

Efecto de los Hidrocarburos Fósiles en las Comunidades del Genero *Penaeus* del Banco de Campeche, Mexico

ALFONSO V. BOTELLO y SYLVIA A. CASTRO
Centro de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM
Laboratorio de Química Marina y Contaminación
México 20, D.F.

y

LORENZO JUAREZ M.
Escuela de Ciencias Marítimas y Alimentarias
ITESM, Guaymas, Mexico

ABSTRACT

A description is presented of the impingement of fossil hydrocarbons (derived from the activities of the oil industry) on the marine ecosystem. The sources, effects and fates of the contaminants are discussed together with the need to accomplish base-line studies which would permit the determination of the concentrations of these substances in the various components of the marine ecosystem.

Bioassays on adult shrimps of two species, *Penaeus duorarum* and *P. aztecus*, show that both species were able to accomplish major degradation of the saturate hydrocarbons between n-C₁₂ and n-C₂₂. The high molecular weight hydrocarbons in the range of n-C₂₄ to n-C₃₆ were found in the homogenized tissues in undegraded form indicating that their chemical properties were not altered by the shrimp's metabolism.

Toxicity bioassays conducted on the different life stages of the *P. californiensis* have shown that commercial fuel is highly toxic to the nauplii and protozoa stages in a range of 20 ppm and juvenile and postlarvae stages in a range of 40 ppm.

INTRODUCCION

Es indudable que en los últimos 50 años se ha incrementado de una manera dramática la importancia del petróleo como recurso energético. Hoy en día comenzamos a "pagar el precio" de nuestra dependencia por este recurso y en ocasiones de modo que nunca se anticipó, ya que hay que tomar en cuenta los daños que se han causado, los que se pueden causar y al mismo tiempo conservar esta incalculable riqueza para las generaciones futuras.

De la producción mundial de petróleo se estima que aproximadamente el 60 % es transportado por vía marítima y que el 0.1 % o cerca de 360 millones de galones son derramados en el mar. El petróleo crudo y sus productos de refinación son mezclas extremadamente complejas de compuestos orgánicos, de los cuales los hidrocarburos son los más abundantes llegando a comprender más del 75 % del total de los componentes (Farrington et al., 1972; Nelson-Smith, 1973). Estos hidrocarburos se agrupan en cuatro categorías principales, según su punto de ebullición y complejidad estructural en: (a) Parafinas, (b) Naftenos o Cicloparafinas, (c) Aromáticos, (d) Olefinas. Los primeros producen anestesia y narcosis en concentraciones bajas, causando daño celular y muerte en altas concentraciones. Los naftenos aunque se presentan como productos naturales de la biota marina pueden interferir y bloquear los procesos biológicos de organismos marinos, tales como búsqueda del alimento, escape de los predadores, selección del

Tabla 1. Recursos de hidrocarburos fosiles en el medio ambiente marino*

	Estimación reciente 1973	Estimación futura 1980's
Transportación marina	2.2	2.0
Producción de petróleo en la Plataforma Continental	0.1	0.1
Refinerías Costeras	0.2	0.05
Efluentes Municipales e Industriales	0.9	0.6
Acarreo Terrestre	1.6	1.9
Derrames Naturales	0.6	0.6
Transporte Atmosférico	0.6	0.6
TOTAL	6.20	5.85

*National Academy of Sciences Workshop (1975)

habitat y atracción sexual. Los hidrocarburos aromáticos son considerados como los componentes del petróleo más dañinos, ya que algunos actúan como venenos agudos y otros como el 3, 4-benzopireno presentan actividad carcinogénica.

Fuentes de Origen

En la tabla 1 se muestran las principales fuentes de origen de los hidrocarburos fósiles en el medio marino. Se ve que la transportación marítima es sin duda la fuente de contaminación más alta con un aporte de 2.2 millones de toneladas por año. Esta incluye pérdida durante operaciones normales de carga y descarga de buques petroleros, derrames que resultan de los accidentes en el mar y derrames durante operaciones en terminales petroleras. Para 1980 se espera un decremento en este valor hasta 2.0 millones de tons/año debido al mejoramiento en cuanto a técnicas de lavado de buques-tanques y a los sistemas de tráfico y navegación marítima (U.S.C.G., 1973). La mayor parte del petróleo perdido en operaciones de dragado fuera de la costa se presenta cuando hay ruptura de tuberías y oleoductos, sin embargo se supone que los valores (0.1 millones tons/año) deberán permanecer sin grandes incrementos durante la próxima década.

El aporte de petróleo por medio de efluentes y refinerías se espera que disminuya de 0.2 hasta 0.05 millones tons/año, para 1980 debido a la aplicación de normas de control más estrictas y sistemas más eficientes para remover el petróleo o sus derivados de los efluentes. Asimismo el petróleo proveniente de las descargas municipales e industriales y descargado en la zona costera, puede disminuir de 0.9 hasta 0.6 millones tons/año, si existiera una reducción y regulación en cuanto a la producción de motores de combustión que usan derivados del petróleo como fuente energética (Anderson et al., 1974).

Dispersión y Efectos sobre Organismos Marinos

Los principales procesos involucrados en el destino del petróleo en el mar, se

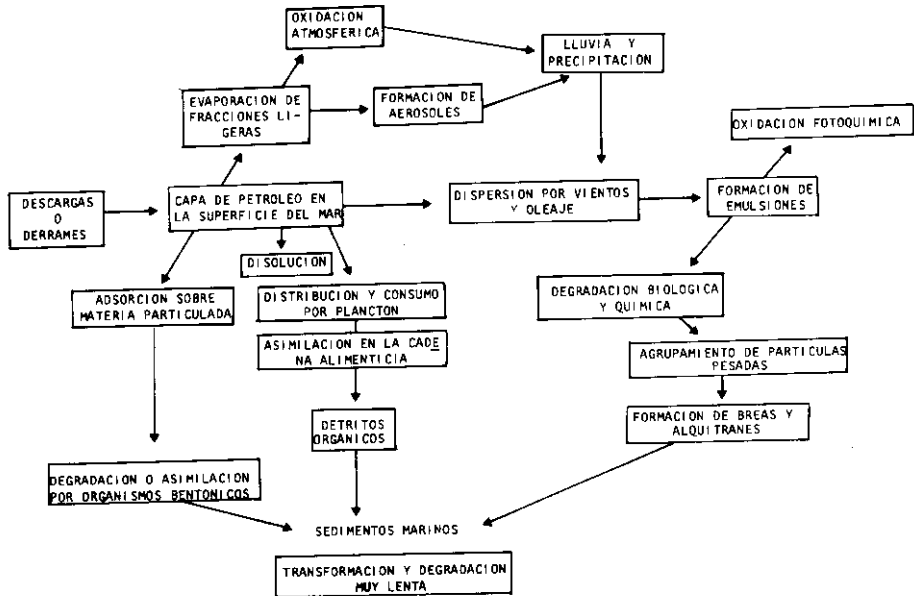


Figura 1. Principales procesos involucrados en el destino del petróleo en el mar.

ejemplifican en la figura 1. Después de la descarga o derrame petrolero se forma una delgada película en la superficie del mar, la cual se dispersa por acción del oleaje y los vientos. Sobre esta película actúan factores físicos que resultan en la pérdida por evaporación, Sivaider y Mikolaj (1973) emulsificación, Berridge et al. (1968), Mackay et al. (1973), disolución de las fracciones ligeras, Boylan y Tripp (1971) y adsorción sobre materia orgánica particulada, además del hundimiento de residuos no flotantes, Meyer y Quinn (1973). Cambios químicos importantes se presentan como resultado de la degradación por microorganismos, Zobell (1971), Erhardt y Blumer (1972) y procesos como la oxidación fotoquímica en la atmósfera, Berridge et al. (1968).

Sin embargo y a pesar de la pérdida por factores físicos y las transformaciones químicas, gran parte de los componentes del petróleo permanecen inalterados en el medio marino siendo dispersados y consumidos por el plancton, pasando de esta manera a las cadenas alimenticias y llegando hasta organismos bentónicos en donde son bioacumulados o bien van a los sedimentos permaneciendo aquí por largo tiempo, ya que la transformación y degradación es muy lenta.

Una vez que el petróleo y sus derivados se han dispersado, actúan y producen efectos nocivos sobre los organismos marinos, dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición a que estén expuestos. En concentraciones más bajas de 0.1 ppb retardan la división celular y el crecimiento del plancton, Mironov (1970). En concentraciones mayores a 1 ppm producen muerte de gran cantidad de especies fitoplanctónicas, así como de larvas y huevecillos de peces los cuales flotan junto con el plancton. Por debajo de la capa de petróleo la penetración de la luz puede

reducirse hasta un 90 % con lo cual decrece drásticamente la tasa de fotosíntesis en el fitoplancton interfiriendo también las migraciones verticales diurnas del zooplancton las cuales están reguladas por la intensidad de la luz.

En los organismos bentónicos y principalmente los bivalvos (ostras y mejillones) que son de hábitos filtradores para la obtención de su alimento, el petróleo o sus componentes llegan a través de pequeñas partículas suspendidas, las cuales se fijan en los tejidos proporcionando un sabor y olor característico a petróleo, con lo cual decrece la calidad comercial de estas especies y en ocasiones dichas partículas obturan el sistema respiratorio produciendo la muerte por asfixia de gran cantidad de bivalvos, Spooner (1968), Simpson (1968), Blumer et al. (1970).

En peces adultos el petróleo parece tener efectos de tipo mecánico, ya que al depositarse sobre las branquias las cubre no permitiendo el intercambio de gases con lo cual los peces mueren por asfixia, Mironov (1970). También el grado de toxicidad de estos contaminantes es muy variable según la especie de que se trate, pero por lo general en concentraciones de 0.5 a 10 ppm dañan los órganos de los sentidos produciendo además erosión y destrucción de las células que forman el epitelio branquial, Bardach et al. (1965), Scheier y Cairns (1966).

De igual manera la presencia del petróleo causa daños en la vegetación marina, ya que en concentraciones de 10 a 100 ppm inhibe la fotosíntesis, teniendo ésto singular importancia, debido al papel que desempeñan los vegetales como productores primarios y en los cuales se basa la economía energética del ecosistema marino, Odum (1972).

De esta manera la contaminación por petróleo ha causado numerosos desastres ecológicos debido a la presencia de hidrocarburos fósiles en el medio ambiente y su acción nociva sobre los ecosistemas y comunidades marinas (Mironov, 1968; Blumer, 1970).

Sin embargo, muy poco o casi nada se conoce sobre los mecanismos biológicos naturales de degradación del petróleo y sus derivados por organismos marinos y sus efectos en ellos. Algunos investigadores han reportado el consumo y metabolismo de algunos hidrocarburos por invertebrados marinos (Lee et al., 1972), así como por algunos vertebrados especialmente peces (Diamon y Clark, 1970; Clark y Diamon, 1971) y mamíferos (Nelson-Smith, 1973; Sims, 1967; Robertson y Dunstan, 1971).

A pesar de esta biodegradación y la acción de algunas bacterias para consumir hidrocarburos de bajo peso molecular, principalmente la fracción correspondiente a las parafinas normales (Zobell, 1969; Oppenheimer et al., 1971), otros hidrocarburos como los correspondientes al tipo aromático polinuclear, no pueden ser degradados y se acumulan en los sedimentos y en los organismos marinos, interfiriendo procesos biológicos importantes llegando a producir inclusive el cáncer (Blumer, 1967; Mironov, 1968; Mallet y Priou, 1967; Russell y Kotin, 1956 y Martin, 1971).

Con referencia a los productos de refinación del petróleo crudo Woodin et al. (1972) han estudiado los efectos de un derrame de combustible diesel en la costa norteamericana del estado de Washington, hallando una gran mortalidad inicial de los invertebrados en el área, seguida de una recolonización gradual por parte de las especies sensitivas. También se demostró la persistencia del diesel tanto en los sedimentos marinos de la zona, como en los tejidos de diversos animales. North

(1961) y North et al. (1964) han reportado los cambios ecológicos registrados en la zona sometida al derrame de diesel procedente del naufragio del barco TAMPICO MARU ocurrido en marzo de 1957. Sus estudios demostraron la gran toxicidad de este combustible a varios animales y plantas de la región. Los abulones del género *Haliotis*, fueron eliminados de la zona por más de 2 años después del accidente.

El presente trabajo tiene por objeto el observar en dos especies de camarón, provenientes del Banco de Campeche, (*Penaeus duorarum* y *Penaeus aztecus*) los efectos biológicos causados por la ingestión del petróleo crudo y la biodegradación de algunos de sus componentes por estos organismos. En la especie *Penaeus californiensis* y sus diferentes estadios de vida se realizaron bioensayos de toxicidad para observar su sensibilidad al combustible diesel.

MATERIALES Y METODOS

Las especies seleccionadas para el presente trabajo fueron ejemplares adultos de *Penaeus duorarum*, *Penaeus aztecus* y *Penaeus californiensis*. Las especies de *P. aztecus* y *P. duorarum* se emplearon para observar la utilización y degradación del petróleo crudo proveniente de Kuwait, el cual fue dosificado en una concentración de 30 ppm, en una dieta especial (Juárez, 1980). Después de 6 semanas, al final del experimento los camarones fueron sacrificados y macerados hasta obtener un homogeneizado el cual fue puesto inmediatamente en congelación por 12 h, al cabo de las cuales se procedió a la extracción de los hidrocarburos fijados a través de la dieta.

Extracción. Los homogeneizados se colocaron en columnas de extracción tipo Soxhlet en posición de reflujo por 2 h. Los solventes empleados fueron previamente purificados y redestilados. Se usaron Metanol-benceno a proporción 1:1 de volumen. Después de la extracción, los hidrocarburos se concentraron por medio de una rotovaporadora y el concentrado fue analizado en el cromatógrafo de gases.

Cromatografía de Gases. Para el análisis de los hidrocarburos se empleó un cromatógrafo de gases modelo Hewlett Packard modelo 5750 con detector de llama ionizada, y programador lineal de temperatura con columnas de vidrio de 5 pies y 4 mm de diámetro interno, las cuales fueron empacadas con Apiezon L al 2% sobre Chromosorb W previamente lavado en ácido y siliconizado. La temperatura fue programada de 100°C a 300°C, aumentando en un rango de 4°C por minuto. Como gas de transporte se empleó N₂ con un promedio de flujo de 25 ml/min. La temperatura de las columnas se mantuvo a 290°C. Las muestras fueron corridas por duplicado, antes y después de la adición de un estándar interno de petróleo crudo, el cual contenía desde parafinas normales hasta hidrocarburos con C₃₆.

De la especie *P. californiensis* se emplearon los diferentes estadios de vida (nauplio, protozoa, post-larva y juvenil) sobre los cuales se realizó un bioensayo de toxicidad para observar su sensibilidad al combustible diesel. La alimentación de los estadios larvarios antes de las pruebas de toxicidad fue a base de algas unicelulares y con nauplios de *Artemia salina*. Las post-larvas y juveniles se alimentaron con una dieta artificial (Juárez, 1980) proporcionándoles una cantidad de alimento igual al 20% de su biomasa cada día.

Con relación a las pruebas de toxicidad, el procedimiento general fue el de someter a grupos de organismos a diferentes concentraciones de combustible diesel en agua de mar, usándose concentraciones entre 10 y 1000 ppm (Juárez, 1980).

RESULTADOS

Efectos Biológicos. Después del periodo de aclimatación a las condiciones experimentales, los camarones ingerían sin problema la dieta, conteniendo petróleo crudo dosificado. Durante la primera semana, después de la ingestión del petróleo, se observó en la mayoría de los acuarios que la actividad de los camarones decrecía grandemente con relación a las especies testigos, en ocasiones eran incapaces para reconocer el alimento escapando de él y luego de la ingestión giraban sobre su cuerpo contrayéndose bruscamente y buscando el sitio donde estaba colocada la bomba que oxigenaba el acuario, en donde se mantenían por periodos grandes. Pasada esta semana, los camarones volvieron poco a poco a su ritmo de actividad normal, desplazándose por todo el acuario, y durante la ingestión del alimento desaparecieron las contracciones y dejaron de girar. Las observaciones periódicas de peso y talla nos muestran que al final del experimento, los organismos experimentales aumentaron de peso y longitud de una manera paralela a los controles, lo cual indica que en el grupo experimental no se presentó alteración metabólica no obstante la ingestión de la dieta conteniendo petróleo.

Cromatografía. Los cromatogramas correspondientes al estándar de petróleo crudo muestran la presencia de hidrocarburos correspondientes a las parafinas normales que van desde el Dodecano ($C_{12}H_{26}$), hasta el Hexatriacontano ($C_{36}H_{74}$), con un máximo de concentración entre el Tetradecano ($C_{14}H_{30}$) y el Octadecano ($C_{18}H_{38}$). En ellos también se observaron la presencia de hidrocarburos biogénicos como el Pristano y Fitano aunque enmascarados por los hidrocarburos con C_{17} y C_{18} respectivamente (Figs. 2A y 3A). El cromatograma del grupo experimental de *P. duorarum* nos muestra de manera sorprendente la biodegradación casi total de los hidrocarburos comprendidos entre el Dodecano ($C_{12}H_{26}$) y el Eicosano ($C_{20}H_{42}$) llevada a cabo por esta especie, en cambio a partir del Docosano ($C_{22}H_{46}$) hasta el Hexatriacontano ($C_{36}H_{74}$) no pueden ser degradados y permanecen inalterados en los tejidos de los camarones (Fig. 2B). Los cromatogramas de los grupos controles de *P. duorarum* obtenidos antes y después del experimento no muestran diferencias significativas siendo casi idénticos. En ellos se observan hidrocarburos de origen biogénico contenidos en los organismos y cuyo rango va exclusivamente del Dodecano ($C_{12}H_{26}$) al Eicosano ($C_{20}H_{42}$) (Figs. 2C y 2D).

Con relación a la especie *P. aztecus* el cromatograma del grupo experimental nos muestra que a pesar de que se efectuó una biodegradación de hidrocarburos ligeros, no fue tan intensa como en *P. duorarum*, permaneciendo fijo en los tejidos los hidrocarburos con alto peso molecular. Los cromatogramas de los controles de *P. aztecus* muestran también entre sí gran similitud y a diferencia de los correspondientes a *P. duorarum* solamente aparecen hidrocarburos que van desde el Tetradecano ($C_{14}H_{30}$) al Eicosano ($C_{20}H_{42}$) con una concentración mayor en el Hexadecano ($C_{16}H_{34}$) y el Octadecano ($C_{18}H_{38}$) (Fig. 3A-D).

Los datos obtenidos a través de los bioensayos de toxicidad para los diferentes estadios de vida de *P. californiensis* se muestran en la fig. 4. En la primera de ellas, correspondiente a los estadios larvarios se observan que ni las protozoas ni los nauplios, la curva alcanza una pendiente de cero, lo cual significa que en ninguno de los casos se alcanzó el LLI (Limite Letal Incipiente) en el rango de las concentraciones que fueron empleadas. Sin embargo la curva perteneciente a las protozoas posee una pendiente menor, sobre todo en su parte más baja, lo cual

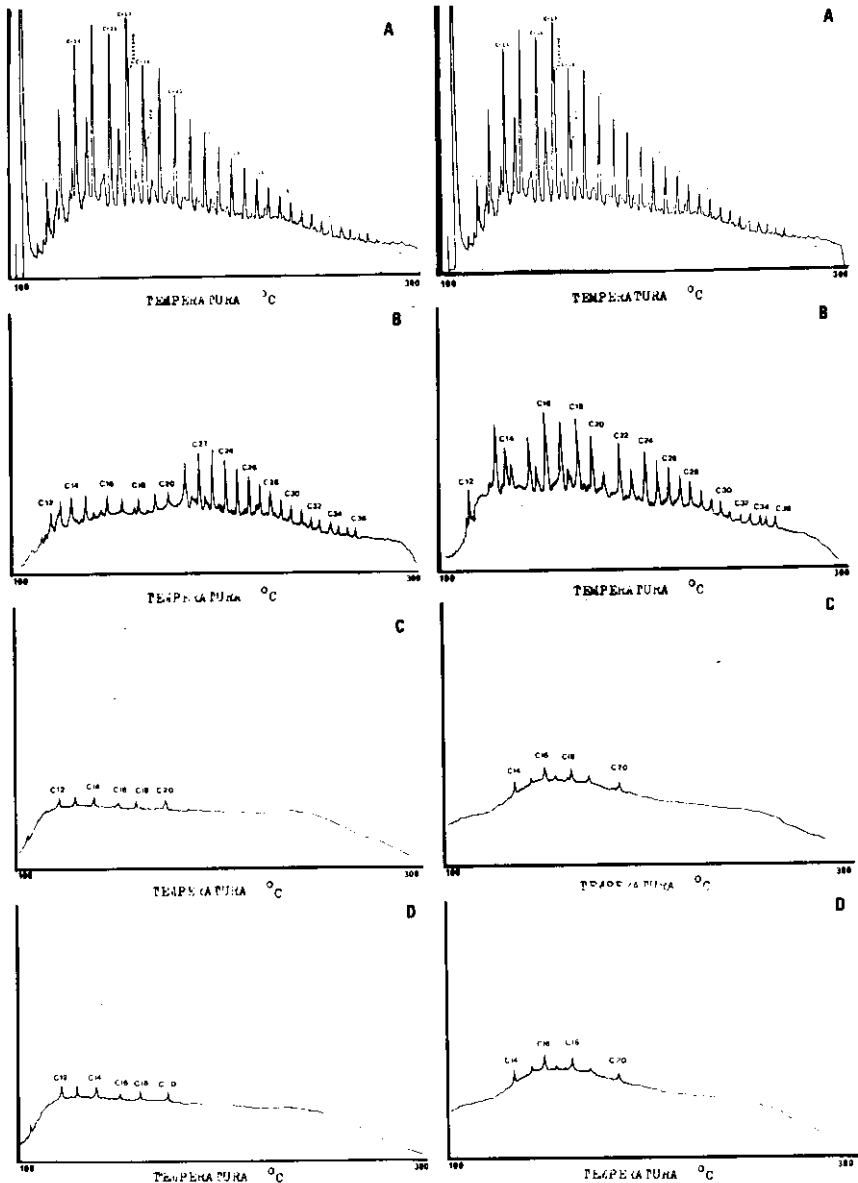


Figura 2. (Izquierda) Cromatograma; A.- Petróleo crudo, B.- *Penaeus duorarum* experimental, C.- *P. duorarum* control antes del experimento, D.- *P. duorarum* control después del experimento.

Figura 3. (Derecha) Cromatogramas; A.- Petróleo crudo, B.- *Penaeus aztecus* experimental, C.- *P. aztecus* control antes del experimento, D.- *P. aztecus* control después del experimento.

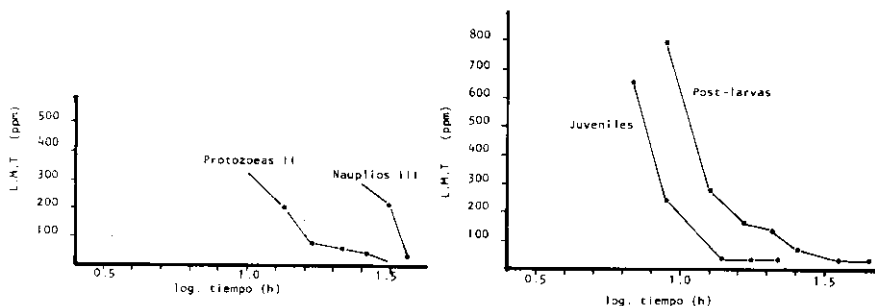


Figura 4. (Izquierda) Límites medios de tolerancia al diesel para los estadios larvarios de *Penaeus californiensis* a distintos periodos de tiempo.

Figura 5. (Derecha) Límites medios de tolerancia al diesel para postlarvas y juveniles de *Penaeus californiensis* a distintos periodos de tiempo.

puede ser un indicio que el LLI se encuentra bastante cercano. La curva de los nauplios presenta una pendiente mucho más pronunciada, lo cual es un claro significado que el LLI para este estadio es menor que para las protozoas. El examen de estas curvas sugiere que, aunque las protozoas resisten concentraciones iguales de diesel por menos tiempo que los nauplios, éstos últimos son más sensibles a concentraciones bajas después de transcurrido el tiempo necesario para que se alcance el LLI.

La figura 5 muestra las curvas obtenidas para juveniles y post-larvas de *P. californiensis*. En este caso si se han alcanzado los LLI, siendo iguales a 40 ppm para ambos estadios de vida. Sin embargo las post-larvas tardan un tiempo mayor en alcanzar ese límite, por lo que los juveniles resultan ser más sensibles a exposiciones cortas, además de presentar una adaptación al tóxico. Las figuras 6 y 7 muestra la misma relación que la anterior, solo que para los estadios juveniles y post-larvas, notándose que los juveniles fueron más seriamente dañados que las postlarvas en todas las concentraciones usadas.

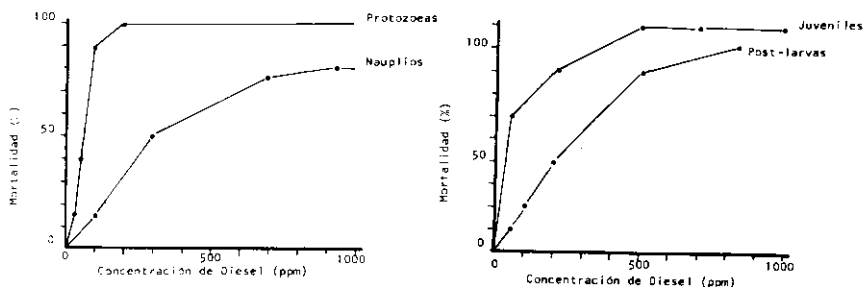


Figura 6. (Izquierda) Mortalidad causada, por distintas concentraciones de diesel a las 24 h de exposición, a larvas de *Penaeus californiensis*.

Figura 7. (Derecha) Mortalidad causada, por distintas concentraciones de diesel a las 14 h de exposición, a postlarvas y juveniles de *Penaeus californiensis*.

En las tablas 2 y 3 están contenidos los resultados en términos de la LC₅₀ (Concentración Letal 50) para los diferentes estadios de *P. californiensis*, así como algunos datos de toxicidad que presentan diversos agentes para otros crustáceos.

De igual manera, es notable el hecho de que la adición de propilenglicol para la dispersión del combustible diesel en agua marina resultó ser muy tóxico para los organismos. Esto puede deberse a los efectos tóxicos propios del solvente, a la mayor dispersión del diesel en el agua o bien a un efecto combinado de estos dos factores (sinergismo), lo cual es lo más probable, ya que existen reportes de que el propilenglicol puede alcanzar niveles tóxicos para algunos organismos, Ludemann y Funke (1979).

DISCUSION

No obstante la gran cantidad de datos obtenidos en el laboratorio a través de experimentos y pruebas de toxicidad acerca de los efectos de la contaminación por petróleo sobre organismos marinos, los resultados no pueden ser totalmente comparados con situaciones naturales. Es conocido que las especies utilizadas son seleccionadas, así como también la concentración de los contaminantes y las condiciones experimentales que usualmente son diseñadas para ocasionar la muerte o provocar serias lesiones en pocos días a los organismos experimentales. Por lo tanto esto no revela de una manera significativa los efectos de los contaminantes a largo plazo. Sin embargo, gracias a este tipo de bioensayos se han podido definir los principales patrones de conducta de algunas especies hacia la contaminación por petróleo y sus derivados. De esta manera ha podido determinarse que algunos derivados del petróleo, aún en concentraciones muy bajas producen narcosis y anestesia en algunas especies (Goldacre, 1968). También producen interferencias en la actividad de algunos sistemas enzimáticos y otras proteínas (Manwell y Baker, 1967). Entre otros efectos se han comprobado malformaciones y marcados efectos sobre el desarrollo de huevos y larvas de peces y crustáceos, incluyendo en ocasiones la muerte de muchos organismos (Mironov y LansKaja, 1966).

En el presente trabajo se observa que a pesar de que *P. aztecus* y *P. duorarum* son capaces de biodegradar hidrocarburos ligeros, las fracciones pesadas son bioacumuladas por estos organismos. La importancia de este hecho radica en la posibilidad de la transferencia de estos compuestos a niveles tróficos superiores. En este sentido son de particular interés los derivados del petróleo de tipo aromático como los benzopirenos, los cuales no pueden ser degradados permaneciendo inalterados y aumentando en concentración conforme pasan a niveles tróficos superiores, alcanzando su máximo nivel en el hombre al cual llegan a través del

TABLA 2. Datos de toxicidad del Diesel para diversos estadios de vida de *Panaeus Californiensis* expresados en términos de LMT. (ppm)

Estadio	LMT (24h)	LMT (48h)
Juveniles	40	-
Postlarvas	100	40
Nauplios II	300	-
Protozoos II	55	-

TABLA 3. Toxicidad de diversas sustancias para algunos crustáceos.

Organismo	Estado	Sustancia	Toxicidad ppm.	Referencia
<i>Penaeus aztecus</i>	juvenil	Naftalenos	LMT (24h) 0.77-2.51	Anderson et al. (1974)
<i>Eurypanopeus depressus</i>	Zoea II	Petróleo crudo	LMT (48h) 17.0	Cucci y Epifanio. (1979)
<i>Cancer magister</i>	Zoea I	Petróleo crudo	LMT (48h) 7.0	Caldewell et al. (1977)
<i>Crangon septemspinosa</i>	Adultos	"Heptachlor" (insecticida organoclorado)	LMT (24h) 110 LMT (48h) 28	Eisler (1969)
<i>Crangon crangon</i>	Adultos	"Stix" (emulsificador de petróleo)	LMT (48h) 114.5	Portmann y Connor (1968)

consumo de especies marinas, principalmente peces, crustáceos y moluscos (Blumer, 1970; Zobell, 1971).

De los derivados del petróleo se observa que el combustible diesel es un agente tóxico de importancia para el camarón *P. californiensis* en especial para sus estadios larvarios, ya que sus LLI para nauplios y protozoas se encuentran por debajo de los 20 ppm. Los datos obtenidos sugieren que los nauplios poseen un LLI aún más bajo que las protozoas, por lo que son más sensibles a concentraciones bajas mantenidas por un tiempo suficientemente grande. Las protozoas por su parte son especialmente sensibles a exposiciones más severas, pero de corta duración. Los estadios juveniles de *P. californiensis*, al igual que las post-larvas presentan un LLI igual a 40 ppm, sin embargo las post-larvas resisten exposiciones de igual intensidad por tiempos mayores. Finalmente, en periodos fijos de tiempo a iguales concentraciones de diesel las poblaciones de protozoas resultaron siempre más dañadas que las de nauplios y las de juveniles más que las de post-larvas.

LITERATURA CITADA

- Anderson, J.W., R.C. Clark and J.J. Stegeman.
1974. Petroleum hydrocarbons, *In*: Marine bioassays workshop proceedings, sponsored by API, EPA and Marine Technology Soc. published by MTS, Wash. D.C., 308 p.
- Bardach, J.E., M. Fujiya and A. Holl.
1965. Detergents: effects on the chemical senses of the fish *Ictalurus natalis*. *Science* 148: 1605-1607.
- Berridge, S.A., R.A. Dean, R.G. Fallows and A. Fish.
1968. The properties of persistent oil at sea. *In*: Scientific aspects of pollution of the sea by oil. Institute of Petroleum, London, 2-11.
- Blumer, M.
1967. Hydrocarbons in digestive tract and liver of a basking shark. *Science* 156: 390-391.
- _____
1970. Oil contamination and the living resources of the sea. *In*: FAO Tech. Conf. Mar. Pollut, Rome: 476-481.
- _____, and R.C. Clark, Jr.
1970. Hydrocarbon pollution of edible shellfish by an oil spill. *Mar. Biol.* 5: 195-202.
- _____, G. Souza and J. Sassi.
1970. Hydrocarbon pollution of edible shellfish by an oil spill. Woods Hole Oceanographic Institution, Tech. Rep.: 1-70.

- Boylan, D.B. and B.W. Tripp.
1971. Determination of hydrocarbons in sea water extracts of crude oil and crude oil fractions. *Nature* 230: 44-47.
- Clark, H.G. and L. Diamond.
1971. Comparative studies on the interaction of benzopyrene with cells derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. II. Effect of temperature on benzopyrene metabolism and cell multiplication. *J. Cell. Physiol.* 77: 385-392.
- Diamond, L. and H.G. Clark.
1970. Comparative studies on the interaction of benzopyrene with cell derived from poikilothermic and homeothermic vertebrates. I. Metabolism of benzopyrene. *J. Natn. Cancer Inst.* 45: 1005-1011.
- Erhardt, M. and M. Blumer.
1972. The source identification of marine hydrocarbons by gas chromatography. *Environ. Poll.* 3: 179-194.
- Farrington, J.W., G.S. Giam, G.R. Harvey, L.P. Parker and J.M. Teal.
1972. Analytical Techniques for selected organics compounds. *In*: E.D. Golberg, ed. Marine pollution monitoring: strategies for a national program, a workshop. Santa Catalina Marine Biological Laboratory: 152-176.
- Goldacre, R.J.
1968. The effects of detergents and oils on the cell membrane. *Fld. Studies.* 2: 131-138.
- Juarez, M.L.
1980. Toxicidad aguda del combustible diesel en *Penaeus californiensis*. Reporte Técnico. Escuela de Ciencias Marinas y Alimentarias, ITESM, Guaymas. 23 pp.
- Lee, R.F., R. Sauerheber and A.A. Benson.
1972. Petroleum hydrocarbons: uptake and discharge by the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Science* 177: 344-346.
- Ludemann, L.R. and C.E. Funke.
1979. Mold control in insect rearing media: survey of agricultural fungicides and evaluation of the use of humectants. *Jour. Econ. Entomol.* 72: 579-582.
- Mackay, G.D., A.Y. McLean, O.J. Betancourt and B.D. Johnson.
1973. The formation of water-in-oil emulsions subsequent to an oil spill. *J. Inst. Petrol.* 59 (568): 164-172.
- Mallet, L. et M.L. Priou.
1967. Sur le retention des hydrocarbures polybenziques du type benzo-3, 4 pyrene par les sediments, la faune et la flora de la Baie de Saint-Malo. *Cir. Hebd. Seances Acad. Sci., Paris.* 264: 969-971.
- Manwell, C. and M.C. Baker.
1967. A study of detergent pollution by molecular methods: starch gel electrophoresis of a variety of enzymes and other proteins. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 47: 659-675.
- Martin, A.E.
1971. Water pollution and oil — Some health considerations. *In*: Water pollution by oil. Institute of Petroleum, London: 153-158.
- Meyers, P.A. and J.G. Quinn.
1973. Association of hydrocarbons in subsurface brines. *Chemical Geology* 4: 225-233.
- Mironov, O.G.
1968. Hydrocarbon pollution of the sea and its influence on marine organisms. *Helgolander Wiss. Meeresunters* 17: 335-339.
-
1970. The effect of oil pollution on the flora and fauna of the Black Sea. *FAO Tech. Conf. Mar. Poll. Rome. Paper E-92.*
-
- _____ and L.A. Lanskaja.
1966. The influence of oil on the development of marine phytoplankton. *In*: *Inst. Oceanogr. Congr. 2 (Moscow).*

- National Academy of Sciences.
1975. Petroleum in the marine environment. Washington, D.C. National Academy of Sciences, 107 p.
- Nelson-Smith, A.
1973. Oil pollution and marine ecology. Plenum Press, New York, 260 p.
- North, W.J.
1961. Successive biological changes observed in a marine cove exposed to large oil spillage. Institute of Marine Resources, Univ. California (Rep. 61/6). San Diego, California.
_____. M. Neushul and K.A. Clendening.
1964. Successive biological changes observed in a marine cove exposed to a large spillage of mineral oil. Symposium, Poll. Mar. Microorg. Prods. Petrol. Monaco, 335-354.
- Odum, E.P.
1972. Fundamentals of ecology. Sounders Eds. Philadelphia, 574 p.
- Oppenheimer, C.H., R. Midget and H. Kator.
1971. Microbial degradation on a Louisiana crude oil in close flasks and under simulated field conditions, *In: Proc. Conf. Prevent. Control Oil Spills. Wash.* 287-296.
- Portmann, J.E. and P.M. Connor.
1968. The toxicity of various refinery materials to freshwater fish. *Industr. Engng. Chem.* 46: 324-333.
- Robertson, J.S. and P.J. Dunstan.
1971. Metabolism of perhydroanthracenes in the rabbit. *Biochem. J.* 124: 543-547.
- Russell, F.E. and P. Kotin.
1956. Squamous papilloma in the white croaker. *J. Nation Cancer Inst.* 18: 857-861.
- Sims, P.
1967. The metabolism of benzopyrene by rat liver homogenates. *Biochem. Pharmac.* 16: 613-618.
- Simpson, A.C.
1968. The Torrey Canyon disaster and fisheries. Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London.
- Sivaider, H.O. and P.G. Mikolaj.
1973. Measurement of evaporation rates from oil slicks on the open sea. *Proceedings of the Joint EPA, API, USCG. Conference on Prevention and Control of Oil Spills. Washington, D.C. March 13-15, 1973: 475-484.*
- Spooner, M.F.
1968. Preliminary work on comparison toxicities of some oil spill dispersants and few test with oil and corexit. Marine Biological Association, Plymouth. *Mar. Poll. Bull.* 1: 166-167.
- Scheier, A. and J. Cairns.
1966. Persistence of gill damage in *Lepomis gibosus* following a brief exposure to alkyl benzene sulfonate *Notul. Nat. Phila.* 391: 1-7.
- U.S. Coast Guard.
1973. Draft environmental impact statement. For International Convention for the prevention of pollution from ships. 89 p.
- Woodin, S.A., C.F. Nyblade and F.S. Chia.
1972. Effects of diesel spill on invertebrates. *Mar. Poll. Bull.* 3: 139-143.
- Zobell, C.F.
1969. Microbial modification of crude oil in the sea. *In: Joint API-FWPCA Conf. Prevent. Control Oil Spills. Wash.*
_____.
1971. Sources and biodegradation of carcinogenic mydrocarbons. *In: Proc. Conf. Prevent. Control Oil Spills. Wash.:* 441-451.