

# Efecto del Petróleo Crudo sobre los Moluscos Comerciales Litorales *Donax denticulatus* y *Crassostrea rhizophorae* en Venezuela

GENOVEVA DE MAHIEU, GUILLERMO MASCITTI Y KLAUS JAFFE

*Departamento de Biología de Organismos*

*Universidad Simón Bolívar*

*Caracas, Venezuela*

## ABSTRACT

The effect of different concentrations of light crude petroleum (Lagocinco-Maraven) on the survival and behavior of the commercial species *Donax denticulatus* and *Crassostrea rhizophorae* of Tucacas and Morrocoy areas (State of Falcón) were studied.

The results suggest a higher sensitivity to toxicity for *D. denticulatus*. At the same time, clear behavioral changes were observed in this species with concentrations of petroleum higher than 2,000 ppm, whereas *C. rhizophorae* did not show significant changes at these concentrations with the methodology used.

The changes in the composition of the water soluble fraction of petroleum was studied as a function of time. The survival curves for both species were analysed in relation to the stability of the water soluble fraction. The possible significance of these results is discussed as a function of an eventual oil spill.

## INTRODUCCION

Si bien existe, sobre todo en las últimas décadas, abundante bibliografía en lo que respecta a la contaminación por petróleo en organismos marinos, recopilado y analizado entre otros autores por Nelson-Smith (1973), Malins (1977) y Venberg et al. (1979), la información sobre efectos tóxicos de petróleo sobre organismos de las costas venezolanas es bastante escaso. Solo se conocen referencias sobre bioensayos en *Penaeus schmitti*, *Mugil curema* y *Centropomus ensiferus* con petróleo crudo del lago de Maracaibo (Battelle, 1974) donde existen condiciones hidrográficas distintas a las que rigen en mar abierto o zonas costeras; los estudios de Vallota y Patiño (1980) acerca de la toxicidad del petróleo crudo Lagocinco-Maraven sobre *Mellita quinquesperforata* y *Penaeus brasiliensis* y los de Mahieu y Gamba (1980) sobre comportamiento de *Excirolana braziliensis* ante derrames artificiales en la zona costera Centro-Occidental venezolana, con el mismo tipo de petróleo.

El objetivo de este trabajo fue analizar algunos aspectos de la toxicidad del petróleo crudo Lagocinco-Maraven, mediante bioensayos y el estudio de las modificaciones comportamentales inducidas por el petróleo en dos especies sujetas a explotación semi-comercial en la región Centro-Occidental de Venezuela: *Donax denticulatus* y *Crassostrea rhizophorae*, así como realizar algunos estudios preliminares sobre la evolución de ciertos compuestos hidrosolubles del petróleo, a algunas de las concentraciones utilizadas en los experimentos de bioensayo.

## MATERIALES Y METODOS

### Bioensayos

Los organismos utilizados fueron: *Donax denticulatus* (15-18 mm de longitud)

proveniente de la zona de Tucacas y *Crassostrea rhizophorae* (25-35 mm de longitud) del Parque Nacional de Morrocoy, ambas zonas de la región Centro-Occidental de Venezuela, Estado Falcón. Los períodos de colecta para la etapa experimental fueron durante la estación de lluvias entre mayo y julio de 1980.

Entre enero y mayo se realizaron experimentos de aclimatación en condiciones de laboratorio a 25° C y 30 ppt de salinidad. Se logró una sobrevivencia del 100% durante un mes para *D. denticulatus* renovándose, para esta especie, semanalmente el agua de los acuarios. Para *C. rhizophorae* se logró una sobrevivencia del 100% durante más de 3 meses, sin renovación periódica del agua y alimentándola semanalmente con una dieta de *Thalassiosira* sp.

Se realizaron ensayos estáticos de hasta 96 h. Se vertió la cantidad de petróleo necesaria sobre la superficie del agua, sin homogeneización ni renovación periódica de ésta, con aeración continua y manteniéndose la temperatura a 25° C ± 1° C.

Los recipientes de experimentación fueron acuarios de vidrio de 15 l de capacidad, solidos y circulares. Se colocó en cada uno de estos, 10l de agua de mar (30 ppt) proveniente de la zona de recolección. En el caso particular de *D. denticulatus* se colocó en el fondo del acuario un espesor de 5 cm de arena de grano muy fino (0.062-0.125mm) escala de clasificación de Wentworth en Holme y McIntyre (1971) proveniente de la playa de Tucacas.

Previo a los ensayos, los organismos colectados fueron sometidos a una aclimatación de 5 días a las condiciones experimentales (25° C, 30 ppt 10l de agua), 10 min antes del inicio del ensayo se colocaron 10 individuos en cada acuario. Con este procedimiento se trató de asegurar las condiciones adecuadas del agua.

A los 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 33 h, 48 h, 72 h y 96 h (Sprague, 1973) se efectuaron las siguientes observaciones para *D. denticulatus*: número de individuos muertos, enterrados, semienterrados, desenterrados y sifones extendidos. Para *C. rhizophorae*, a los mismos tiempos se controló: número de individuos muertos y número de individuos con las valvas abiertas con reacción de cierre al tocar con una varilla metálica.

Tabla 1. Características del petróleo crudo "Langocinco" indicados por "Maraven"

Característico	Valor
Gravedad específica 15/4° C	0,852
Gravedad API 60° F	34,5°
Viscosidad cinemática a 100° F	69 C.S.
Azufre	1,3 % peso
Contenido de parafinas (Shell method)	4,3 % peso
Pour point (ASTM max.)	-30° C
H <sub>2</sub> S existente	10 ppm (peso)
H <sub>2</sub> S potencial	256 ppm (peso)
Benceno	0,01% peso
Asfalteno	11,7% peso

Los ensayos de toxicidad se efectuaron con petróleo crudo liviano Lagocinco (Tabla 1) midiendo los efectos para *D. denticulatus* a los: 1.000, 2.000, 4.000, 8.000 y 16.000 ppm y para *C. rhizophorae*: 2.000, 16.000, 32.000, 64.000 y 128.000 ppm.

Se definió como criterio de muerte en el caso de *D. denticulatus* la falta de reacciones al tocar con una varilla metálica el pié, el manto y los sifones (Bodoy, 1976), cuando el animal permanecía desenterrado y con las valvas abiertas. Para *C. rhizophorae* se consideró como criterio la falta de reacciones (cerrar) al tocar las valvas cuando estas se encontraban abiertas. Las estimaciones de las LD<sub>50</sub> fueron realizadas según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

#### Extracción y Análisis de la Fracción Hidrosoluble del Petróleo

El método de extracción utilizado consistió en tomar 1 l de agua de acuarios con 10 l de agua de mar en las mismas condiciones que los bioensayos, con 2.000, 8.000, 16.000, 32.000 y 128.000 ppm de petróleo, con la ayuda de un sifón. Se extrajo el petróleo disuelto con 3 lavados consecutivos con porciones de 50 ml de n-hexano (para espectroscopia, Riedel-de Haen AG). Se juntaron los lavados, se secó con granulos de cloruro de calcio (pro-analisis, Merck) y se concentró por evaporación a presión reducida y por soplado con gas carbónico seco (Vallota y Patiño, 1980). De esta forma se logró concentrar la muestra hasta llegar a una cantidad de 100 µl (Factor de concentración 10<sup>4</sup>). De la muestra concentrada se tomaron alicuotas de µl para análisis por el cromatógrafo de gases (Perkin Elmer 3940, columnas de acero de 1/8 pulg. diámetro interno de 3 m de largo rellenas con 3% OV 17 sobre Varaport 30, Flujo de N<sub>2</sub>, 25 ml/min.)

Tabla 2. Valores utilizados para la estimación de la LD<sub>50</sub> 72 h para *Donax denticulatus*

Dosis	10 <sup>3</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	Total
Número de muertos	0	9	24	30	
Total de individuos	30	40	31	30	131
% de muertos observados	0 (0,18)*	22,5	77,5	100	
% de muertos esperados	0,59	21	82	99,55	
% observado -% esperado	0,41	1,5	4,5	0,15	
Contribución al (Chi) <sup>2</sup>	0,0018	0,0110	0,0135	0	0,0263

\*Según tabla de Litchfield

K = 4; Promedio de individuos por dosis = 32,75; (Chi)<sup>2</sup> = 0,861 n = 2; (Chi)<sup>2</sup> < 5,99

LD<sub>16</sub> = 1820 ppm; LD<sub>50</sub> = 2750 ppm; LD<sub>84</sub> = 4150 ppm.

S = 1,51; f<sub>1,LD50</sub> = 1,15; R = 8; A = 1,095; f<sub>8</sub> = 1,08; LD<sub>50</sub> = 2.750 ppm (de 2.391 a 3.163).

Las muestras se corrieron en el cromatógrafo con un programa de temperatura que fue el siguiente: T inicial: 80° C por 2 min, tasa de aumento de T: 8° /min, T final: 180° C.

Para analizar los resultados, se calculó el área de 10 picos representativos de los cromatogramas y se calcularon las fracciones de cada área en relación a uno de los picos. El pico escogido como referencia fue el que mostró menor variación bajo las diferentes condiciones experimentales.

## RESULTADOS

### Estimación de las Dosis Letales Medias (LD<sub>50</sub>)

#### *Donax denticulatus*

Se realizó un total de 4 ensayos para cada uno de los puntos de 16.000 y 2.000 ppm de petróleo agregado, y tres ensayos para cada uno de los puntos de 8.000, 4.000, 1.000 y control. Para cada ensayo se utilizó un total de 10 individuos.

Para las 72 h de experimentación no se observó mortalidad a los 1.000 ppm de petróleo agregado. El porcentaje de muertos alcanzó un valor de 100% a los 8.000 ppm mientras que para los 2.000 y 4.000 ppm este se mantuvo en 22,5% y 77,5% respectivamente (Tabla 2). El valor estimado de la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) es de 2.750 ppm con límites de confianza entre 2.381 y 3.163 ppm (Tabla 2 y Fig. 1).

A las 96 h de experimentación se observó 0% y 100% de mortalidad para respectivamente los 1.000 y 8.000 ppm de petróleo agregado, mientras que a los 2.000 y 4.000 ppm el porcentaje de muertes alcanzó los valores de 35% y 97%. La dosis letal media dió un valor estimado de 2.400 ppm con límites de confianza entre 2.069 y 2.784 ppm (Tabla 3 y Fig. 2).

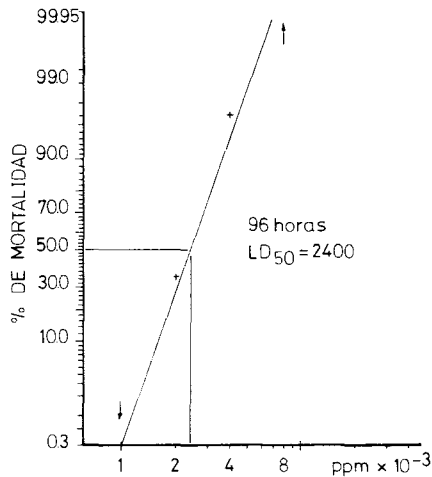
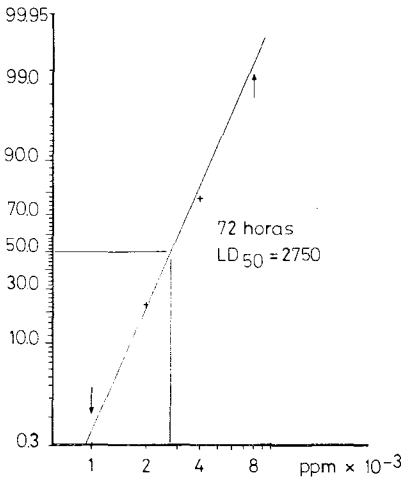


Figure 1. (Izquierda) Grafico, realizado en papel Log-Probit, utilizado para la estimación de la Dosis Letal Media (LD<sub>50</sub>) a las 72 h para *Donax denticulatus*.

Figure 2. (Drecha) Grafico, realizado en papel Log-Probit, utilizado para la estimación de la Dosis Letal Media (LD<sub>50</sub>) a las 96 h para *Donax denticulatus*.

Tabla 3. Valores utilizados para la estimación de la LD<sub>50</sub> 96 h para *Donax denticulatus*

Dosis (ppm)	10 <sup>3</sup>	2 x 10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	Total
Número de muertos	0	14	30	30	
Total de individuos	30	40	31	30	131
% de muertos observados	0 (.009)*	35	97	100	
% de muertos esperados	0,3	28	94	99,98	
% observado -% esperado	0,21	7	3	0,02	
Contribución al (Chi) <sup>2</sup>	0,0014	0,025	0,016	0	0,0424

\*Según tabla de Litchfield

K = 4; Promedio de individuos por dosis = 32,75; (Chi)<sup>2</sup> = 1,39 n = 2; (Chi)<sup>2</sup> < 5,99

LD<sub>16</sub> = 1.750 ppm; LD<sub>50</sub> = 2.400 ppm; LD<sub>84</sub> = 3.300 ppm.

S = 1,373; f<sub>LD50</sub> = 1,16; R = 8; A = 1,055; f<sub>S</sub> = 1,07 LD<sub>50</sub> = 2.400 ppm (de 2.069 a 2.784)

K = Número de dosis; n = grados de libertad; S = pendiente.

R = relación entre la dosis más grande y la más pequeña.

A = valor derivado de S y R, f<sub>LD50</sub> y f<sub>S</sub> = factores para LD<sub>50</sub> y S.

### *Crassostrea rhizophorae*

Se realizó un total de tres ensayos para cada uno de los puntos de 2.000, 32.000, 64.000, 128.000 ppm y control, y cinco ensayos para el punto de 16.000 ppm de petróleo agregado. Para cada ensayo se utilizó un total de 10 individuos.

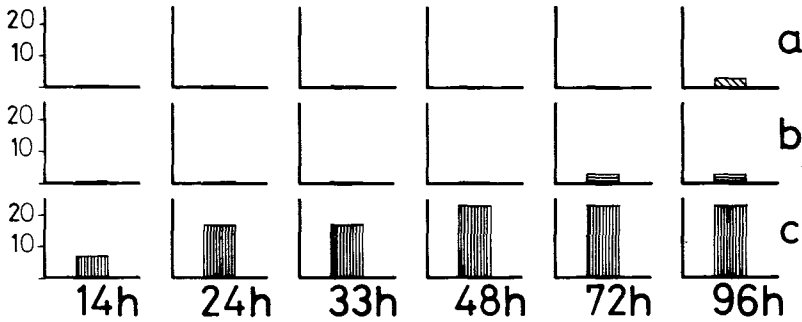
Las cantidades de 2.000 y 16.000 ppm de petróleo agregado no causaron muertes bajo las condiciones y tiempo de experimentación empleados. Para el punto de 128.000 ppm se observó una mortalidad final a las 96 h de 23%. Este porcentaje ya se había alcanzado a las 48 h, mientras que a las 14 h de experimentación, tiempo en que aparecieron los primeros muertos, se observó un porcentaje de 7%. La mortalidad observada a los 64.000 ppm representa un porcentaje final de 3%, valor ya alcanzado a las 72 h. El mismo valor final de muertos se observó para los 32.000 ppm (Fig. 3).

### Modificaciones Comportamentales Inducidas por Petróleo

#### *Donax denticulatus*

Se intentó hacer una descripción de las modificaciones comportamentales para cada concentración en función del tiempo de exposición (Fig. de 4 a 9). Se pudo apreciar que la secuencia de comportamientos entre el estado normal de entierro y el de la muerte es la siguiente: enterrado, semienterrado, desenterrado y muerte.

## % DE MUERTES



a=32.000ppm b=64.000ppm c=128.000ppm

Figure 3. Mortalidad de *Crassostrea rhizophorae* sometida a varias concentraciones de petróleo crudo.

Todos los puntos desde 2.000 hasta 16.000 ppm alcanzaron sus valores máximos de semienterramiento a las 14 h de exposición. En las horas siguientes estos valores disminuyeron aun que con cierta fluctuación en el caso de los 2.000 ppm.

Para los 1.000 ppm se observó el valor más alto de semienterramiento, por primera vez, a las 24 h, este porcentaje disminuyó hasta el nivel de cero (48 h) para volver al mismo valor que entre las 72 y 96 h. Para el estado desenterrado se constató que en los puntos de 2.000, 4.000 y 16.000 ppm se alcanzó el máximo porcentaje a las 33 h de exposición. Para los 8.000 ppm este máximo se observó a las 24 h, mientras que a los 1.000 ppm el porcentaje más alto se notó a las 48 h. En todos los puntos,

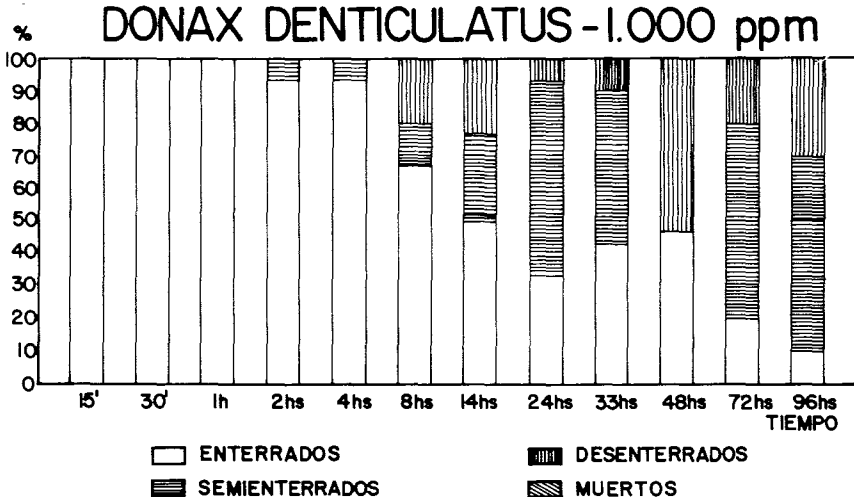


Figure 4. Evolución del comportamiento de *Donax denticulatus* sometido a 1.000 ppm de petróleo crudo.

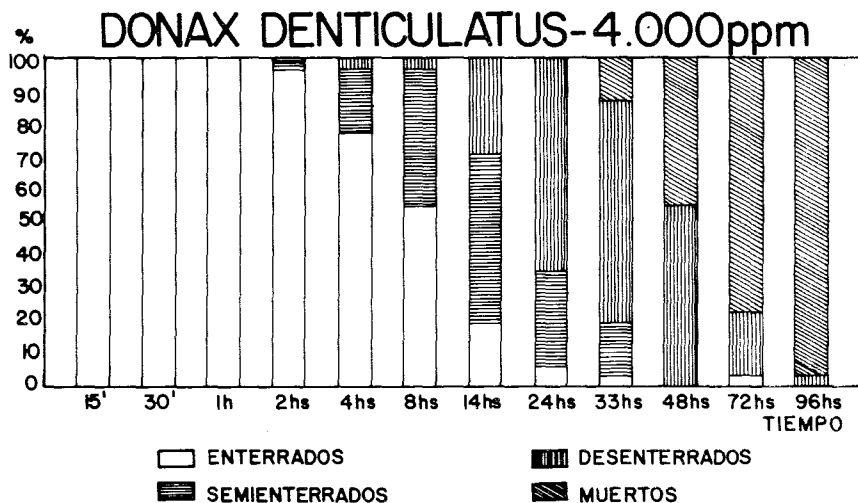
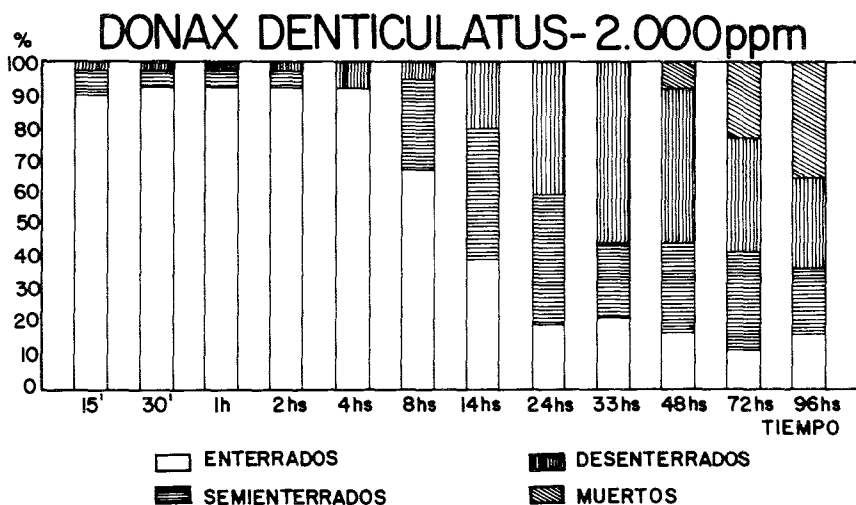


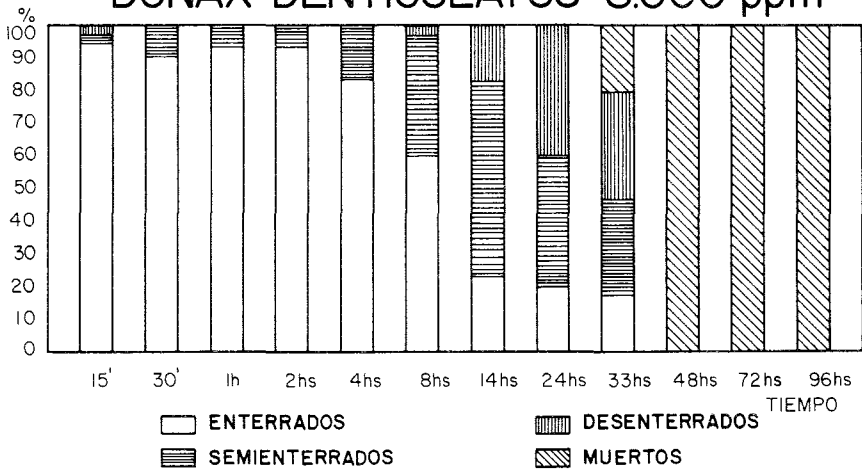
Figure 5. Evolución del comportamiento de *Donax denticulatus* sometido a 2.000 ppm de petróleo crudo.

Figure 6. Evolución del comportamiento de *Donax denticulatus* sometido a 4.000 ppm de petróleo crudo.

excepto a los 1.000 ppm donde hay cierta fluctuación, los porcentajes, una vez alcanzados sus máximos disminuyeron.

En el caso del estado enterrado, para los puntos de 1.000 y 4.000 ppm se observó una disminución, con respecto al 100% inicial, solamente a partir de las 2h, regular y rápidamente para los 4.000 ppm y con cierta fluctuación, pero más lentamente, para los 1.000 ppm. En los demás puntos ya desde la primera observación a los 15 min se constató una pequeña disminución. Hasta las 2 h estos valores no superaron nunca

## DONAX DENTICULATUS - 8.000 ppm



## DONAX DENTICULATUS - 16.000 ppm

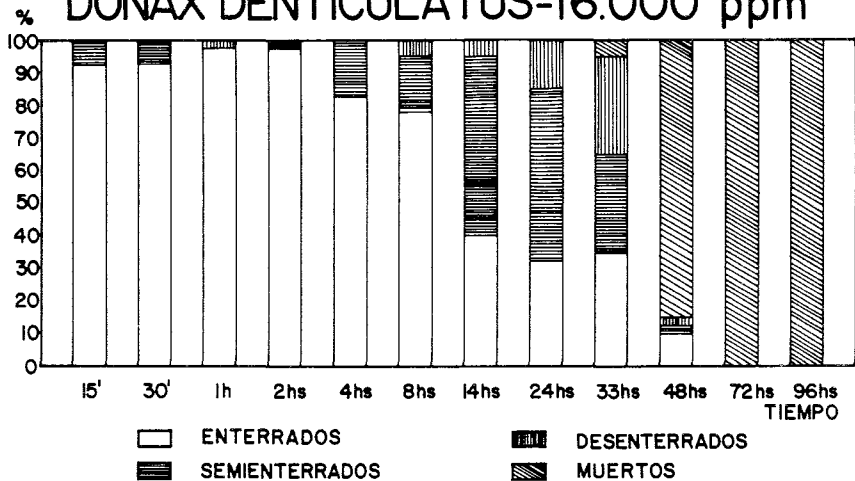


Figure 7. Evolución del comportamiento de *Donax denticulatus* sometido a 8.000 ppm de petróleo crudo.

Figure 8. Evolución del comportamiento de *Donax denticulatus* sometido a 16.000 ppm de petróleo crudo.

el 10% de disminución. A partir de las 4 h los porcentajes, en estos puntos, decrecieron.

No se constató mortalidad a los 1.000 ppm. Para los 2.000 ppm, los primeros casos de muerte aparecieron a las 48 h mientras que para los puntos de 4.000, 8.000 y 16.000 ppm esto sucedió a las 33 h. El 100% de mortalidad solamente se obtuvo en los puntos de 8.000 y 16.000 ppm a las 48 h para el primero y a las 72 h para el segundo. Para los 4.000 ppm, la mortalidad alcanzó un porcentaje muy elevado

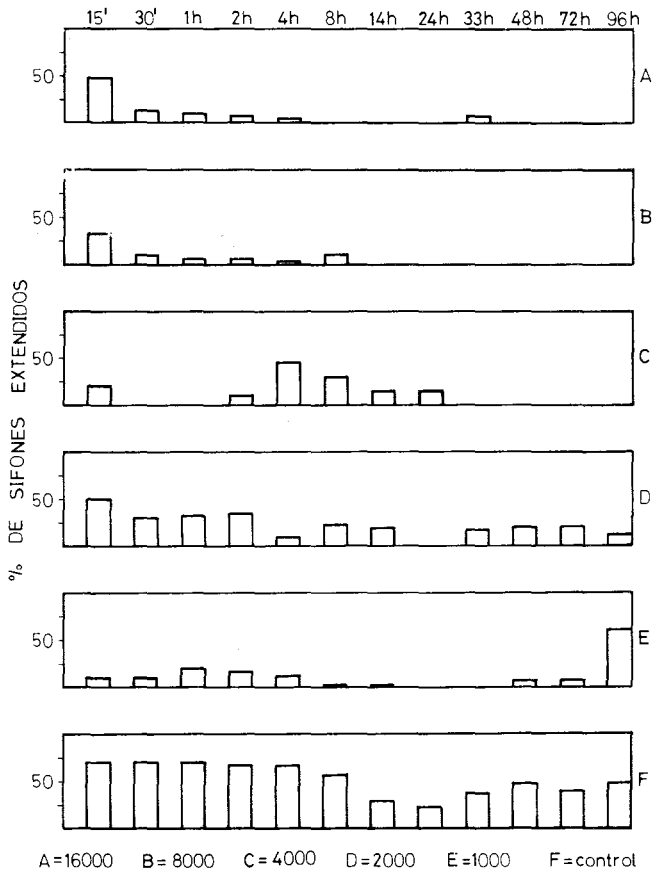


Figure 9. Modificaciones del porcentaje de sifones extendidos de *Donax denticulatus* sometido a cantidades crecientes de petróleo crudo.

(97%) mientras que en los 2.000 ppm no superó el 35%.

Analizando el porcentaje de sifones extendidos en el tiempo en función de la cantidad de petróleo agregado, se observó un cese total de la actividad a partir de las 8 h para los 8.000 ppm y a partir de las 24 h para los 4.000 ppm. La evolución, anterior a esas horas, para los dos puntos fué distinta en cada caso. Para los 8.000 ppm, se notó una disminución progresiva de la actividad excepto a la hora 8 de exposición donde se notó un ligero aumento de esta. Para los 4.000 ppm a los 30 min y 1 h de exposición no se observó actividad, esta recomenzó a las 2 h para aumentar a las 4 h y luego disminuir progresivamente hasta las 24 h.

En el punto de 16.000 ppm, se observó una disminución progresiva hasta las 4 h, importante entre los 15 y los 30 min, más lenta a partir de los 30 min. A partir de las 8 h esta se detuvo. Excepto a la hora 33 donde se notó una ligera actividad.

Para los 2.000 y 1.000 ppm, la evolución del porcentaje de sifones extendidos fue distinta que en los otros casos, en efecto, no se observó un paro definitivo de la

actividad, aun que esta cesó temporalmente a las 24 h para los 2.000 ppm y a las 24 y 33 h para los 1.000 ppm.

En el control se observó una disminución progresiva a partir de las 8 h, para alcanzar su valor mínimo a las 24 h y luego recuperarse aunque a valores inferiores a los de las primeras horas de observación. Para analizar el significado estadístico de estos resultados comportamentales inducidos por la toxicidad del petróleo, se aplicó el test de  $(\chi)^2$  para K muestras independientes (Siegel, 1956). Se halló que existen diferencias significativas: (1) entre los organismos controles y los organismos sometidos a los test de toxicidad, con un  $(\chi)^2 = 70,53$ , y 4 grados de libertad. El resultado de este análisis rechazó la hipótesis nula, de que los controles se comportan igual que los tratados con una  $p < 0,001$ . (2) entre el comportamiento de los sifones de los organismos sometidos al efecto de distintas concentraciones de petróleo crudo a los 15 min y a la hora de comenzados los ensayos, se obtuvo un  $(\chi)^2 = 214,34$  para 4 grados de libertad que rechazó la hipótesis nula de que no existían diferencias entre los animales tratados a distintas concentraciones de petróleo en el comportamiento de los sifones para una  $p < 0,001$ .

Se intentó establecer un patrón en *C. rhizophorae*, en cuanto al efecto del petróleo sobre la apertura de las valvas, el método empleado no permitió sacar ninguna conclusión definitiva.

#### Analisis de la Evolución de Algunos Compuestos Hidrosolubles del Petróleo en los Acuarios

De los cromatogramas de los extractos de la fracción hidrosoluble del petróleo, pudimos notar 10 compuestos que aparecían en todos ellos. De estos 10 compuestos, el No. 10 era el que mostraba menor variabilidad. Por ello se usó el compuesto 10 como referencia para determinar las variaciones relativas de los demás compuestos.

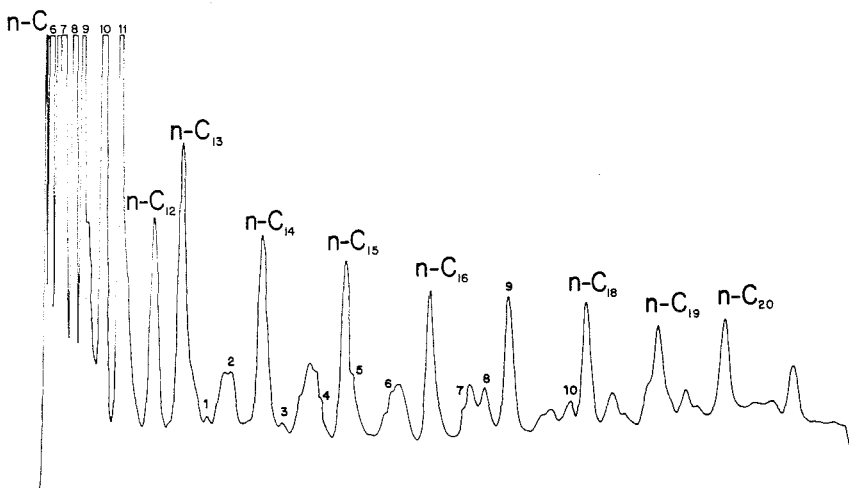


Figure 10. Cromatograma de petróleo crudo (Lagocinco) con columna de 1/8 pulgada, 3 m 3% OV17. Programa de temperatura: 80° por 2 min a 200° C a 8° C/min Flujo N<sub>2</sub> 25 ml/min.

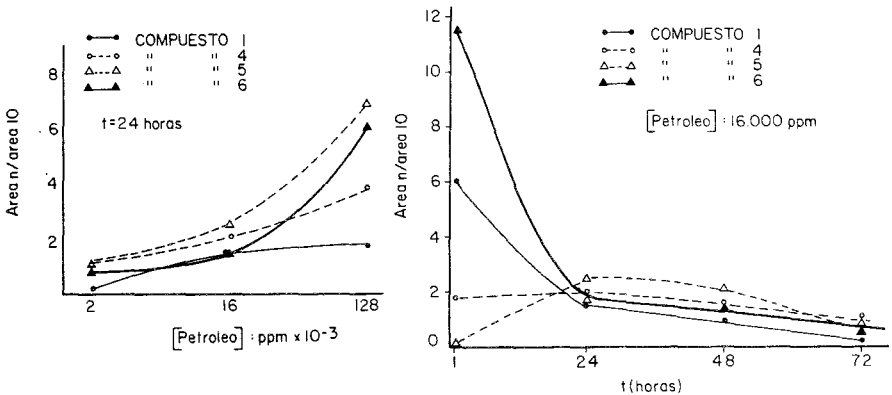


Figure 11. (Izquierda) Cambios en la proporción relativa de compuestos en la fracción hidrosoluble de petróleo, según la cantidad inicial de petróleo agregado.

Figure 12. (Drecha) Cambios en el tiempo en la proporción relativa de compuestos en la fracción hidrosoluble de petróleo, después de agregados 16.000 ppm de petróleo en el acuario.

Se analizó la fracción hidrosoluble del petróleo, 1 h después de agregar petróleo en los acuarios a las concentraciones de: 2.000, 8.000, 16.000, 32.000 y 128.000 ppm. Se analizaron las concentraciones relativas de los 10 compuestos escogidos (Fig. 10) y se notó que la variabilidad de las concentraciones relativas era mayor para una misma concentración que entre las concentraciones. No se pudo por lo tanto detectar diferencias significativas entre las proporciones relativas de estos compuestos en los diferentes ensayos.

Repitiendo estos análisis a las 24 h de agregado el petróleo en los acuarios, se pudo notar que la variabilidad de los diferentes ensayos de cada experimento disminuyó a niveles despreciables. Pudiéndose notar un aumento con respecto al compuesto 10 en la proporción relativa de los compuestos 1 al 9. Sin embargo los aumentos no fueron iguales mostrando cada compuesto su curva característica (Fig. 11).

Al analizar la evolución de las proporciones relativas de los compuestos escogidos en el tiempo, hasta las 72 h (Fig. 12 y 13), se pudo notar que había compuestos que disminuyen su concentración relativa al compuesto 10 en el tiempo, mientras otros aumentan su concentración relativa. Este fenómeno se pudo observar para dos concentraciones diferentes, pero en distintas proporciones.

Los compuestos 1 al 10 no pudieron ser caracterizados químicamente debido a que se encontraron en concentraciones sumamente bajas en el petróleo crudo (Fig. 10).

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los bioensayos tienen, al decir de Craddock (1977), como función primordial contestar entre otras una serie de preguntas como ¿es tóxico? ¿cuán tóxico es? ¿que fracciones contaminantes del material son las más tóxicas? ¿cual es la sensibilidad relativa de las especies?

Es evidente a través de nuestros resultados que el petróleo crudo Lagocinco-Maraven, resulta tóxico para las dos especies estudiadas. En *D. denticulatus* a las 72

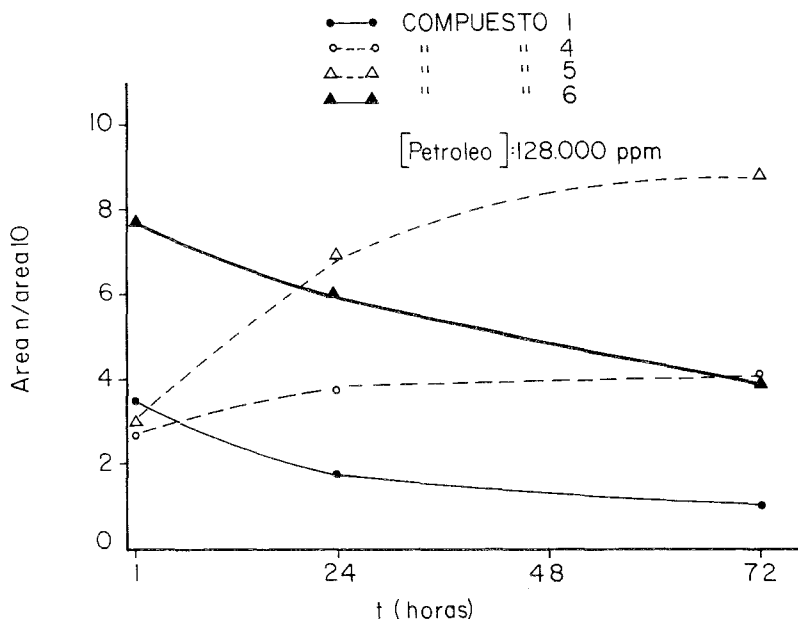


Figure 13. Cambios en el tiempo en la proporción relativa de compuestos en la fracción hidrosoluble de petróleo después de agregados 128.000 ppm de petróleo en el acuario.

h de experimentación el valor estimado del  $LD_{50}$  fué de 2.750 ppm y a las 96 h de 2.400 ppm. En *C. rhizophorae* la mortalidad máxima alcanzada fué del 23% a las 96 h a los 128.000 ppm.

Salvo el trabajo de Vallota y Patiño (1980) no existen estudios de bioensayos con este petróleo. Ellos hallaron, con una metodología distinta a la empleada por nosotros, una  $LD_{50}$  a las 72 h de 4.400 ppm y a las 96 h de 3.500 ppm para *Mellita quinquesperforata* un equinodermo sedimentívoro. Es interesante destacar que esta especie se encuentra como integrando la comunidad de Tucacas (de Mahieu y Gamba, 1980). Esto indicaría que *D. denticulatus* sería una especie mejor indicadora de contaminación para esta comunidad.

Lo que reflejan nuestros resultados como un aspecto importante a analizar es el comportamental. Aparentemente resulta ser tan importante este estudio como el de la  $LD_{50}$ . En todas las concentraciones, ya mucho antes de las 24 h se observaron modificaciones comportamentales significativas. Estos tiempos posiblemente incluyan el momento en que la concentración de los hidrocarburos hidrosolubles alcanzan su punto máximo. Esto permitiría antes de las 24 h hacer observaciones de efectos tóxicos subletales. Los resultados observados a la concentración no letal de 1.000 ppm demuestran que los organismos pasan sucesivamente de un estado de entierro al de semientierro y de desentierro para luego volver al de semientierro. Esto indicaría que el efecto tóxico obliga al animal a desenterrarse y que probablemente este luego trate de reenterrarse. A las concentraciones superiores se observó la misma evolución hasta el desentierro, pero a este punto los organismos, ya bastante afectados por el tóxico, no tienen suficientes energías para tratar de

reenterrarse y se quedan en ese estado hasta la muerte. Un efecto secundario del afecto de desenterramiento por el tóxico podría además hacer esta especie más accesible a la depredación.

Es interesante destacar que Bodoy (1976), en experiencias de contaminación térmica, describe en *Donax trunculus* y *D. semistriatus* la misma gama de comportamiento como respuesta al aumento de temperatura. En nuestro caso y en lo que concierne a extensión de los sifones, se puede suponer que el cese de actividad observado a las tres concentraciones más altas representa probablemente un mecanismo de defensa ante el tóxico, tratando los organismos de disminuir el contacto con éste. Esto posiblemente sea apoyado, por la observación que el paro de actividad en el tiempo es función de la cantidad de petróleo agregado, cesando la actividad más temprano, a concentraciones más altas.

Se pudo observar una buena resistencia de parte de *C. rhizophorae* a las concentraciones experimentadas. La respuesta de cierre de los bivalvos para la protección de sus partes blandas con un potente músculo aductor ha sido descrito (Johnson, 1977) como un mecanismo utilizado para controlar la exposición a la contaminación. Clark y Finley (1974) describieron este mecanismo para *Ostrea lurida*. Esto probablemente pueda explicar la mayor tolerancia observada.

En el caso de este organismo no se halló una correlación evidente entre el aspecto comportamental y la respuesta al tóxico. Esto se debió probablemente a la metodología empleada. Lo único que podemos decir con cierta seguridad es que después de las 24 h de exposición muchas de las ostras tienden a tener una magnitud de abertura de las valvas superior a la de los controles. Esto posiblemente indicaría que el tóxico tendría un efecto sobre la tonicidad del músculo aductor.

De los resultados del análisis de la variación de la composición relativa de la fracción hidrosoluble del petróleo en función del tiempo y de la concentración inicial, podemos concluir lo siguiente:

A 1 h de agregado el petróleo, la fracción hidrosoluble no se ha estabilizado todavía. Ello sugiere que el método utilizado para preparar las aguas contaminadas no es lo suficientemente preciso para garantizar uniformidad de condiciones a tiempos cortos. Sin embargo, a las 24 h de agregado el petróleo, la fracción hidrosoluble parece equilibrarse. Ello se puede interpretar a la luz de lo que ocurre físicamente en el acuario. El petróleo forma una capa superficial más o menos gruesa, según la cantidad agregada, que es agitada únicamente por el burbujeo del sistema de aereación. Como esta agitación es pequeña, los compuestos solubles tardan en pasar de la capa de hidrocarburos a la fase acuosa. Ello podría explicar el tiempo relativamente largo que requiere el sistema en equilibrarse.

A mayor concentración inicial del agregado de petróleo, se observa una mayor concentración en el agua de los compuestos analizados. Sin embargo este aumento en la concentración de la fracción hidrosoluble no parece ser igual para todos los compuestos analizados. La concentración relativa de ellos también cambia en función de la concentración inicial de petróleo agregado. Ello puede deberse a las diferencias en la velocidad de evaporación de compuestos disueltos en el agua y diferentes velocidades de disolución. Las diferencias se observan a los diferentes tiempos después de haber agregado el petróleo, lo que indica cierta estabilidad del sistema.

La evolución de la fracción hidrosoluble en el tiempo observada en estos

experimentos parecen concordar con los ensayos de Vallota y Patiño (1980) realizados en condiciones diferentes. Algunos compuestos van desapareciendo del agua, probablemente los compuestos menos polares y de menor peso molecular, por evaporación mientras que otros, los más pesados, se van concentrando en el agua. Vallota y Patiño (1980) no analizaron la evolución del petróleo disuelto en el agua con diferentes concentraciones iniciales del agregado. Los resultados reportados aquí indican un comportamiento distinto para sistemas con agregados iniciales de petróleo diferentes. Las diferencias observadas parecen ser, más que todo, debido a diferencias en la velocidad de volatilización o concentración de las sustancias.

En resumen podemos concluir, que la composición de la fracción hidrosoluble dependerá del método que se utilice para agregar el petróleo al agua, de la concentración inicial del petróleo agregado y del tiempo en que el sistema ha permanecido. Ello hace más difícil interpretar los resultados biológicos ya que con esta metodología es casi imposible detectar los compuestos más activos biológicamente o determinar los efectos sinérgicos de ciertos compuestos. Es de sugerir, repetir este tipo de experiencias con fracciones de destilación de petróleo más específicas y con compuestos aislados para poder seleccionar los compuestos más dañinos a los organismos en posibles derrames de petróleo.

Por el otro lado, estos experimentos demuestran que el medir la concentración de contaminantes de petróleo en partes totales de petróleo en agua, es una aproximación muy gruesa de la concentración real de contaminantes en el agua, y es menester determinar primero los contaminantes con efectos biológicos antes de poder determinar un método para medir su concentración real en el agua.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Dr. Hernán Pérez Nieto, al Br. Pedro Brito Evora, a la Bióloga Floria Cambi y a la Lic. Rosa Aquino, quienes de una u otra forma contribuyeron a que este trabajo pudiera realizarse.

## LITERATURA CITADA

Battelle.

1974. Research Report on: Study of effects of oil discharges and domestic and industrial wastewaters on the fisheries of Lake Maracaibo Venezuela. Vol. II Fate and effects of oil — Battelle Pacific Northwest Laboratories Richland, Washington 99352 U.S.A. Contract 212 B00899.

Bodoy, A.

1976. Etude de l'influence de la température liée a la pollution thermique sur la survie et la biologie de quelques mollusques des substrats meubles. J. Thermo-ecol. Cent. Océanol. Bretagne 15-16 novembre 1976. pp. 251-266.

Clark, R.C., Jr. and J.S. Finley.

1974. Acute effects of outboard motor effluent on two marine shellfish — Environ. Sci. Technol. 8: 1009-1014.

Craddock, D.R.

1977. Acute toxic effects of petroleum on arctic and subarctic marine organisms. In D.C. Malins, ed. Effects of petroleum on Arctic and Subarctic marine environments and organisms, Vol. II. Academic Press. 550 pp.

de Mahieu, G. y L. Gamba.

- 1980a. Comportamiento de *Excirrolana brasiliensis* (Crustacea/Isopoda) ante un derrame

artificial de petróleo en las playas de Quizandal y Patanemo. Informe Técnico del Proyecto: Golfo Triste-U.S.B.-Maraven. Objetivo J-2. Publ. Universidad Simón Bolívar, Perez Nieto, Ed. pp. 634-652.

- 
- 1980b. Estudio cuantitativo de las comunidades comprendidas entre Patanemo y Boca de Mangle. Informe Técnico del Proyecto Golfo Triste-U.S.B.-Maraven. Objetivo g. Publ. Universidad Simón Bolívar, Perez Nieto, Ed. pp. 378-557.
- Holme, N.A. and A.D. McIntyre.  
1971. Methods for the study of marine benthos. IBP Handbook N° 16. Burgess and Son Ltd., Oxford. 334 pp.
- Johnson, F.G.  
1977. Sublethal biological effects of petroleum hydrocarbon exposures: bacteria, algae and invertebrates. In D.C. Malins, ed. Effects of petroleum on Arctic and Subarctic marine environments and organisms Vol II Biol. effects. Academic Press. 550 pp.
- Litchfield, J.L. and F. Wilcoxon.  
1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmac. Exp. Ther. 96: 99-113.
- Malins, D.C.  
1977. Effects of petroleum on Arctic and Subarctic, marine environments and organisms. Vol. II Biological effects. Academic Press, New York — San Francisco-London. 550 pp.
- Nelson-Smith, A.  
1973. Oil pollution and marine ecology. Plenum Press, New York. 243 pp.
- Siegel, S.  
1956. Non parametric statistics for behavioral sciences. MacGraw Hill, Kogakusha. 312 pp.
- Sprague, J.B.  
1973. The ABC's of pollutant bioassay using fish in: Biological methods for de assessment of water quality. Am. Soc. Test. Mater., Spec. Tech. Publ. 528. pp. 6-30.
- Vallota, H.A.D. y Patiño H.  
1980. Toxicidad del petróleo crudo, solo o con dispersante en dos especies de la fauna marina. (*Mellita quinquesperforata*, Echinodermata, Echinoidea y *Penaeus brasiliensis*, Crustacea-Decapoda). Informe técnico del Proyecto Golfo Triste-U.S.B.-Maraven. Objetivo h-1-1. Publ. Universidad Simón Bolívar, Perez Nieto, Ed. pp. 559-584.
- Venberg, W.B., F.P. Thurberg, A. Calabrese and F.J. Venberg.  
1979. Marine pollution: functional responses. Academic Press, New York-San Francisco London. 454 pp.