

## BIOENSAYO DE TOXICIDAD (CL50) DEL DISPERSANTE DE PETROLEO BP 1100 WD, CON FITOPLANCTON MARINO (*Tetraselmis sp*)\*

Por: FRANCISCO VILLAMAR F.<sup>(1)</sup>

### RESUMEN

Se realiza este estudio para evaluar el grado de toxicidad del dispersante de petróleo BP 1100 WD mediante un bioensayo en condiciones de laboratorio y de esta forma obtener la concentración media letal (CL50), utilizando para esta finalidad microcélulas del fitoplancton (*Tetraselmis sp.*), provenientes del Golfo Guayaquil.

Los valores de toxicidad son obtenidos mediante el método bioestadístico de Bliss y se los presenta en la Tabla I.

El resultado obtenido del CL50 = 2.08 PPM  
 Varianza del log. de CL50 = 0.0175959  
 Desviación estándar = ±1.04 PPM

El  $\chi^2 (X^2) = 5.1598$ , cuyo valor obtenido es menor al de la tabla de Pearson, por esta razón se acepta la hipótesis planteada al existir homogeneidad en la población ensayada y el valor del CL50 es válido estadísticamente.

El valor de la curva de mortalidad fue el siguiente:  $y' = 5.076 + -(1.7679) (X-0.2760)$

Además, se realizó el cálculo gráfico aritmético (Fig. 2) y el cálculo gráfico logarítmico (Fig. 3).

En base a las probabilidades empíricas de los porcentajes de mortalidad y a los logaritmos de las concentraciones, se graficó la curva provisional de mortalidad de las células del fitoplancton marino (*Tetraselmis sp*)

### ABSTRACT

*This study was made in order to evaluate the degree of toxicity of the BP 1100 WD petroleum dispersant, through a bioassay under laboratory conditions. The half-lethal concentration (CL50) was obtained in this way. For this purpose, microcells of the Tetraselmis sp. from the Gulf of Guayaquil were used.*

*The values obtained through the Bliss statistical method are shown in Table I.*

*The result of CL50 = 2.08 PPM. Standard error = ±1.04 PPM  
 The variance of CL50 = 0.0175959*

*The value of  $\chi^2 (X^2)$  was 5.1598, whose value is less than Pearson's table. For that reason, we accept the hypothesis of the existence of homogeneity in the sampled population and the value of CL50 is statistically valid.*

*The value of the mortality curve was:  
 $y' = 5.0736 \pm (1.7679) (X-0.2760)$*

*Furthermore, arithmetic graphic calculation and logarithmic calculation were performed.*

<sup>(1)</sup> Instituto Oceanográfico de la Armada. P. O. Box 5940. Guayaquil, Ecuador

\* Presentado en las XVIII Jornadas Ecuatorianas de Biología en noviembre 1994, Ambato, Ecuador.

*Based on the empirical probabilities of the mortality porcentages and the logarithms of concentrations, a provisional mortality curve was drawn for the cells of the marine phytoplankton *Tetraselmis sp.**

## INTRODUCCION

Los bioensayos de toxicidad con agentes contaminantes en organismos vivos bajo condiciones de laboratorio, se han incrementado en estos últimos tiempos debido a la brevedad con que se obtiene la información sobre las dosis letales y subletales (CL50) que afectan negativamente a los organismos vivos en los ambientes marinos y estuarinos.

A causa de la complejidad del medio ambiente marino y de las comunidades biológicas que lo integran es difícil establecer el grado de deterioro que afecta a las especies o comunidades marinas. Por esta razón es conveniente realizar bioensayos utilizando organismos vivos en condiciones controladas de laboratorio. Sin embargo, el objetivo primordial de un bioensayo es reflejar la realidad de como afectaría a los organismos vivos en su medio natural y para ello es necesario paralelamente investigar continuamente las comunidades marinas en su propio hábitat.

Actualmente el Instituto Oceanográfico de la Armada cuenta con un sistema de acuarios con agua circulante que permite mantener en condiciones controladas especies vivas de peces, crustáceos, equinodermos, etc. Además, cuenta con un laboratorio de cultivos de microcélulas del fitoplancton marino utilizado en el presente trabajo (*Tetraselmis sp.*) con muestras provenientes del Golfo de Guayaquil.

Se han seleccionado microcélulas del fitoplancton porque estas pueden cultivarse en recipientes pequeños, manteniendo millones de células por litro y primordialmente porque estos microorganismos son los responsables de la fertilidad marina, ya que directa o indirectamente toda la vida del mar, depende de la producción del fitoplancton.

El presente estudio se considera de carácter preliminar especialmente en lo referente al cálculo de la concentración media letal (CL50), de esta manera se avalúa el grado de toxicidad del dispersante de petróleo BP 1100 WD considerado como agente contaminante cuando se lo utiliza para dispersar manchas de petróleo regado en el mar. Con

esta información se establece el impacto potencial que puede producir este dispersante en el medio ambiente marino.

La aplicación del método bioestadístico de Bliss (1935-38) en Stora (1974) para la realización de los bioensayos hace posible obtener un análisis homogéneo de la población muestreada y valores correctos de la concentración media letal (CL50), asimismo los límites de confianza (95%) de los valores obtenidos. Reportándose datos de concentraciones cuya toxicidad tiene valores del 50% de mortalidad.

## MATERIALES Y METODOS

El experimento se lo realizó en los laboratorios del Instituto Oceanográfico en junio de 1994. El dispersante de petróleo BP 1100 WD utilizado en este bioensayo fue proporcionado por la Dirección General de la Marina Mercante (DIGMER).

Se aplicó la metodología de Bliss (Stora, 1974) considerada básica en las pruebas de toxicidad, la misma que fue utilizada por Villamar (1990) con larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

Los contajes celulares y los cultivos con células de *Tetraselmis sp.* fueron proporcionados por el laboratorio de cultivo de fitoplancton de la División de Biología del INOCAR. *Tetraselmis sp.*, son organismos que pertenecen al Phylum CHOROPHYTA, Subdivisión Chlorophyceae y al Orden Volvocales. Microcélulas que miden entre 5 y 8 micras de diámetro.

El inóculo en este experimento fue obtenido en la fase de crecimiento exponencial, utilizando el medio de cultivo de Guillard en Stein (1973), el mismo que se fundamenta en agua de mar enriquecida con nutrientes y vitaminas, adecuado para el crecimiento de las microcélulas marinas y además, siguiendo el método recomendado por la FAO-IAEA para experimentos de toxicidad con organismos del fitoplancton y zooplancton (UNEP, 1989).

Del cultivo stock o madre se tomaron 20 ml y se inocularon en 180 ml. del medio de cultivo Guillard obteniéndose una concentración de 10.000 cel./ml., más las equivalentes diluciones del dispersante de petróleo que tuvieron las siguientes concentraciones: 5.6-3.2-1.8-1.0-0.56 PPM. (Partes por millón).

El experimento que se inició con una concentración de 10.000 cel./ml. proveniente del cultivo stock, alcanzó en 96 horas una concentración de 62.000 cel./ml., inóculo que serviría como el respectivo cultivo de control, sin el dispersante de petróleo.

Durante el desarrollo del bioensayo se contabilizó a través del conteo celular cada 24 horas, el crecimiento o la mortalidad del cultivo de fitoplancton y de la misma manera la temperatura del ambiental.

Para el conteo inicial de las células y durante 4 días de experimentación se utilizó la cámara hematocitómetro de Neubauer que tiene 0.1 mm. de profundidad, observados con un microscopio compuesto de luz.

## RESULTADOS

En todos los cultivos que fueron sometidos a las diferentes concentraciones del dispersante de petróleo, se observó que el contaminante ejerció una inhibición al crecimiento de las células especialmente en las primeras 48 horas del inicio del experimento (Fig. 1) De la misma manera se ha determinado que el efecto del dispersante de petróleo fue más negativo en el crecimiento celular a medida en que se incrementaban las concentraciones de contaminante.

Cabe mencionar que en todas las concentraciones celulares expuestas al dispersante existió una franca mortalidad, valores que si los comparamos con el inóculo y el crecimiento normal del respectivo control son fáciles de observar su magnitud. (Fig. 1)

A los datos obtenidos mediante este experimento se le aplicó el método bioestadístico de Bliss, mediante el cual se obtuvo como resultado que el

$$\text{CL50} = \log. 0.3176 = 2.8 \text{ PPM}$$

$$\text{Varianza del log. de CL50} = 0.0175959$$

Desviación estándar  $= \pm 1.04$  PPM (Tabla 1)

El valor obtenido de  $X^2 = 5.1598$  es menor al valor esperado en la tabla de Pearson et. al. (1958) con n-2 grados de libertad y 95% de confianza. Por lo tanto se acepta la hipótesis de los resultados obtenidos del CL50, por existir homogeneidad en la población y es válido estadísticamente.

El valor obtenido de la curva de mortalidad es:

$$y' = 5.0736 \pm 1.767979 (X - 0.2760)$$

Además, se realizó el cálculo aritmético y dio como resultado el CL50 = 2.7 PPM. (Fig. 2); el cálculo gráfico logarítmico con resultado de CL50 = log. 0.35 = 2.23 PPM (Fig. 3)

Además, se trazó la curva provisional de mortalidad para *Tetraselmis sp.* en base a los logaritmos de las concentraciones y las probabilidades empíricas de los porcentajes de mortalidad, obtenidas en las Tablas de Bliss (Fig. 4)

CON- CEN- TRA- CION PPM	INOCULO DE CELULAS CONTROL 96 h	NUMERO DE CELULAS CONTROL 96 h	CRECI- MIENTO	MORTA- LIDAD	% CRECIMIENTO	% MORTALIDAD	LOGARITMO DE LAS CONCENTRA- CIONES	PRO- BITS EMPI- RICOS	PRO- BITS PROBA- BLES	PRO- BITS CORRE- GIDOS	W	W X	W Y	WXY	WX <sup>2</sup>	WY <sup>2</sup>
0.56	1 X 10 <sup>4</sup>	6.2 X 10 <sup>4</sup>	48.800	13.200	79	21	-0.2518119	4.194	4.23	6.1539	5.113	-0.7957	19.5082	4.8966	0.1997	120.0517
1	1 X 10 <sup>4</sup>	6.2 X 10 <sup>4</sup>	45.000	17.000	72	28	0.000	4.417	4.48	5.6786	5.7638	0.000	20.2926	0.0000	0.0000	115.2348
1.8	1 X 10 <sup>4</sup>	6.2 X 10 <sup>4</sup>	35.000	27.000	56	44	0.2552725	4.849	4.73	5.1632	6.1949	0.9889	20.0000	5.1060	0.2525	103.2636
3.2	1 X 10 <sup>4</sup>	6.2 X 10 <sup>4</sup>	30.000	32.000	48	52	0.5051499	5.050	4.97	3.7452	6.3591	1.9914	14.7660	7.4583	1.0059	55.3015
5.6	1 X 10 <sup>4</sup>	6.2 X 10 <sup>4</sup>	28.700	33.300	46	54	0.7481880	5.100	5.21	4.8943	6.2627	2.9052	19.0039	14.2187	2.1736	93.0109
											18.4427	5.0898	93.5709	21.8865	3.6317	486.8627

$\bar{X} = 0.2760$        $\text{Log. CL } 50 = 0.3176 = 2.08$

$\bar{Y} = 5.0736$

$b = 1.7680$

$X^2 = 5.1598$        $V(\text{Log. CL } 50) = 0.0175959 = 1.04$

$LC50 = 2.08 \pm 0.04 \text{ PPM}$

ECUACION DE LA CURVA DE MORTALIDAD:  $Y = 5.0736 + -1.767979 (X - 0.2760)$

**TABLA I.** Tabulación de los datos obtenidos mediante la prueba de toxicidad por el método de Bliss, con células de fitoplancton (*Tetraselmis* sp.) después de 96 horas de exposición al dispersante de petróleo BP 1100 WD

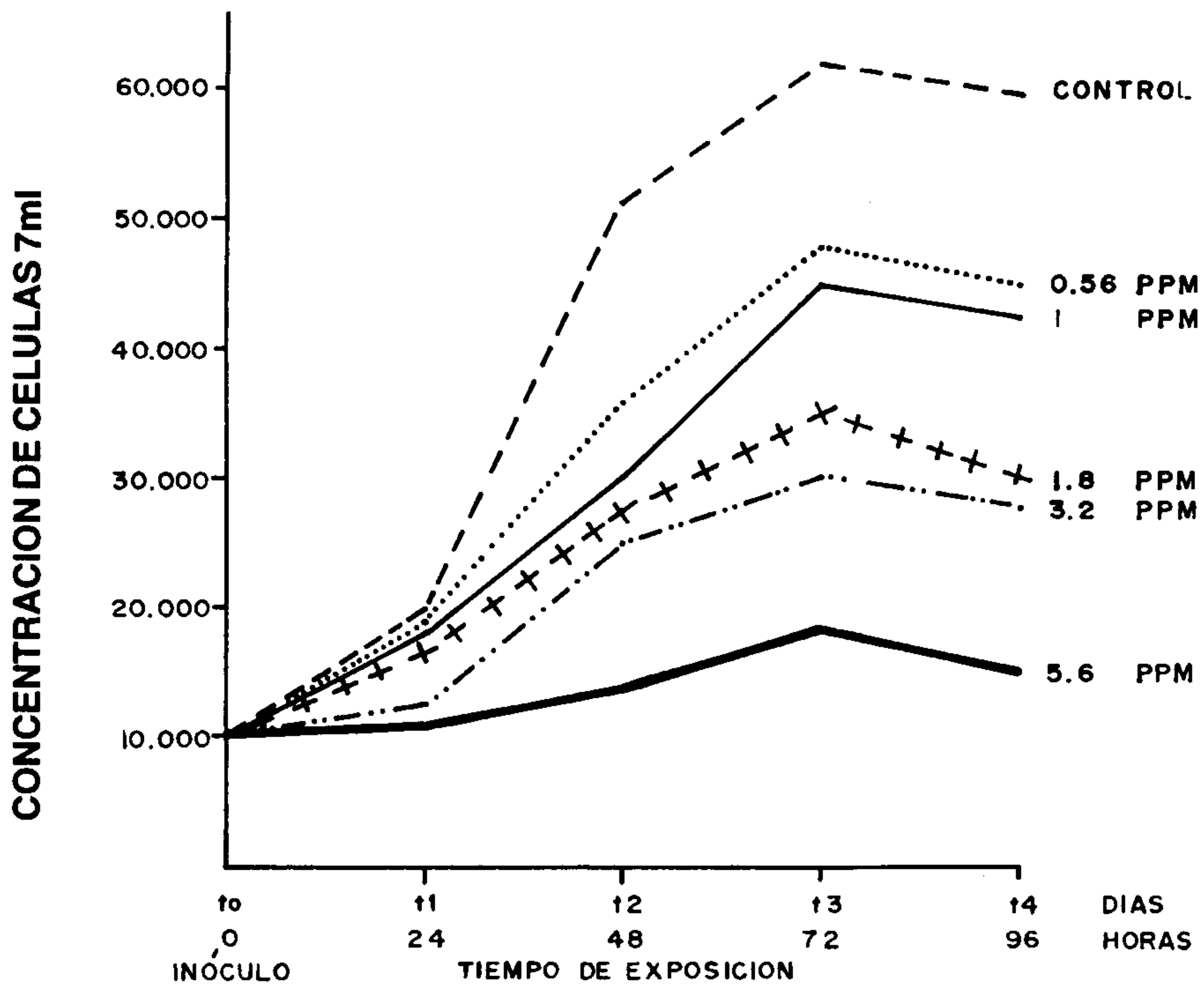


Figura 1. Prueba de toxicidad con fitoplancton (*Tetraselmis sp.*) presentando el número de células por ml. después de 96 horas de exposición al dispersante de petróleo BP-1100-WD.

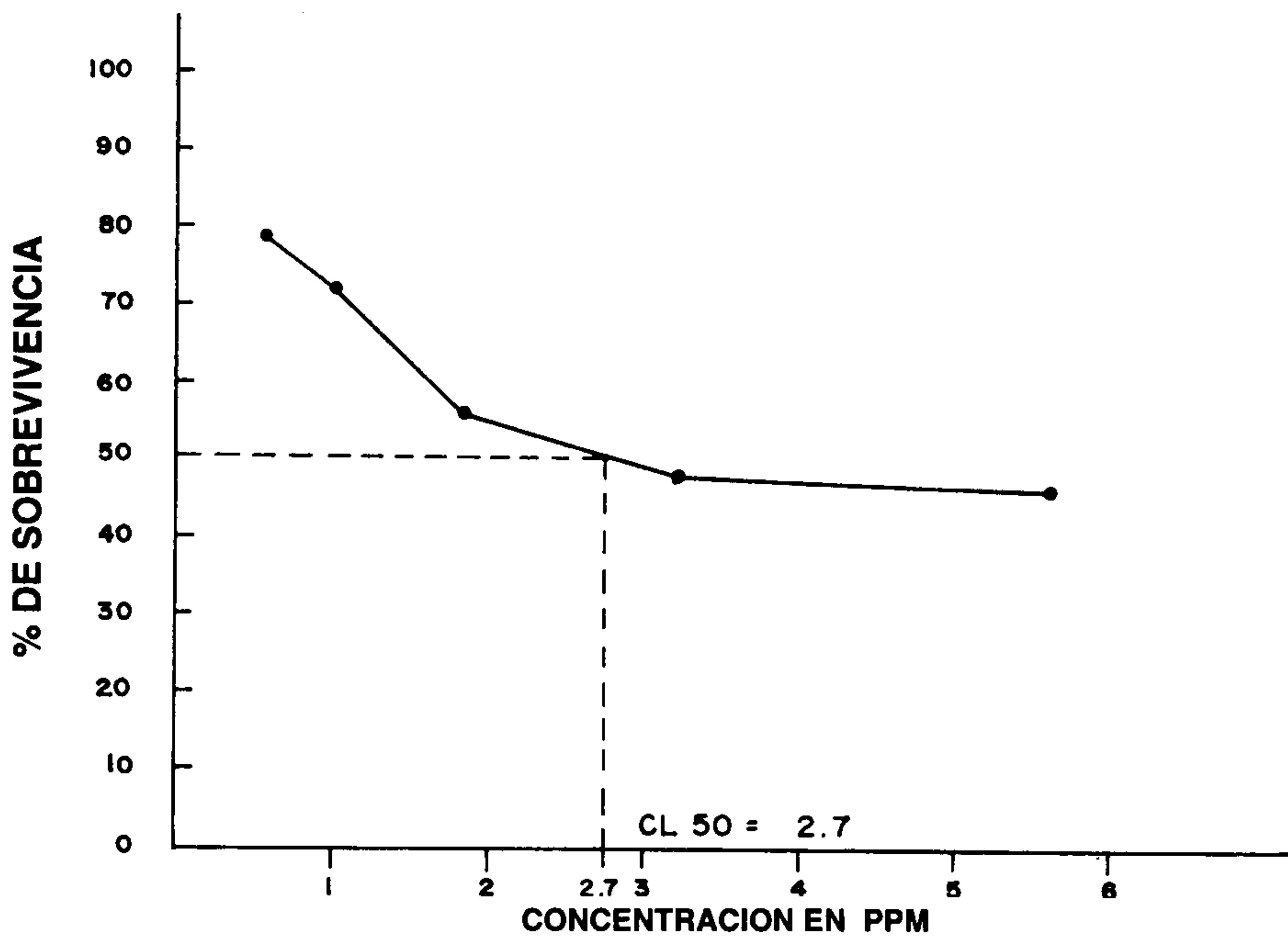


Figura 2. Cálculo del CL50-96h. Método aritmético para *Tetraselmis sp.*

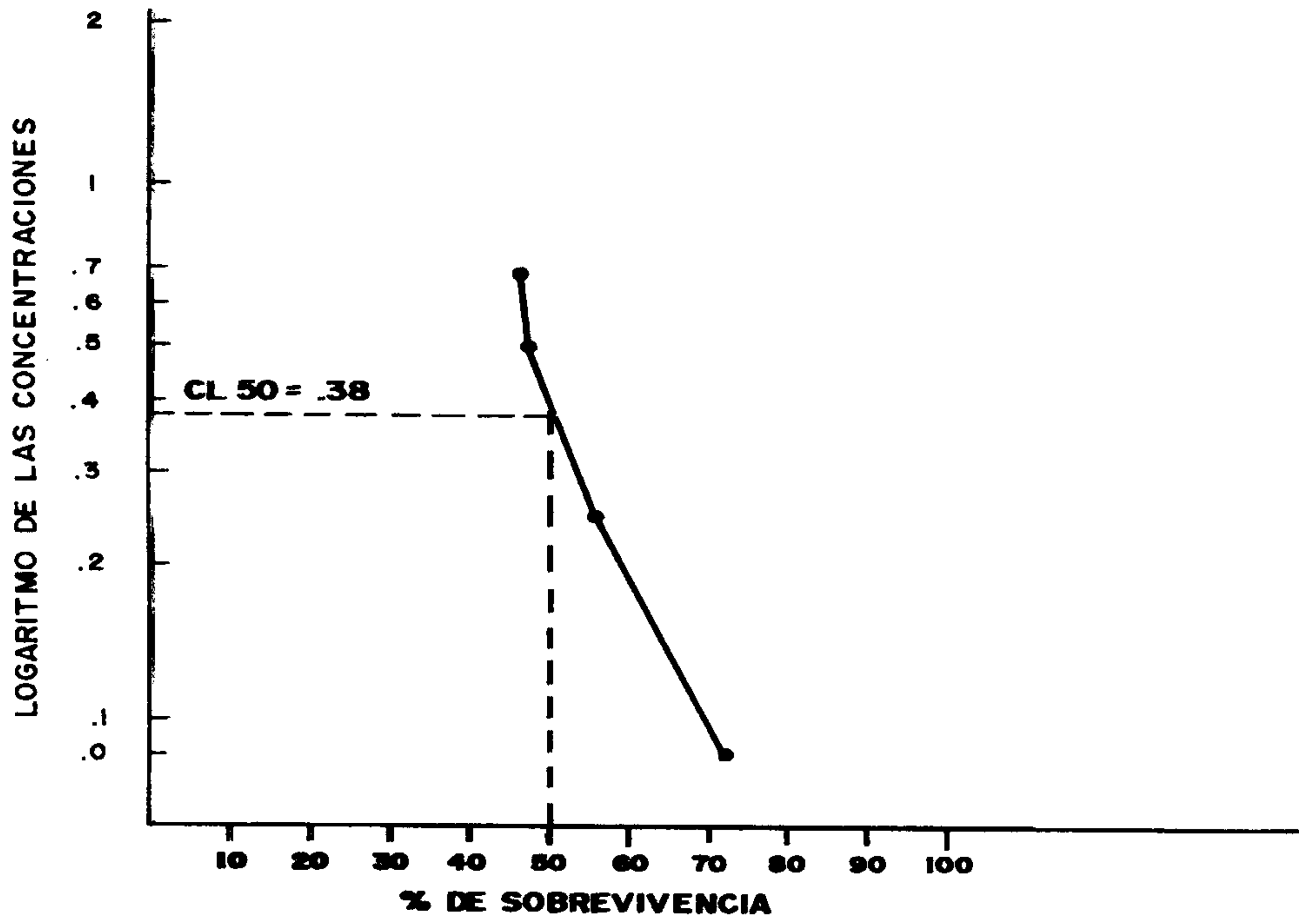


Figura 3. Cálculo del CL50-96h. Método gráfico logaritmo para *Tetraselmis sp.*

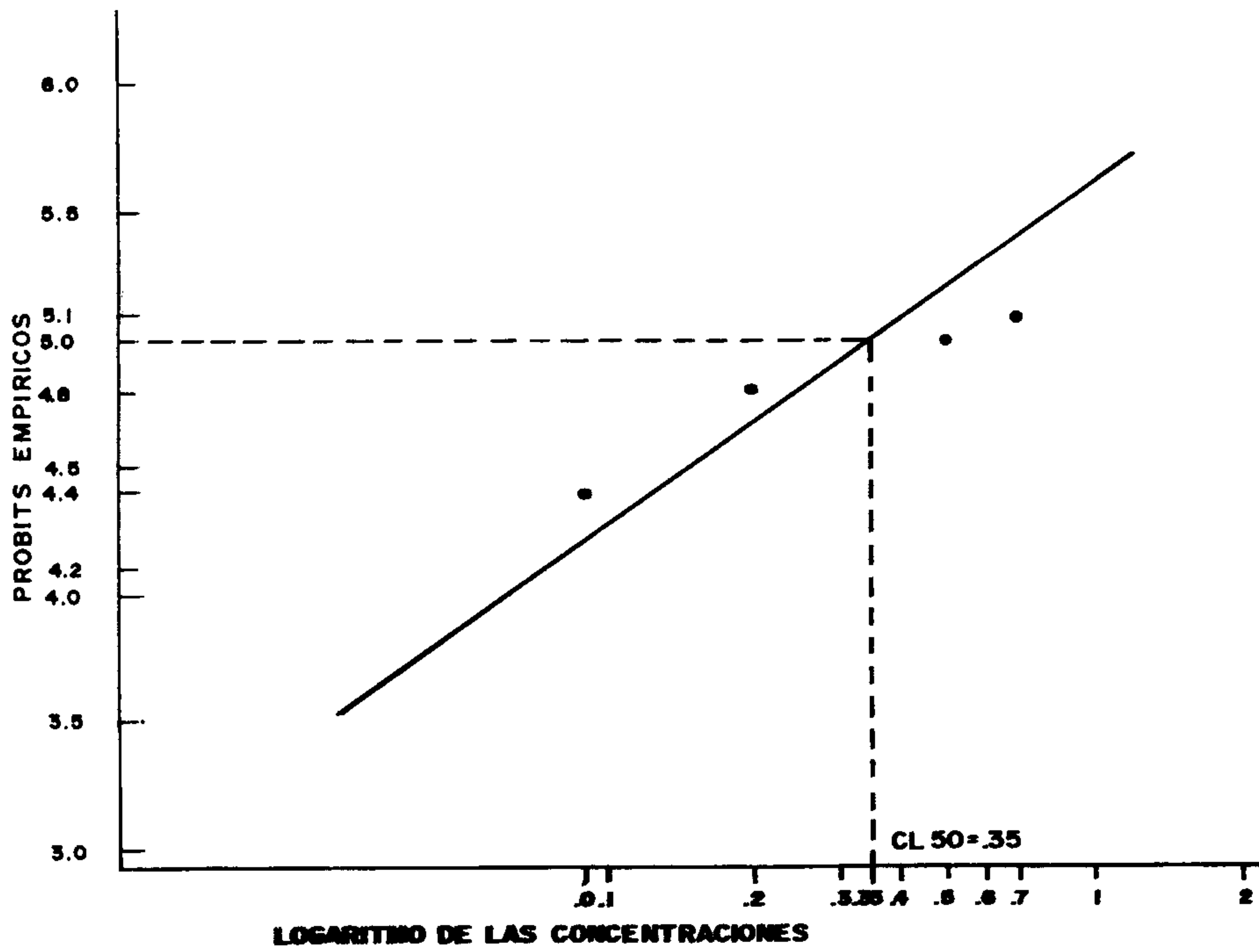


Figura 4. Curva provisional de mortalidad para *Tetraselmis sp.*

## CONCLUSIONES

El presente bioensayo tiene el carácter preliminar, se recomienda en el futuro llevar a cabo pruebas de toxicidad con otras especies de células del fitoplancton, así también con especies de animales del zooplancton marino.

De esta prueba se puede determinar que el dispersante de petróleo al ponerse en contacto con las células del fitoplancton (*Tetraselmis sp.*) impide su desarrollo natural e inhibe en forma franca su crecimiento debido principalmente a la concentración y permanencia del contaminante.

Se concluye que el poder de toxicidad del dispersante no es tolerable para los organismos del fitoplancton aún en las concentraciones más bajas (0.56 PPM). Además, se comprobó que los efectos letales estuvieron en todas las diluciones y las subletales en las concentraciones más bajas. Esta observación demuestra que es posible la recomendación del dispersante estudiado pero en

concentraciones menores a 1 PPM y solamente en los casos de extrema necesidad o emergencia, especialmente cuando ocurre un derrame de petróleo en el mar y áreas adyacentes.

Este dispersante es recomendado también por la COI (Comisión Oceanográfica Intergubernamental) y puede usarse por su baja toxicidad, especialmente si lo comparamos con otros dispersantes como Petrolite W 923 y gulf Agent 1123 que son conocidos como agentes tóxicos. (Nagel, et.al., 1974)

## AGRADECIMIENTO

Deseo agradecer al señor Director y al Jefe del Departamento de Ciencias del Mar del Instituto Oceanográfico de la Armada del Ecuador, por el apoyo que siempre han brindado para la realización de este tipo de trabajo científico. Al Sr. Víctor Mesías por la diagramación de las tablas y figuras aquí presentadas y, a mis colegas a cargo de los cultivos de fitoplancton por el apoyo brindado en esta investigación

## BIBLIOGRAFIA

**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.

**Stein, J., 1973.** Handbook of phycolgical methods, Culture Methods & Growth Measurements. Cambridge at the University Press: 448 p.

**Stora, G., 1974.** Computation of letal concentrations. Mar. Biol. Bul. 5 (5): 69-71.

**UNEP/FAO/IAEA, 1989.** Estimation of the toxicity of pollutants to marine phytoplanktonic and zooplanktonic organisms. Reference Methods for Marine Pollution Studies. (4): 1-24.

**Villamar, F., 1990.** Bioensayo para calcular el CL50 del dispersante de petróleo BP 1100 WD con larvas de camarón *Penaeus vannamei*. Acta Oceanográfica del Pacífico. INOCAR, Ecuador, 6 (1): 73-78.