	DL ₁₆	Ls.	Li.
1	$Y = 2.67 + 0.86 X$	0.41	12	0.26	35	58	22
2	$Y = 2.09 + 1.24 X$	0.56	10	0.33	35	43	29
3	$Y = 2.33 + 1.08 X$	0.27	13	0.54	36	53	25

3.5. Dosis Letales e Indices de Toxicidad.

Las Dosis Letales Medias (DL 50) y el Indice de Toxicidad (IT) con sus limites de confianza al 95 %, se presentan en la Tabla VII. La DL 50 menor la exhibe el estadio protozoa con valor de 58.8 % de concentración (v/v). El estadio nauplio presenta un mayor valor, 75.8 %. Los valores de Toxicidad obtenidos al multiplicar las DL 50 por el tiempo en alcanzar la letalidad media muestran una mayor diferencia de sensibilidad entre los estadios nauplio y protozoa. El estadio protozoa con un IT de 44.1 (v/v dias), se muestra hasta 2.5 veces mas sensible que el estadio nauplio. Cabe recalcar que entre mas bajo es el Indice de Toxicidad, mas sensible es el estadio u organismo.

Las Dosis Letales Medias calculadas en una relación volumen-volumen, portan 0.44 ppm de naftaleno para el estadio nauplio y 0.23 ppm para protozoa (Tabla VII b). El IT para nauplio resulta ser 0.66 (ppm dias) mientras que un valor de 0.172 (ppm.dias) para protozoa.

TABLA VII.- Dosis Letales Medias (DL₅₀) e Indices de Toxicidad (I.T.) con sus límites de confianza (Ls. y Li.) al 95%.

a) FSC

ESTADIO	DL ₅₀ (%)	Ls.	Li.	TIEMPO (días) (v/v)	I.T. (días)	Ls.	Li.
NAUPLIO	75.8	80.9	71.0	1.5	113.75	121.4	106.6
PROTOZOEIA	58.8	64.6	53.6	0.75	44.1	48.5	40.2

b) Naftaleno

ESTADIO	DL ₅₀ (ppm)	Ls.	Li.	TIEMPO (días) (ppm)	I.T. (días)	Ls.	Li.
NAUPLIO	0.44	0.50	0.38	1.5	0.66	0.75	0.57
PROTOZOEIA	0.23	0.29	0.21	0.75	0.172	0.21	0.15

4.- DISCUSION

La Fracción Soluble de Combustóleo (FSC) porta una concentración de 0.1 a 0.6 ppm de naftaleno (Tabla I). Estos valores concuerdan con lo reportado por Anderson et al. (1974 b). Se determinaron concentraciones de naftaleno por cromatografía de gas con valores de 0.21 ppm para el aceite residual bunker C y 0.84 ppm para el aceite no. 2.

Neff y Anderson (1975) reportan concentraciones obtenidas por UV ligeramente mayores. El bunker C con 0.30 ppm y 0.92 ppm para el no. 2. Sin embargo, las FSP de estos aceites muestran concentraciones aún ligeramente mayores del hidrocarburo metil-naftaleno con 0.48 y 0.94 ppm respectivamente.

Al comparar los espectros de absorbancia de la FSC y del estándar naftaleno (Fig. 1 a y b) es posible observar que la FSC porta otros hidrocarburos además de naftaleno con absorbancias ligeramente mayores a 224 nm. Considerando lo reportado por Neff y Anderson (1975) posiblemente se trate del metil-naftaleno.

El espectro del combustóleo pesado en hexano (Fig. 1c) presenta un espectro de absorbancia más amplio con máximos alrededor de de los 230 nm. Podría tratarse de otros compuestos poliaromáticos poco soluble en agua que están ausentes en la FSC.

Aparentemente los valores de naftaleno forman dos grupos (Tabla I): las concentraciones de las soluciones de 40 y 60 % (v/v) y las de 80 y 100 % (v/v). Sin embargo, el análisis de varianza (prueba de Kruskal - Wallis) establece diferencias muy significativas de los valores de concentración de naftaleno en las soluciones.

Con base en los resultados de concentración de naftaleno se afirma que las concentraciones obtenidas en las FSC son reproducibles bajo las mismas condiciones de temperatura, salinidad, proporción de volumen aceite-agua, energía de agitación y tiempo de agitación; por lo tanto las soluciones FSC preparadas y analizadas posteriormente a los bioensayos son representativas de las utilizadas en los mismos.

El calculo de la Dosis Letal Media (DL 50) se hizo con base en la concentración de las soluciones en una relación volumen - volumen. Estas soluciones portan toda la gama de hidrocarburos solubles en agua que entran en contacto con las larvas de camarón, tal como ocurriría en el medio acuático.

La FSC produce efectos letales a los estadios larvales examinados. Las DL 50 obtenidas muestran las diferencias

en sensibilidad para cada estadio (Tabla VII a). Mironov (1969 citado por Anderson, 1979) y Katz (1973) reportan el efecto adverso de los hidrocarburos de petróleo sobre la viabilidad de larvas de crustáceos, así como las diferencias en sensibilidad entre estadios larvarios de un organismo. Wells y Sprague (1976), mencionan la mayor sensibilidad del primer estadio larvario de la langosta *Homarus americanus* ante hidrocarburos de petróleo.

La baja mortalidad de los nauplios en los bioensayos estáticos preliminares (Fig. 3) nos hace suponer la declinación del tóxico por evaporación de algunas fracciones ligeras. Vanderhorst et al. (1976) al establecer un sistema de exposición continuo a 10 C, reporta una pérdida de hidrocarburos de aproximadamente un 75 % en 24 horas y Anderson et al. (1980) del 40 % en 12 horas a similares temperaturas.

Al exponer los organismos a una renovación de la solución cada 12 horas (Tabla II), el aumento en mortalidad indica que la sensibilidad del estadio se encuentra en función del tiempo de exposición a la FSC. Vanderhorst et al. (1976) y Anderson et al., (1980) afirman obtener menores valores de letalidad aguda en sistemas con renovación del medio comparados con los determinados en los sistemas estáticos.

La respuesta del estadio nauplio a la FSC (Fig. 4) se denota en dos agrupaciones: la primera que manifiesta morta-

lidades de 10 y 15 % (soluciones de 20, 40 y 60 %) y la segunda con efectos de 60 a 70 % (las más concentradas).

Este comportamiento coincide con las agrupaciones encontradas en los valores de naftaleno (Tabla I), apoyando la idea de que el naftaleno es el principal responsable de la poca sobrevivencia encontrada. Sanborn y Malins (1977), reportan una acumulación de naftaleno en larvas zoeas de *C. magister* y *P. platycerus* de 4 veces la concentración del medio para un tiempo de exposición de 24 horas.

Los datos del bioensayo no. 1 fueron eliminados de los cálculos de letalidad aguda, ya que este bioensayo se demoró en su inicio exponiendo a las larvas a la FSC en periodos de muda (transición de nauplio a protozoea). Las larvas en los recipientes de prueba murieron antes de alcanzar el estadio protozoea y algunas otras durante el cambio morfológico. Los organismos control alcanzaron el estadio y permanecieron vivos por algunas horas más aun sin alimento. Esto concuerda con lo reportado por Mecklenburg et al. (1977). Las larvas de cangrejos y camarones en periodos de muda han resultado de 1.5 a 8 veces más sensibles que en intermuda.

Los ajustes de las ecuaciones se realizaron considerando $n-2$ grados de libertad. Estos se establecieron de acuerdo al número total de concentraciones probadas por bioensayo, con tres réplicas por concentración ($n = 15$). Los recipientes

tes que presentaron respuestas extremas (0 y 100 %) se eliminaron. Los altos valores de varianza de los ajustes pueden deberse a la dispersión de los datos en las soluciones de baja concentración dentro de un mismo bioensayo y a los pocos grados de libertad (g.l. = 10) considerados.

La tendencia de las rectas (Fig. 5) de converger en valores cercanos a 1.88, significa que la mitad de la población de nauplios (probit = 5) en cada bioensayo responden de similar forma ante concentraciones medias y altas pero en forma variable con bajas concentraciones.

El Análisis de Covarianza de las pendientes (b) se empleó para determinar la consistencia en la respuesta de los organismos para las diferentes repeticiones del bioensayo. Las rectas ajustadas muestran distintos valores de pendiente por lo que es necesario asegurarse si esa diferencia es real o aparente. Dos rectas con similares valores de toxicidad aguda pero con diferentes pendientes podría indicar diferencias en la composición del tóxico, en la salud o en la sensibilidad de los organismos de prueba (Buikema et al., 1982).

La sensibilidad del segundo estadio larvario protozoa a la solución tóxica (Fig.7) es aparentemente mayor a la del estadio nauplio. Lo anterior es notorio desde los bioen-

sayos preliminares y es confirmado por los valores de mortalidad de los bioensayos con renovación del medio (Tabla III). La toxicidad de la solución sobre el estadio protozoa se refleja en la mortalidad producida desde tempranas horas (Fig. 8), a diferencia de lo ocurrido en el estadio anterior.

La declinación en la actividad de las larvas protozoas que permanecieron en el fondo de los recipientes, podría deberse a que ciertos hidrocarburos producen anestesia y narcosis en bajas concentraciones (Botello, 1979 a). Tatem (1974) reporta alteraciones de metabolismo en larvas expuestas a bajas concentraciones de 0.5 y 0.8 ppm de hidrocarburos, tales como menores consumos de oxígeno y alimento.

Se refleja nuevamente agrupamiento de los valores de sobrevivencia formándose tres grupos (Fig. 8): la solución que afecta la sobrevivencia en un 40 %, las soluciones que la afectan en mayor proporción (hasta un 70 y 80 %), y por último las que producen mortalidad total a las 36 horas.

Para estimar la Dosis Letal Media con mayor precisión se utilizó los valores de mortalidad de los bioensayos de protozoa a las 18 horas. La precisión de la estimación de la DL 50 depende en gran medida de la cantidad de valores con efecto intermedio, es decir, los recipientes donde no se presenta mortalidad y tampoco se produce la mortalidad

total. Estos valores corresponden teóricamente a valores Probit de $-\alpha$ a $+\alpha$ (Finney, 1971; Buikema et al., 1982).

Los valores de mortalidad del bioensayo No. 2, se eliminaron al comprobar la alta mortalidad de los organismos en los recipientes control (73 %), lo que refleja una pobre salud.

Las larvas de camarón en estadio protozoa expuestas a la FSC presentan una amplia variedad de respuesta en las diferentes repeticiones de los bioensayos (Tabla IV). A pesar de esto, el Análisis de Covarianza muestra que no hay diferencias significativas entre sus pendientes.

La DL 50 a 18 hrs. se calculó en 58.8 % (v/v). Los límites de confianza estimados resultan un poco más amplios que los calculados para la DL 50 de nauplio, atribuido a la mayor variabilidad de respuesta mostrada por las larvas en estadio protozoa.

La mayor sensibilidad del segundo estadio podría estar implícito en la etapa crítica del desarrollo larvario del camarón. El valor de DL 50 ha sido determinado después de estimar la corrección por mortalidad natural mediante la fórmula de Abbott (Finney, 1971). En incubaciones normales de laboratorio la mortalidad natural durante el estadio protozoa puede alcanzar valores hasta del 50 % (Ernestina Almada, comunicación personal; Perez et al., 1982). Por otra parte, el primer estadio larval nauplio, presenta cierta

- Ernestina Almada. CICTUS: Unidad Experimental Kino.

independencia del medio ambiente externo al satisfacer sus requerimientos alimenticios con sus propias reservas de vitelo (Sánchez, 1985).

Las postlarvas examinadas presentan una amplia tolerancia a la solución tóxica probada. Esta respuesta es observada desde los bioensayos preliminares (Fig. 3). Contrariamente a los estadios larvales considerados, la sensibilidad de las postlarvas no se ve incrementada ni cuando se renueva la FSC ni cuando se aumenta el tiempo de exposición. La FSC no alcanza a afectar al 50 % de la población de postlarvas por lo cual no se estimó la DL 50. Anderson et al. (1974 b) determinaron las DL 50 para postlarvas de *E. aztecus* en 96 horas de exposición en bioensayos estáticos como 6.6 ppm (HT) para el aceite no. 2 y 1.9 ppm (HT) para el bunker C.

La concentración de naftaleno de la FSC es similar a las reportadas por estos autores para su FSP; por lo que esperaríamos encontrar similar sensibilidad. Vanderhorst et al. (1976) y Anderson et al. (1980) afirman que se presenta una mayor sensibilidad de los organismos al exponerlos a medios con soluciones renovables, lo que no ocurrió

dio. Esto podría indicar que las postlarvas de camarón azul son más resistentes a los hidrocarburos de petróleo, o bien que existen otras fracciones aun no identificadas (además del naftaleno) que influyen en la toxicidad de los aceites como ya ha sido sugerido por Tatem et al. (1978) para el caso de *P. aztecus*.

La comparación total con otros trabajos resulta imposible por tratarse de diferentes aceites, diferentes especies y sometidos a diferentes condiciones experimentales.

La relación entre concentración y mortalidad se presenta como una recta horizontal paralela al eje de la concentración cuando la solución no es lo suficientemente tóxica (Buikema et al., 1982). Seguramente por eso resultan los bajos valores de determinación r^2 (Tabla VI) (Zar, 1974).

Se calculó el parámetro de Dosis Letal 16 (DL 16 a 48 hrs.) como una referencia de la tolerancia de las postlarvas. Los valores se presentan bastantes consistentes y los límites de confianza se observan muy amplios; debido a que se trata de un parámetro bastante alejado al valor promedio de la concentración.

La estimación de la DL 50 por extrapolación no es justificable porque podría estimarse un valor que posiblemente nunca se alcanzara y los límites de confianza serían

tan amplios que tenderían al infinito (Buikema et al., 1982).

Las DL 50 de 75.8 % obtenidas para el estadio nauplio y 58.8 % para estadio protozoa muestra que ambos estadios presentan diferencias en sensibilidad a la Fracción Soluble de Combustóleo (FSC). Las DL 50 muestran límites de confianza que permiten corroborar que efectivamente existen diferencias en sensibilidad entre los dos estadios, concordando con lo reportado por Perez et al. (1982).

Anderson et al. (1980) han propuesto que la comparación de sensibilidad entre estadios se realice con base en el Índice de Toxicidad (IT) donde se incluye la Dosis Letal Media y el tiempo requerido en alcanzarla. Esto permite comparar directamente un valor obtenido a diferentes tiempos de exposición y/o a diferentes concentraciones.

Se estimó un IT (v/v.días) de 113.75 para el estadio nauplio y 44.1 para protozoa. La razón de estos índices calculados resulta un valor de 2.5. Esto significa que el estadio protozoa es casi tres veces más sensible que el nauplio. La razón entre los IT (ppm.días) de naftaleno resulta ser aun mayor: 3.8. Las diferencias entre los índices seguramente deben ser atribuidos a las concentraciones de naftaleno encontradas en las FSC.

Serralde (1984) utilizando el IT (v/v días) no encontró diferencias significativas en sensibilidad entre nauplios y protozoos de *E. duorarum* ante petróleo crudo, pero amplias diferencias (30 veces) con postlarvas.

Las Dosis Letales determinadas en este trabajo han sido establecidas bajo condiciones específicas de laboratorio: temperatura, edad o estadio larvario, tiempo de exposición, etc., por lo que su utilidad en condiciones naturales está sumamente restringida. Su aplicación se basa en establecer comparaciones de sensibilidad relativa entre estadios de un organismo, entre diversas especies o bien de un organismo ante varios aceites.

El efecto de los hidrocarburos de petróleo puede incrementarse con efectos sinérgicos. Las larvas expuestas a hidrocarburos pueden aumentar su sensibilidad en periodos de muda o ecdysis, provocando que concentraciones subletales en el medio ambiente puedan convertirse en agudas (Tatem 1974; Mecklenburg, et al., 1977). Las larvas pueden consumir alimento contaminado puesto que la materia orgánica en precipitación y el fitoplancton adsorben hidrocarburos en la columna de agua (Lee y Anderson, 1977; Ali, 1979; Burns et al., 1985)

El aceite disperso forma una capa delgada en la superficie del mar, la cual puede reducir el paso de la luz

hasta en un 90 %, con lo cual se afecta el crecimiento del fitoplancton (Gordon y Prouse, 1973; Pulich et al., 1974; Soto et al., 1975; Anderson, 1977; Soto et al., 1977). El estadio nauplio sufre cambios morfológicos drásticos e inicia la alimentación externa al consumir sus reservas de vitelo. Por lo que la sobrevivencia de la larva en esos momentos depende de que encuentre fitoplancton en calidad y cantidad suficiente. Las migraciones verticales diurnas del zooplancton también se ven alteradas al modificarse la intensidad de la luz por la cual están regidos (Botello, 1979 a).

Las postlarvas al migrar a zonas estuarinas pueden arribar a zonas costeras, dársenas portuarias y estuarios con alto contenido de hidrocarburos de petróleo. Las postlarvas tienen mayor capacidad de desplazamiento, por lo que tienen la capacidad de evitar áreas con altos niveles de contaminación. Son consideradas como organismos en la fase de transición entre las larvas planctónicas y los juveniles bentónicos por lo que posiblemente sean las más expuestas a los hidrocarburos. Se afirma que las máximas concentraciones de hidrocarburos en el medio marino se encuentran en el sedimento y en la capa de agua contigua, así como, en el agua intersticial del sedimento (Cox et al., 1975; Botello, 1979 a y b; Botello, 1980; Salas, 1984; Galindo, 1986).

Así mismo, se ha encontrado que ciertos crustáceos estuarinos incrementan su sensibilidad a los hidrocarburos

con cambios repentinos en las condiciones del medio ambiente; con bajas salinidades y/o altas temperaturas (Tatem et al., 1978) lo que podría suceder frecuentemente en áreas costeras.

5.- CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los bioensayos de toxicidad efectuados se concluye que:

- 1.- La Fracción Soluble de Combustóleo (FSC) en agua produce letalidad en los estadios larvales y postlarvales examinados.
- 2.- La FSC probada contiene valores de naftaleno que van de 0.15 ppm (sol. 40 % v/v) a 0.6 ppm en las soluciones mas concentradas (100 % v/v).
- 3.- La Dosis Letal Media (DL 50 a 36 hrs.) determinada para el estadio larval nauplio es 75.8 % (v/v) con 0.44 ppm de naftaleno.
- 4.- La Dosis Letal Media (DL 50 a 18 hrs.) para el estadio larval protozoa es 58.8 % (v/v) con 0.23 ppm de naftaleno.
- 5.- La Dosis Letal Media para postlarvas no se alcanzó a las 48 hrs. presentando alta tolerancia al tóxico para el periodo experimental probado.
- 6.- Se establecieron amplias diferencias en sensibilidad encontrandose el siguiente gradiente decreciente: protozoa, nauplio y por último las postlarvas quienes resultaron ser las mas tolerantes.

6.- RECOMENDACIONES

Es necesario continuar realizando estudios de contaminación por hidrocarburos de petróleo en el Golfo de California, puesto que los trabajos realizados son muy escasos.

Para estudios de toxicidad con este tipo de contaminante, es imprescindible normalizar algunos aspectos técnicos como son la forma de exposición de los organismos al tóxico y establecer el método más adecuado para establecer las concentraciones de hidrocarburos del medio de prueba. Esto con el objeto de generar datos que puedan ser comparables entre laboratorios de la región.

LITERATURA CITADA.

- All, M. 1979. The effects of petroleum hydrocarbons on the physiology of marine phytoplankton. 16 pp. (no publicado).
- Almada, E., J.F. Reprieto e I. Rendón. 1984. Producción de postlarvas en: Reprieto, J. y F. Rodriguez (ed.). El Cultivo del Camaron Azul *Penaeus stylirostris* Stimpson. Centro de Investigaciones Cientificas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (CICTUS). Hermosillo, Son.: 28 - 39.
- American Public Health Association. 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Franson, M. A. (ed.). APHA, Washington. 1193 pp.
- American Society for Testing and Materials 1978. Annual Book of ASTM Standards. Part 31. Water. Philadelphia. 1232 pp.
- Anderson, J.W. 1977. Effects of petroleum hidrocarbons on the growth of marine organisms. Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer. 157 - 165.
- Anderson, J. W. 1979. An assesment of knowledge concerning the fate and effects of pe-

roleum hydrocarbons in the marine environment. En: Venberg W. (ed.). Marine Pollution: Functional Responses. Academic Press. New York : 1 - 2.

- Anderson, J. W., R. C. Clark y J. Stegeman. 1974 a. Marine bioassays. workshop proceedings. Am. Petrol. Institute. Environm. Protection Agency, Mar. Tech. Soc. 75 p.
- Anderson, J.W., J.M. Neff, B.A. Cox, H.E. Tatem y G.M. Hightower. 1974 b). Characteristics of dispersions and water - soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. Marine Biology 27: 75 - 88.
- Anderson, J.W., S.L. Kiesser, R.M. Bean, R.G. Riley y B.L. Thomas. 1980. Toxicity of chemically dispersed oil to shrimp exposed to constant and decreasing concentration in a flowing system. En: Proceedings of the Third Artic Marine Oil Spill Program Technical Seminar. Edmonton Alberta: 190 - 206.
- Botello, V.A. 1975. Utilización y degradación del petróleo crudo por dos especies de camarón : Penaeus duorarum y Penaeus aztec-

- CUE. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autòn. Mèxico. 2(1): 67 - 72.
- Botello, V. A. 1979 a. Presencia e importancia de hidrocarburos fósiles en el medio ambiente marino: nota científica. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Auton. Mèxico. 6(1): 1 -6.
- Botello, V. A. 1979 b. Niveles actuales de hidrocarburos fósiles en ecosistemas estuarinos en el Golfo de Mèxico. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autòn. Mèxico. 6(1): 7 - 14.
- Botello V. A. 1980. Cuantificación de un derrame petrolero ocurrido en la Laguna de Términos, Campeche, Mèxico, 1976. An. Centro Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autòn. Mèxico. 7(1): 169 - 174.
- Buikema, A.L., B.R. Niederlehner y J. Cairns. 1982. Toxicity testing. En: Cairns J. Jr. (ed.). Biological Monitoring in Water Pollution. Pergamon Press, Oxford: 239 - 262.
- Burns, K.A., J.P.Villanueva y S.W. Fowler. 1985. Fluxes and residence times of hidrocarbons in the coastal mediterranean: how

- important are the biota?. Estuarine, Coastal and Shelf Science. 20: 213 - 330.
- Calderón - Aguilera, L.E. 1985. Efectos del petróleo sobre algunas especies de importancia comercial en el golfo de California. Informe Técnico No. III, CICTUS-CONACYT. 104 p. (no publicado).
- Carlberg, S. R., 1975. Analysis of aquatic mineral oil pollution a presentation of alternative analytical techniques. Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 1 Methods for Detections, Measurement and Monitoring of Water Pollution. FAO Fisheries Technical Paper No. 137. Rome, 1975: 85 - 97.
- Connell D. W. y G. J. Miller. 1984. Petroleum and related hidrocarbons. En: Chemistry and Ecotoxicology of Pollution. Wiley Interscience ed. New York: 228 - 249.
- Conover, R.J. 1971. Some relations between zooplankton and bunker C oil in Chedabucto Bay following the wreck of the tanker Arrow. Journal Fisheries Research Board of Canada. 28(9): 1327 - 1330.

- Cox, B.A., J.W. Anderson y J.C. Parker. 1975. An experimental oil spill: the distribution of aromatic hydrocarbons in the water sediment and animal tissues within a shrimp pond. Mem. Proceedings of Conference on Prevention and Control of Oil Pollution. San Francisco, March 25 -27., Am. Petrol. Inst. Washington D.C.: 607 - 612.
- Environmental Protection Agency. 1973. Bioassay in Pollution Analysis and Control. Training Program Course Manuscript. Washington D.C. 106 pp.
- Finney, B. J. 1971. Probit Analysis. 3rd. ed. Cambridge University Press. London. 333 p.
- Galindo, R. S. 1986. Contaminación por hidrocarburos en el estero de Urias, Mazatlán, Sinaloa. Mem. I Encuentro sobre Investigaciones en el Mar de Cortes. Hermosillo, Sonora. Abril 9-11, 1986. (en prensa).
- Gordon, D.C. y N.J. Prouse. 1973. The effects of three oils in marine phytoplankton photosynthesis. Marine Biology. 22: 329 - 333.

- Horn, H.J. 1956. Simplified LD 50 (or ED 50) calculations. *Biometrics*. 311 - 322.
- Katz, L.M. 1973. The effects of water soluble fractions of crude oil on larvae of the decapod crustaceans *Neopanope texana* (sayi). *Environm. Pollut.* 5: 199 - 204.
- La Roche, G., R. Eisler and C.M. Tarzwell. 1970. Bioassay procedures for oil and oil - dispersant toxicity evaluation. *Journal Wat. Poll. Control. Fed.* 42 (11): 1982 - 1989.
- Lawrence, A., M. Johns y W. Griffin. 1983. Shrimp Mariculture State of the Art. Texas A & M University Sea Grant College Program. 11 p.
- Lee, R.F. 1974. Accumulation and turnover of petroleum hydrocarbons in marine organisms. En: Wolfe D.A. (ed.). *Fate and Effects of Petroleum in Marine Ecosystems and Organisms*. Pergamon Press. Oxford: 60 - 70.

- Lee, R. F. 1977. Fate of petroleum hydrocarbons in marine animals. *Oceans* 40: 1 - 4.
- Lee, F. R. y J. W. Anderson. 1977. Fate and effects of naphthalenes: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.*: 27 (1) 127 - 134.
- Little, T. M. y F.J. Hills. 1981. Métodos Estadísticos para la Investigación en Agricultura. Ed. Trillas. México. 235 p.
- Mecklenburg, T.A., S. Rice y J.F. Karinen. 1977. Molting and survival of king crabs (*Paralithodes camtschatica*) and coon stripe (*Pandalus hipsinotus*) larvae exposed to cook inlet crude oil water soluble fractions. En: Wolfe, D.A. (ed.). *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems and Organisms*. Pergamon Press. Oxford: 221 - 228.
- Mendoza, A. R. 1985. Observaciones sobre la producción de nauplio a partir de poblaciones cultivadas, silvestres y mixtas de camarón azul (*Penaeus stylirostris*). Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP - IZTACALA. México D.F. 63 p.

- Neff, J.M. y J.W. Anderson. 1975. An ultraviolet spectrophotometric method for the determination of naphthalene and alkyl-naphthalenes in the tissues of oil contaminated marine animals. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 14 : 122 - 128.
- Neff, J.M., J.W. Anderson, B.A. Cox, R. B. Laughlin, S.S. Rossi y H.E. Tatem. 1976. Effects of petroleum on survival, respiration and growth of marine animals. En: Sources, Effects and Sink of Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Proceedings of the Symposium American University. Washington D.C: 516 - 540.
- Perez L. A., M. Serralde, I. Rendón, M. López, R. Delgado y A. Bernal. 1982. Estimación del efecto del petróleo crudo del Ixtoc I y del dispersante, sobre larvas, postlarvas, juveniles y adultos del camarón y adultos de ostión y pulpo por medio de bioensayos. Programa Coordinado de Estudios Ecológicos en la Sonda de Campeche. Proyecto No. 13. Informe Final. CICTUS. Hermosillo, México. 130 p.

- Pulich, W.M., K. Winter y C. Van Baalen. 1974. The effects of the no. 2 fuel oil and two crude oils on the growth and photosynthesis of microalgae. *Marine Biology*. 28: 87 - 94.
- Reprieto, J.F. 1984. Cultivo de diatomeas. en: Reprieto, J. y F. Rodriguez (ed.). El Cultivo del Camarón Azul *Penaeus stylirostris* Stimpson. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. Hermosillo, Son. México: 40 - 50.
- Rice, D. S., J. W. Short y J. F. Karinen. 1974. Comparative oil toxicities and comparative animal sensitivity. En: Wolfe, D.A. (ed.). Fate and Effects of Petroleum in Marine Ecosystems and Organisms. Pergamon Press. Oxford. 78 - 94.
- Rodriguez de la Cruz, M. C. 1981. Estado actual de la pesquería de camarón en el pacífico mexicano. *Ciencia Pequera Inst. Nal. Pesca. Depto. Pesca. México*. 1(1): 53 - 60.
- Rodriguez de la Cruz, M.C. y J.F.J. Rosales, 1974. Análisis del estado de la población

camaronera del genero *Penaeus* en la parte central del Golfo de California. INP. Mem. V Congres. Nac. Ocean. Guaymas Son. México. 1977.

Salas, L.M. 1984. Determinación de hidrocarburos derivados del petróleo en las aguas y aceites de la capa superficial del agua y sedimento en la dársena del puerto de Ensenada B.C. en condiciones de baja producción pesquera. Tesis Profesional. Escuela Superior de Ciencias Marinas. Ensenada B.C. 90 p.

Sanborn, H. R. y Malins. 1977. Toxicity and metabolism of naphthalene: a study with marine larval invertebrates. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 154: 151 - 155.

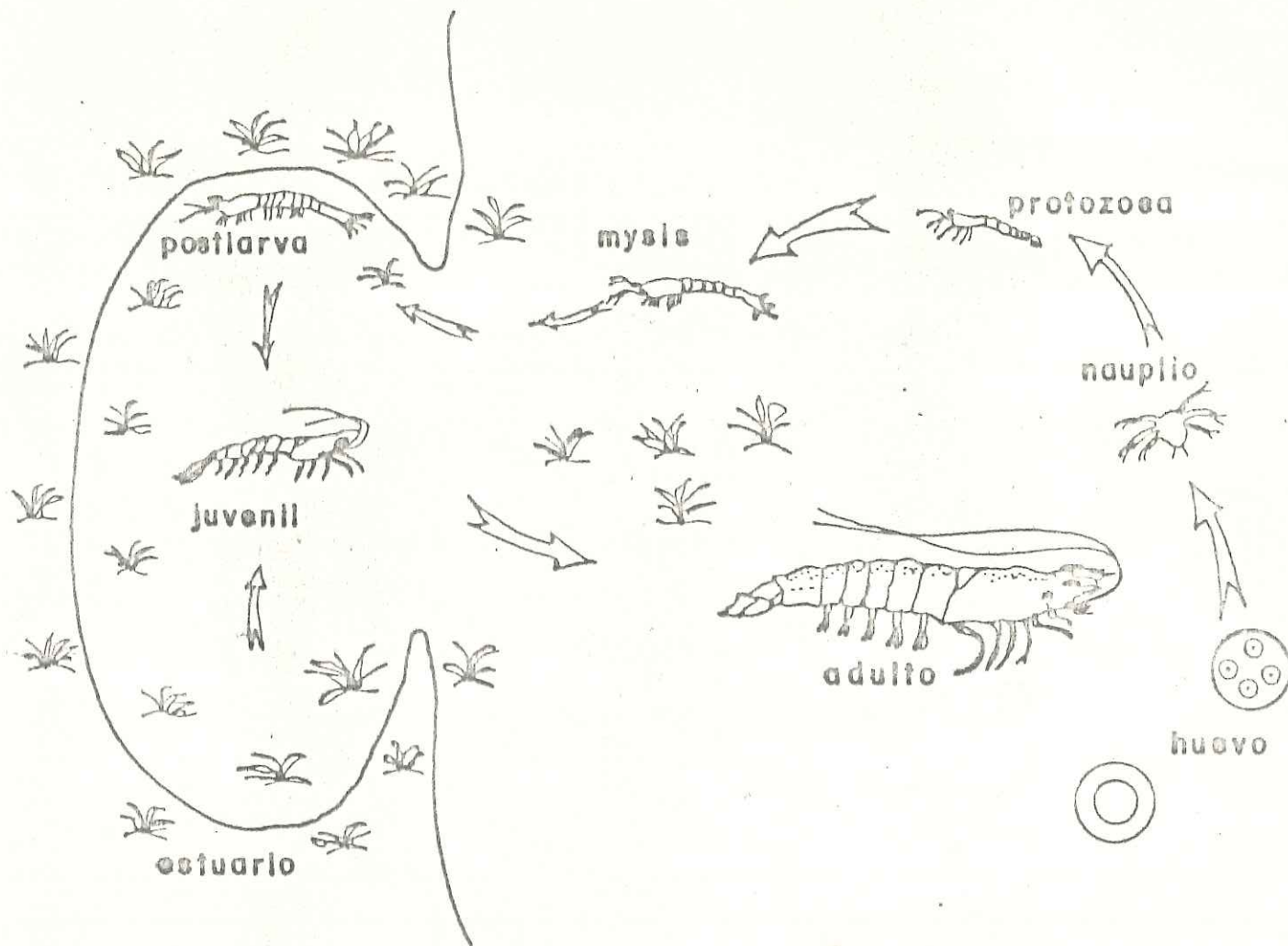
Sanchez, M. J. 1985. Toxicidad del o-s dimetil fosforoamidiotioato (tamarón) a larvas de *Penaeus stylirostris* y *Macrobrachium rosenbergii*. Tesis Maestria. ITSM. Escuela Cs. Marítimas y Alimentarias. Guaymas, Son. 51 p.

- Serralde, M. 1984. Contribución al estudio del efecto del petróleo akal-c y del dispersante corexit 9527, sobre los diferentes estadios de camarón rosado *Penaeus duorarum duorarum* (burkenroad). Tesis Profesional. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 51 p.
- Soto, C., J. A. Hellebust y T. C. Hutchinson. 1977 II. photosynthesis and uptake and release of naphthalene. Can. J. Bot. 53: 118 - 126.
- Soto, C., J. A. Hellebust, T.C. Hutchinson y T. Sawa. 1975. Effects of naphthalene and aqueous crude oil extracts on the green flagellate *Chlamydomonas angulosa*. I. growth. Can. J. Bot. 53: 109 - 117.
- Stegeman, J. 1977. Fate and effects of oil in marine animals. Oceanus 20 (4) : 59 - 66.
- Tatem, H. E. 1974. Accumulation of naphthalenes by grass shrimp effects on respiration, hatching and larval growth. En: Wolfe, D.A. (ed.) Fate and Effects of Petroleum in Marine Ecosystems and Organisms. Pergamon Press. Oxford : 201 - 209.

- Tatem, H.E., B.A. Cox y J.W. Anderson. 1978. The toxicity of oils and petroleum hydrocarbons to estuarine crustaceans. *Estuarine and Coastal Marine Science*. 6 : 365 - 373.
- Valverde, P. F. 1986. Profundidad de máximos desoves y profundidad de ocurrencia de los nuevos reclutas de camarón azul (*Penaeus stylirostris*) y camarón café. (*Penaeus californiensis*) en el Golfo de California durante la temporada 1985 - 1986. Mem. I Encuentro sobre Investigaciones en el Mar de Cortes. Hermosillo, Sonora Abril 9-11, 1986. (en prensa).
- Vanderhorst, J. R., C. I. Gibson, L. J. Moore. 1976. Toxicity of no.2 fuel oil to coon stripe shrimp. *Mar. Poll. Bull.* 7(6):106 - 107.
- Vaughan, B. E. 1973. Measurement of petroleum hydrocarbons in water samples. En: Vaughan, B. E. (ed.) *Effects of Oil and Chemically Dispersed Oil on Selected Marine Biota*. API Publication No. 4191. Washington: 6 -9.
- Wells P. G. y J.B. Sprague. 1976. Effects of crude oil on american lobster (*Homarus americanus*) larvae in the laboratory. *J. Fish. Res. Board Can.* 23 : 1604 - 1614.

Zar, J.H. 1974. Biostatistical analysis. Prentice
Hall, New Jersey. 619 p.

A P E N D I C E S



A I.. Ciclo de vida de los camarones penelidos .
Tomado de Lawrence et al., (1983).

- A II : Características físico-químicas del combustible utilizado en generadores de vapor.
- 1) Manual de Especificaciones : Superintendencia de Ventas, Pemex.
 - II) Análisis del Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE) de la Comisión Federal de Electricidad (CFE) .

CARACTERISTICAS I	ANALISIS TIPICO	METODOS ASTM
Peso específico a 20/4°C	0.982	D-1298-67
Temperatura de inflamación	103.0	D- 93-73
Viscosidad F.S. a 50°C Seg.	510.0	D- 88-56
Azufre total, % en peso	3.3	D- 189-65
Cenizas % en peso	0.32	D- 482-73
Poder calorífico neto, Kcal/Kg	10,400.0	-----
CARACTERISTICAS II		
Tensión superficial	29.87	
Gravedad API	12.11	
Polar poliarmáticos (% en peso)	30.05 %	
Aromáticos	" 28.15 %	
Saturados	" 28.05 %	
Asfaltenos	" 11.89 %	