

BIOENSAYO PARA CALCULAR EL CL₅₀ DEL DISPERSANTE DE PETROLEO BP 1100-WD CON LARVAS DE CAMARON *PENAEUS VANNAMEI*

Por:

FRANCISCO VILLAMAR F. (1)

RESUMEN

*En el presente estudio se realiza un bioensayo para determinar la concentración media letal (CL₅₀) del dispersante de petróleo BP 1100-WD, para lo cual se utilizó larvas de camarón *Penaeus vannamei*.*

Los valores obtenidos en la primera prueba de tanteo, se ubicó el CL₅₀ entre las concentraciones 5.6 y 10 PPM, en la segunda prueba el CL₅₀ se encontró entre las concentraciones 4 y 5 PPM.

El valor de Chi² (X²) para determinar la homogeneidad de la población fue de 0.4340 valor que es menor al de la Tabla de Pearson, por lo tanto se acepta la hipótesis, porque existe homogeneidad en la población ensayada y el valor de CL₅₀ es válido estadísticamente.

El valor de la curva de mortalidad fue: $Y = 5.3157 + 2.900535(x - 0.7874)$

Se describe el método estadístico de Bliss (1935-1938), mediante el cual fueron obtenidos los datos presentados en la Tabla III y el resultado del CL₅₀ = 4.77 ± 1.67 PPM.

ABSTRACT

*A bioassay is performed in this investigation in order to determine the median lethal concentration (CL₅₀) of petroleum dispersant BP 1100-WD, for which *Penaeus vannamei* shrimp larvae were used.*

The values obtained in the first screening test determined the CL₅₀ to be between a concentration of 5.6 and 10 PPM; in the second test the CL₅₀ was between the concentration of 4 and 5 PPM.

The value of chi² (X²) corresponds to 0.4340, which is less than that of the Pearson table. Therefore, the hypothesis is accepted upon finding the existence of homogeneity in the population and the CL₅₀ value statistically valid.

The value of the mortality curve was: $Y = 5.3157 + 2.900535(x - 0.7874)$

The investigation describes the statistical Bliss method (1935-1938) through which the data presented in Table III, and the result was obtained CL₅₀ = 4.77 ± 1.67 PPM.

INTRODUCCION

Teniendo en cuenta la necesidad de determinar los efectos biológicos de ciertos contaminantes que llegan al mar cuya sustancia fisiológicamente activa se desconoce, se están implementando los estudios de bioensayos, utilizando organismos vivos en condiciones de laboratorio debido a la información bastante rápida

con que se puede obtener de las dosis letales (DL) y medias letal (CL₅₀) que afectan la sobrevivencia de los organismos marinos y estuarinos (Bellan, 1981).

Este estudio de carácter preliminar sobre el cálculo de la concentración media letal (CL₅₀) de agentes contaminantes con especies marinas provenientes del Golfo de Guayaquil en condiciones de laboratorio,

(1) Instituto Oceanográfico de la Armada. INOCAR.- P.O. Box, 5940.- Guayaquil - Ecuador.

servirán para determinar en forma indirecta, el efecto biológico que se producen en los organismos vivos del plancton y bentos de la costa ecuatoriana.

De esta forma se evalúa el daño orgánico y la capacidad de bioacumulación que tienen ciertos organismos marinos. Además, se desea conocer los grados de toxicidad de algunos compuestos antropogénicos como información valiosa y establecer el impacto potencial en el medio marino.

De acuerdo a Stora (1974) es posible realizar un análisis homogéneo de la población muestreada y obtener un valor correcto de la concentración letal junto a los límites de confianza de esos valores. Si la población de los organismos vivos es heterogénea, la mortalidad a diferentes concentraciones producida por una toxina, puede ser significativa. Por esta razón las mayores determinaciones de concentraciones letales, son reportadas solamente con un rango de valores entre los cuales la verdadera concentración es para el 50% de mortalidad (CL_{50}), u otra medida de toxicidad porcentual.

En definitiva el propósito de realizar bioensayos es la de comparar la toxicidad de diferentes compuestos y conocer la sensibilidad de las diversas especies, para determinar los mecanismos de los efectos de las sustancias ensayadas (Alcazar, 1988).

MATERIALES Y METODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de bioensayos del Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador, durante el mes de diciembre de 1989. Se aplicó la metodología básica para pruebas de toxicidad y bioensayos de tipo estático de corta duración recomendadas por FAO (1981), propuestas por la Comisión Permanente del Pacífico Sur (CPPS) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

Se seleccionó el dispersante de petróleo BP 1100-WD, por considerarse una sustancia de toxicidad media (Nagell, 1974) y se utilizó post-larvas (PL 5) de camarón blanco *Penaeus vannamei* provenientes del Golfo de Guayaquil como organismos sensibles a la experimentación de acuerdo a Leong (1983), además por ser de importancia comercial para el Ecuador (Cun, 1982).

Las larvas con longitud de 5 ± 1 mm. fueron aclimatadas a las condiciones del laboratorio: 26°C de temperatura, 5.5 ml/l inicial y 4.2 ml/l final de oxígeno disuelto, luminosidad relativa al día o la noche y; 34‰ de salinidad, durante tres días consecutivos. Al mismo

tiempo se las alimentó con células del fitoplancton, *Tetraselmis* sp. y *Chaetóceros* sp.

En el primer experimento o prueba de tanteo, se utilizaron cinco concentraciones de BP 1100-WD: .56 - 1 - 5.6 - 10 - 100 PPM (escala logarítmica) y un control de mortalidad observada para determinar el 50% de organismos muertos (CL_{50}) (Tabla I).

En la segunda prueba se utilizaron ocho concentraciones de BP 1100-WD: 4-5-6-7-8-9-10-20 PPM (escala aritmética) y un control. Los valores de mortalidad observada y el CL_{50} se encuentran en la Tabla II.

En el primero y segundo experimento se introdujo cinco larvas para cada concentración y el mismo número para el control en recipientes de vidrio de 125 ml.

Las observaciones se las realizaron a las 24-48-72 y 96 horas de exposición, con el objeto de extraer y contabilizar los organismos muertos, considerados de tal manera por la cesación de sus movimientos. Las diluciones no fueron cambiadas pero si oxigenadas cada 24 horas durante un minuto.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente aplicando el método de Bliss (1935-38) en Stora (1974), para determinar el CL_{50} , el mismo que se basa en la relación dosis-efecto. Este método tiene una variación lineal de los probits de mortalidad en función de los logaritmos de las concentraciones; además minimiza los extremos y maximiza las concentraciones medias. Para éste efecto se realizan ciertas transformaciones hasta llegar a una recta de regresión, considerada como información válida estadísticamente.

Por ser esta la primera contribución aplicando este método bioestadístico, se transcribe el método de Bliss, mediante el cual fueron obtenidos todos los datos expuestos en la Tabla III, de la siguiente manera:

- 1.- Convertir las concentraciones usadas a logaritmo.
- 2.- Convertir el número de animales muertos a porcentajes.
- 3.- Establecer los probits empíricos de las tablas de Bliss, los mismos que están en función del porcentaje de muertos.
- 4.- Graficar una curva provisional, para lo cual los probits empíricos son ploteados frente al loga-

ritmo de las concentraciones, trazando una línea que pase por estos puntos, ya sea al ojo o siguiendo el método de mínimos cuadrados con la fórmula $y' = a + bx$.

- 5.- Se estiman los probits esperados a partir de la recta anterior y se obtienen valores probables de probits correspondientes a cada logaritmo de las concentraciones, los mismos que pueden ser leídos directamente del gráfico o a través de la ecuación del punto cuatro.
- 6.- Se calculan los probits corregidos (Y), para establecer la curva de mortalidad según las siguientes ecuaciones:

$$\text{si } y' > 5 \text{ entonces } y = (Y + \frac{Q}{Z}) - q \left(\frac{-}{Z}\right)$$

$$\text{si } y' < 5 \text{ entonces } y = (Y - \frac{P}{Z}) + p \left(\frac{-}{Z}\right)$$

$(Y + Q/Z)$, $(Y - P/Z)$, $(1/Z)$, son parámetros que se leen en las tablas de Bliss de los probits esperados y que corresponden en el mismo orden a máximo corregido, mínimo corregido y rango, además q y p representan proporción de sobrevivencia y muertos respectivamente, expresados en valores comprendidos entre cero y uno.

- 7.- Cada valor de los probits está ligado a un valor de peso que se estima por la ecuación: $W = N (Z^2/PQ)$, donde N es el número de animales en cada concentración.
- 8.- Se calcula la curva de mortalidad con los logaritmo de las concentraciones (X), los probits corregidos (Y), y los coeficientes de ponderación (W), según:

$$Y = \bar{y} + b (X - \bar{x}) \tag{8}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum (wy)}{\sum (w)} \tag{8.1}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum (wx)}{\sum (w)} \tag{8.2}$$

$$b = \frac{\sum (wxy) - \bar{y} \sum (wx)}{\sum (wx^2) - \bar{x} \sum (wx)} \tag{8.3}$$

$$X = \bar{x} + \frac{1}{b} (Y - \bar{y}) \tag{8.4}$$

Donde Y de la ecuación (8.4) es un valor obtenido de las tablas de Bliss para los porcentajes de muertos. Así, CL₅₀ se lee 50%.

- 9. El cálculo de la linealidad entre los valores observados y la curva de mortalidad se determina por medio del análisis del chi² (χ²) según la ecuación:

$$\chi^2 = [\sum (wy^2) - \bar{y} \sum (wy)] - b [\sum (wxy) - \bar{y} \sum (wx)]$$

con n - 2 grados de libertad y 95% de confianza leídos en las tablas de Pearson n será el número de concentraciones usadas. Si el valor dado en la tabla de Pearson es más alto que los valores calculados para un límite de confianza del 95% podemos estar seguros de la linealidad de la curva y la homogeneidad de la población.

- 10. El valor de la varianza y la desviación estándar son obtenidos mediante la ecuación:

$$v (\log LC_{50}) = \frac{1}{(b)^2} \left[\frac{1}{b} \frac{(Y - \bar{y})^2}{\sum (wxy) - \bar{y} \sum (wx)} + \frac{1}{\sum (w)} \right]$$

$$\text{Desviación estándar} = \text{Antilog} [2 \sqrt{v (\log CL_{50})}]$$

El valor del CL₅₀ será: CL₅₀ ± 2σ

$$CL_{50} = 4.77 \pm 1.67 \text{ PPM.}$$

RESULTADOS

Se determinó el grado de toxicidad del dispersante de petróleo BP 1100-WD, mediante el uso de larvas de camarón *Penaeus vannamei* (Tabla III).

En la primera prueba la concentración media letal (CL₅₀) se ubicó entre 5.6 y 10 PPM a las 96 horas de exposición (Tabla I). En la segunda prueba definitiva el CL₅₀ - 96h. la concentración media letal recayó entre 4 y 5 PPM (Tabla II).

En esta segunda ocasión a los datos se les aplicó el método estadístico de Bliss, mediante el cual se obtuvo como resultado que el CL₅₀ a 96 horas es de 4.77 ± 1.67 PPM., con n - 2 grados de libertad y 95% de

HORAS \ CONC. PPM	24	48	72	96	CL ₅₀
0.56	0	0	0	0	5.6 - PPM
1	0	0	0	2	
5.6	0	0	1	2	
10	3	3	4	4	
100	5	5	5	5	

TABLA I.- Mortalidad de *Penaeus vannamei* con BP 1100 - WD Cálculo del CL₅₀ Primer Experimento

HORAS \ CONC. PPM	24	48	72	96	CL ₅₀
4	0	0	0	2	4 - 5 PPM
5	0	0	3	3	
6	0	0	3	3	
7	0	0	3	3	
8	0	0	4	4	
9	0	3	4	4	
10	3	5	5	5	
20	3	5	5	5	

TABLA II.- Mortalidad de *Penaeus vannamei* con BP 1100 - WD Cálculo del CL₅₀ Segundo Experimento.

PPM	Mortalidad	%	Logaritmo de las concentraciones	Probits empíricos	Probits probables esperados	Probits corregidos	$\frac{z^2}{PQ}$	W	WX	WY	WYX	WX ²	WY ²
4	2	40	0.60206	4.74700	4.79	4.7468	0.62740	3.1314	1.8853	14.8639	8.9490	1.1350	70.5559
5	3	60	0.69897	5.25300	5.08	5.2512	0.63476	3.1738	2.2184	16.6661	11.6491	1.5506	87.5165
6	3	60	0.77815	5.25300	5.31	5.1630	0.61454	3.0727	2.3910	15.8642	12.3447	1.8606	81.9064
7	3	60	0.84510	5.25300	5.51	5.2383	0.57869	2.8935	2.4453	15.1566	12.8089	2.0665	78.3944
8	4	80	0.90309	5.84200	5.68	5.8321	0.53686	2.6843	2.4242	15.6551	14.1379	2.1892	91.3015
9	4	80	0.95424	5.84200	5.83	5.8405	0.49324	2.4662	2.3533	14.4039	13.7448	2.2457	84.1268
10	5	100	1.00000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
20	5	100	1.30103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

SUMATORIA 17.4218 13.7174 92.6099 73.6345 11.0476 494.8016

$\bar{x} = 0.7814$ $\bar{y} = 5.3157$ $b = 2.9005$ $x^2 = 0.4340$ $\log. CL_{50} = 0.6785$ $v(\log. CL_{50}) = 0.0125285$ $CL_{50} = 4.77 \pm 1.87$ PPM.

ECUACION DE LA CURVA DE MORTALIDAD: $Y = 5.3157 + 2.900535(X - 0.7874)$

TABLA III.- Cálculo Numérico del CL₅₀ - 96 horas para *Penaeus vannamei* con BP 100 - WD

CONCENTRACION DE BP 1100 - WD	MUERTOS OBSERVADOS	% MORTALIDAD OBSERVADA	% MORTALIDAD ESPERADA	MORTALIDAD OBSERVADA MENOS ESPERADA	Chi ²
20	5/5	100 (97.4)	92	5.4	0.04
10	5/5	100 (97.4)	85	12.4	0.105
9	4/5	80	80	0	0.
8	4/5	80	75	5	0.014
7	3/5	60	70	-10	0.
6	3/5	60	60	0	0.
5	3/5	60	50	10	0.040
4	2/5	40	40	0	0.

$$S = \frac{CL_{84} / CL_{50} + CL_{50} / CL_{16}}{2} = 1.12$$

0.159

$$f CL_{50} = S^{2.77} / \sqrt{n'} = 1.058$$

(10 x 0.159 = 1.59)

N' = 40 CL₈₄ = 10
 K = 8 CL₅₀ = 4.7
 CL₁₆ = 2.3

TABLA IV.- Cálculo del CL₅₀ - 96h., método monográfico de Litchfield y Wilcoxon para *P. vannamei*.

confianza (Tabla III, fig. 1). Por lo tanto, se acepta la hipótesis por existir homogeneidad en la población y el valor obtenido para el CL₅₀ es válido estadísticamente.

El valor de la curva de mortalidad es $y^1 = 5.3157 + 2.900535(x - 0.7874)$.

Mediante los métodos: Litchfiel - Wilcoxon el CL₅₀ = 4.7 PPM. (Tabla IV, Fig. 2); cálculo gráfico aritmético el CL₅₀ = 4.5 PPM. (Fig. 3); cálculo gráfico logarítmico el CL₅₀ = 4.7 PPM. (Fig. 4).

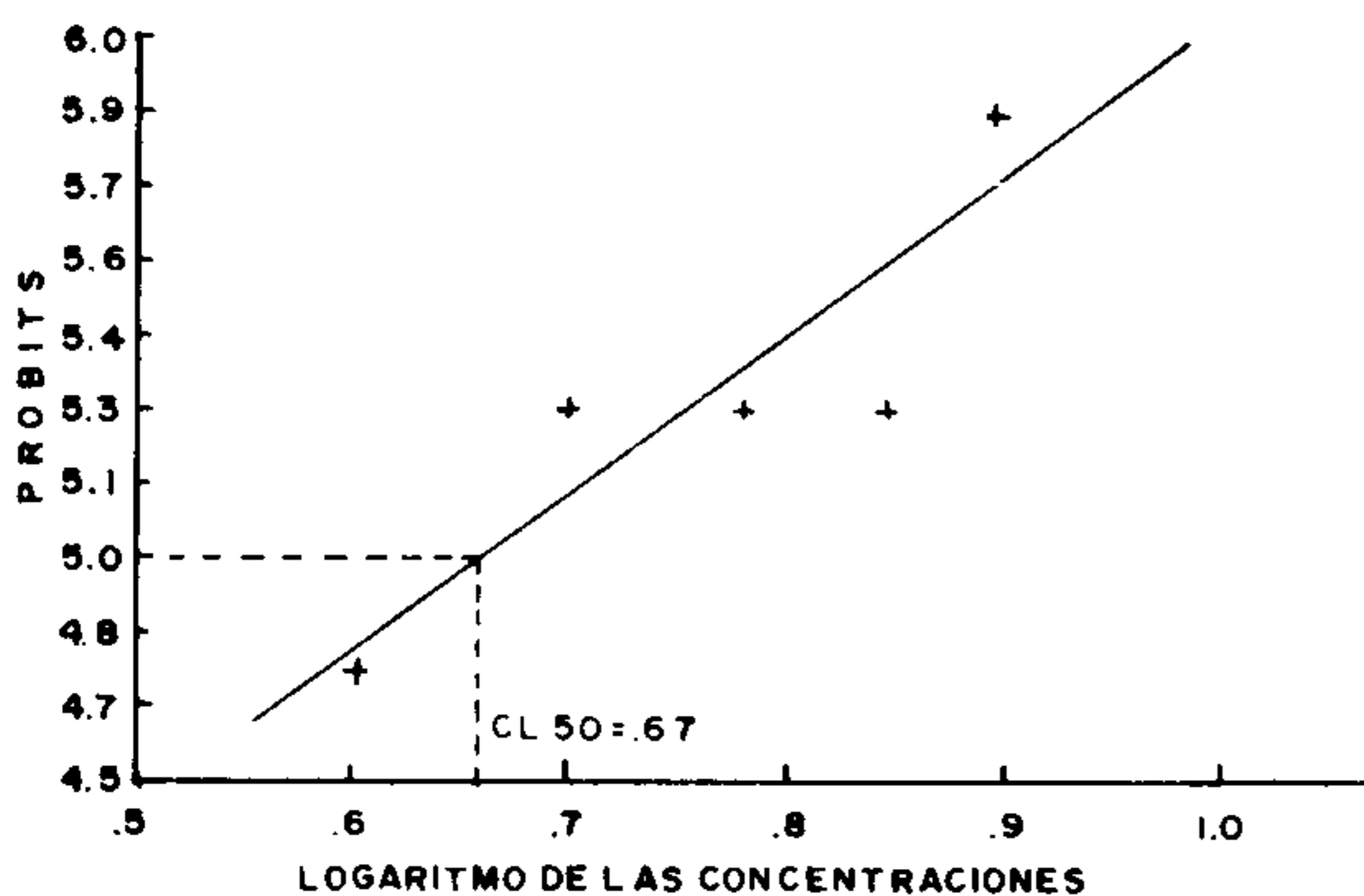


Fig. 1. Curva Provisional de Mortalidad para *Penaeus vannamei*.

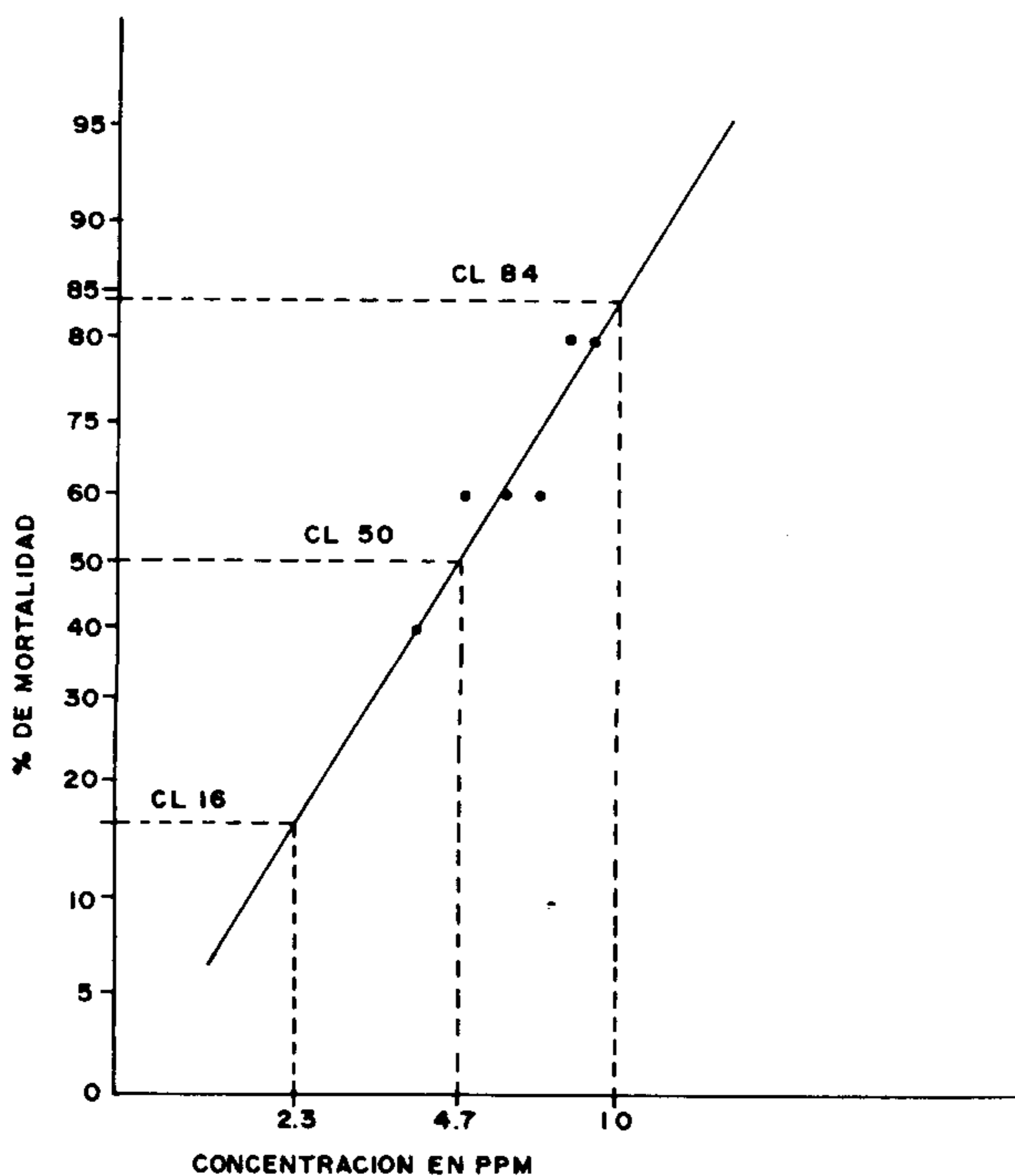


Fig. 2. Cálculo del CL₅₀ - 96 h., método monográfico de Litchfield y Wilcoxon para *Penaeus vannamei*.

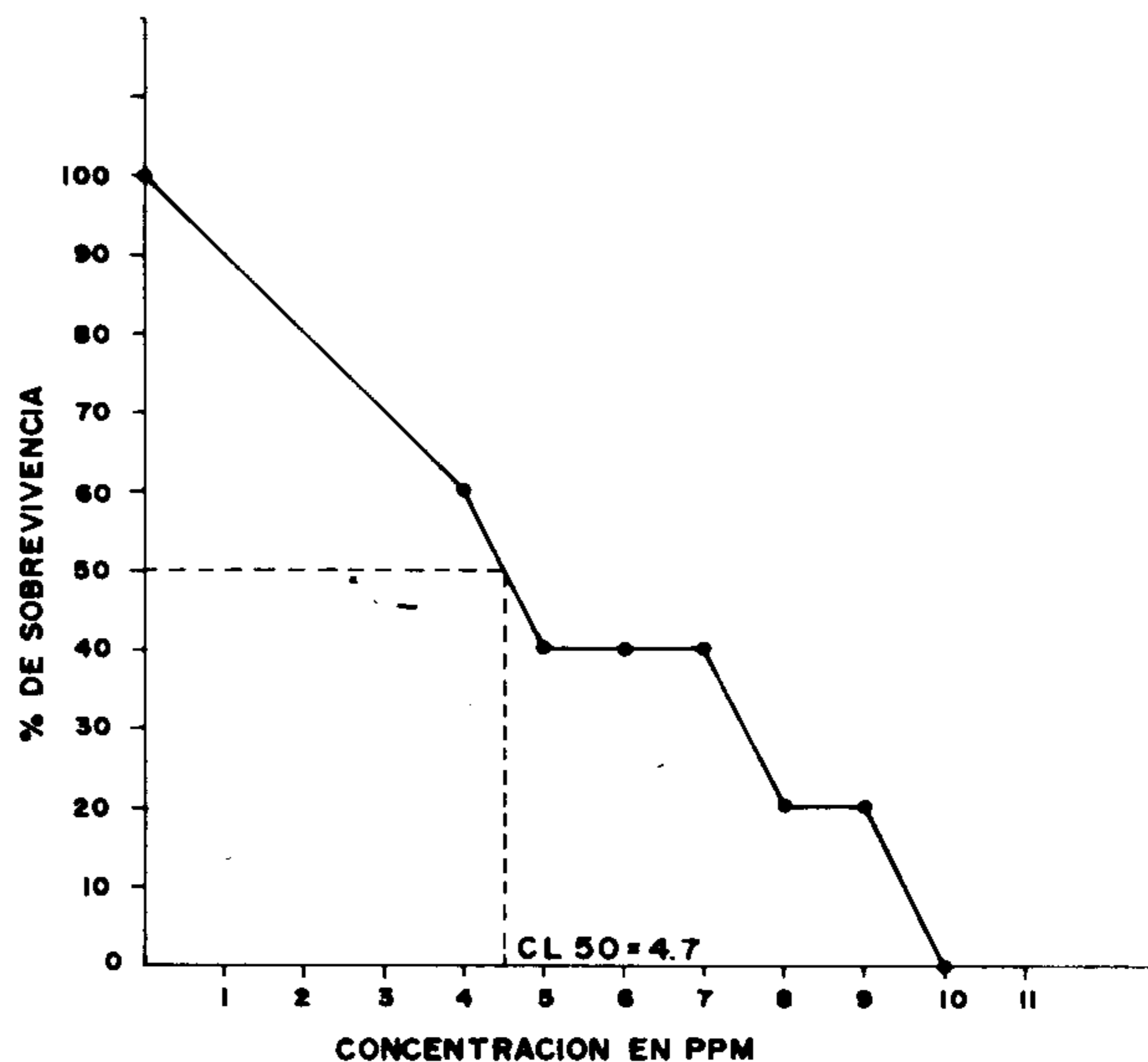


Fig. 3. Cálculo del CL₅₀ - 96 h., método gráfico aritmético para *Penaeus vannamei*.

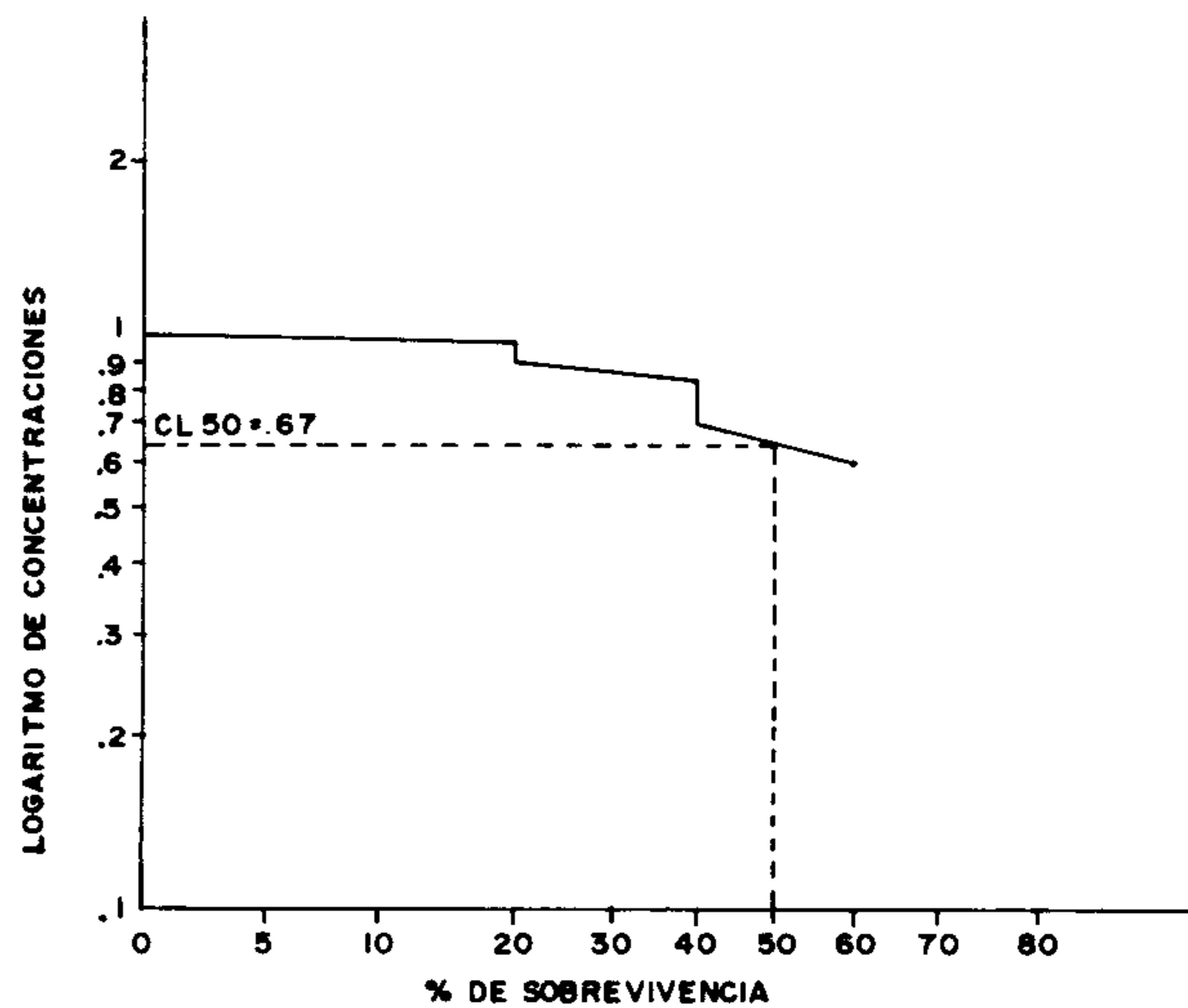


Fig. 4. Cálculo del CL₅₀ - 96 h., método gráfico logarítmico para *Penaeus vannamei*.

CONCLUSIONES

A través de éste estudio sobre el análisis de la concentración media letal (CL₅₀), se ha logrado una apreciación significativa de la toxicidad del dispersante de petróleo BP 1100 - WD sobre las larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

Aunque el presente bioensayo tuvo el carácter de preliminar se puede concluir de la experiencia del mismo las siguientes observaciones:

El análisis demuestra cómo el dispersante al entrar en contacto con las células vivas del camarón destruye progresivamente los epitelios, la superficie de

las branquias, el esófago y el hepatopaneas deja de funcionar normalmente produciéndose la muerte del organismo en el menor tiempo de exposición.

Se considera que el BP 1100 - WD es tóxico para las larvas de camarón *Penaeus vannamei* y su grado de toxicidad puede ser igual o mayor en otros organismos marinos tales como el fitoplancton y el zooplancton.

Durante el bioensayo se observó la sensibilidad y la resistencia que demostraron las larvas ante este tipo de contaminante, presumiéndose que la cutícula o exoesqueleto les sirve como protección al medio externo por poseer fuertes características hidrofóbica (Nagell, et al., 1974).

El grado de toxicidad del BP 1100 - WD, depende de la concentración y difiere de un organismo a otro, en éste trabajo se comprobó que los efectos letales estuvieron entre las concentraciones de 10 y 20 PPM a 96 horas aproximadamente y las concentraciones menores a 5 PPM fueron las más tolerantes, especialmente cuando se observó el efecto sinérgico.

Se concluye que el poder de toxicidad del BP 1100 - WD es menos tolerado por los organismos marinos que el mismo petróleo, ya que el poder solvente seguirá siendo tóxico, propio de los dispersantes, aún en bajas concentraciones. Un factor de interés práctico considerado en este trabajo fue la temperatura porque la toxicidad de los dispersantes difiere si esta es alta o baja (Stewart, 1975).

El CL_{50} obtenido por el método gráfico (Fig. 1) y mediante el cálculo de Bliss (Tabla III), el que proporciona tablas de probabilidades, han sido las alternativas para comprobar en mejor forma el grado de toxicidad de BP 1100 - WD ya que existen otros métodos como el de Litchfield y Wilcoxon (1949) eminentemente gráficos. Por lo tanto, se comparó los resultados obtenidos con gráficos aritméticos y cálculos logarítmicos, los cuales coinciden y su validez bioestadística se nota en los grados de libertad y el porcentaje de confianza que nos brinda las tablas estadísticas de Pearson (1958).

Las larvas de *Penaeus Vannamei* durante el tiempo de ensayo no detuvieron su actividad de crecimiento (Ecdisis), pasando de un estadio a otro, lo cual significa que las larvas fueron tratadas con especial cuidado y aclimatación requerida.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mis agradecimientos al señor Director y al Jefe del Departamento de Ciencias del Mar del Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo científico. Además, al Biólogo Nelson Villacís

por su valiosa colaboración y entusiasmo en esta primera contribución sobre el estudio de bioensayos con organismos marinos y al señor Víctor Mesías por la diagramación.

BIBLIOGRAFIA

- Alcazar, F., 1988.- Documento guía del Curso Regional CPPS/PNUMA/COI, sobre Bioensayos y pruebas de toxicidad en organismos marinos del Pacífico Sudeste. Cartagena. Colombia, 162 p.
- Bellan, G., 1981.- Manual of Methods in Aquatic Environment Research. Part 7. Selected Bioassay for the Mediterranean (Tests Used by FAO (GFCM)/UNEP. Joint Coordinated Project on Pollution in the Mediterranean. Fish. Tech. Pap., (208): 31.
- Cun, M., 1982.- Guía práctica para la cría de camarones comerciales (*Penaeus*) en Ecuador. Inst. Nac. de Pesca. Bol. Cient. Tec., 5(1): 29.
- FAO, 1981.- Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4a. Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. FAO, Doc. Tec. PESCA. (164): 34.
- Leong, J., 1983.- A bioassay system for studying diseases in juvenile Penaeid shrimp. CRC Handbook of Mariculture. Crustacean Aquaculture. Florida. 1: 321-327.
- Litchfield y Wilcoxon, 1949.- Método Monográfico para obtener el valor CL_{50} y sus límites de confianza. Manual de operaciones del Envirotox Flow - thru Dilutor System, Easley. USA. 25 - 35 p.
- Nagell, B., M. Notini y O. Grahn, 1974.- Toxicity of four oil dispersants to some animals from the Baltic Sea. Mar. Biol. 28(4): 237-243.
- Pearson, E. y H. Hartley, 1958.- Biometrika tables for statisticians. 1. London, Cambridge University Press, 2nd. ed: 240 p.
- Stora, G., 1974.- Computation of letal concentrations. Mar. Biol. Bull. 5(5): 69-71.
- Stewart, N., 1975.- Methods for Acute Toxicity Tests with fish, Macroinvertebrates, and Amphibians. National Water Quality NTS. PB-242 105. Ecological Research. EPA - 660/375-009:61.