

Assessing the potential toxicity of marine sediments found in petroleum industry areas:  
A new approach based on responses of postlarval shrimp

Evaluación del potencial de toxicidad de sedimentos marinos en áreas de la industria petrolera:  
Un nuevo método basado en respuestas de postlarvas de camarones

A.J.A. Evangelista<sup>1</sup>  
I.A. Nascimento<sup>1\*</sup>  
S.A. Pereira<sup>1</sup>  
M.B.N.L. Lopes<sup>1</sup>  
L.K.P. Martins<sup>1</sup>  
G. Fillmann<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Lab. de Bio Marinha e Biomonitoramento, IBIO-UFBA  
Campus Universitário de Ondina  
Salvador, BA, 40170-290, Brazil  
Faculdade de Tecnologia e Ciências – FTC  
\* E-mail: iracema@ftc.br, iraceman@ufba.br

<sup>2</sup> Fundação Universidade do Rio Grande  
Depto. de Oceanografia  
C.P. 474  
Rio Grande, RS, 96201-900, Brazil

<sup>3</sup> Plymouth Marine Laboratory  
Prospect Place  
West Hoe, Plymouth, PL1 3DH, UK

*Recibido en mayo de 2004; aceptado en agosto de 2004*

## Abstract

In this study we tested the toxicity of bulk sediment from the northeastern area of Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil, to evaluate environmental impact induced by 50 years of exposure to the local petroleum industry (Petrobras). Sediment samples were collected during one year, at three-month intervals, from four sites in areas of oil extraction (Ilha das Fontes, station 4), transportation (Ilhas de Madre de Deus and Pati, stations 2 and 3) and refinement (RELAM, station 1). Two reference stations (5 and 6) were located outside the petroleum influence area, to the south of the bay. Static bioassays were conducted for 96 h, using 7–8 day old *Litopenaeus vannamei* postlarvae (PL). The assays were conducted in 2.5 L plastic jars containing 200 g of surface (1 cm deep) bulk sediment covered by 2 L of dilution water (filtered seawater, 28 ppt salinity, 27 ± 2°C and DO under saturation). Fifteen exposed PL in each jar were fed daily on 60 recently hatched *Artemia salina* nauplii. Physico-chemical parameters were monitored. Mortality and dry weight gain were taken as end-points. The PL mortality data obtained for sediment from the Petrobras stations in comparison to the data from the reference stations were not significantly different ( $P > 0.05$ ); however, the dry weight gain showed significant differences among stations. A maximum value was reached at station 5 (reference area) and a minimum at station 1 (RELAM refinery). Stations 2 and 3 in petroleum transportation areas did not show significant differences ( $P > 0.05$ ). To evaluate the sensitivity of this bulk-sediment test in detecting contaminant effects generated by the petroleum industry, the toxicity data were considered in terms of the hydrocarbon levels analyzed in sediments from the same Petrobras areas and in one of the control areas, located outside the bay. The results support the assumption that the bulk-sediment bioassay on penaeid PL is a suitable methodology not only to distinguish between impacted and relatively unperturbed environments, but also to separate the different degrees of impact among areas subjected to petroleum industry activities in the coastal environment.

*Key words:* bulk sediment, biomonitoring, penaeid PL bioassay, petroleum impact, hydrocarbon levels.

## Resumen

Se evaluó la toxicidad de sedimentos del área del noreste de la Bahía de Todos os Santos, Bahía, Brasil, para evaluar el impacto ambiental inducido por 50 años de actividad industrial petrolera (Petrobras). Se recolectaron muestras de sedimento durante un año, con intervalos de tres meses, en cuatro sitios relacionados con áreas de extracción (Ilha das Fontes, estación 4),

transporte (Ilhas de Madre de Deus y Pati, estaciones 2 y 3) y refinación del petróleo (RELAM, estación 1). Dos estaciones de referencia (5 y 6) se localizaron fuera del área de influencia del petróleo, al sur de la bahía. Se llevaron a cabo bioensayos estáticos por 96 h, usando postlarvas (PL) de *Lytopenaeus vannamei* con 7 a 8 días de desarrollo. El ensayo fue realizado en contenedores con 200 g de sedimento superficial (1 cm de profundidad) y 2 L de agua (agua de mar filtrada, 28 ppm de salinidad,  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y DO bajo saturación). Se alimentaron 15 PL en los contenedores diariamente con 60 nauplios de *Artemia salina*. Se monitorearon parámetros químicos. La mortalidad y la ganancia en peso seco fueron tomadas como parámetros de validación (*end point*). Los datos de mortalidad obtenidos de los sedimentos de las estaciones de Petrobras no mostraron diferencias significativas, en comparación con las estaciones de referencia; sin embargo, la ganancia en peso seco mostró diferencias significativas entre estaciones. El valor máximo se alcanzó en la estación 1 (refinería RELAM). Las estaciones 2 y 3 de las áreas de transporte de petróleo no mostraron diferencias significativas. Para evaluar la sensibilidad de la prueba del sedimento para detectar contaminación por la industria petrolera, los datos de toxicidad fueron considerados en términos de niveles de hidrocarburos analizados en dichos sedimentos en las áreas de Petrobras y una de las áreas de control, localizada fuera de la bahía. Los resultados indican que el ensayo de sedimentos con PL de peneidos es una metodología adecuada, no sólo para distinguir entre los medios impactados y relativamente no perturbados, sino también para separar los diferentes grados de impacto entre áreas sujetas a actividades de la industria petrolera en el ambiente costero.

*Palabras clave:* sedimento marino, biomonitoreo, bioensayo con postlarvas de peneidos, impacto por petróleo, niveles de hidrocarburos.

## Introduction

Todos os Santos Bay, one of the biggest bays in the world, is an estuarine complex bordered by extensive mangroves; however, it is characterized mainly by oceanic conditions (Nascimento *et al.*, 2000a, 2000b). The intensive water circulation permits high levels of water recycling within the bay, except at some stagnant points along its borders. As shown by Nascimento *et al.* (2000a), this water exchange does not totally prevent sediment toxicity in some areas of petroleum industry activity.

The Brazilian Petroleum Company (Petrobras) started its activities in the northeastern area of Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil ( $38^\circ37'30''$  W,  $12^\circ52'30''$  S), 50 years ago. It was not until the late 1990s, however, that an environmental diagnosis of the area was first carried out. The study involved a socio-economic, chemical, benthic and ecotoxicological survey to define the extent of the possible impacts generated by the industry (Peso-Aguiar and Almeida, 1996; da Silva *et al.*, 1997), but did not include bulk-sediment toxicity testing.

Sediments are recognized as sinks and sources of contaminants in aquatic ecosystems (Nipper *et al.*, 1998), especially in mudflat areas, and their analysis can indicate long-term effects of low pollution levels. Nevertheless, the ecological consequence of marine sediment contamination is still difficult to demonstrate (Roper *et al.*, 1988; Cairns *et al.*, 1992), as is the interpretation of bulk-sediment toxicity test results in terms of ecological significance.

It has been argued that to assess potential ecological impacts of pollutant contamination, the use of sensitive, local benthic species in toxicity tests can provide results which can be more accurately transferred to actual field conditions (Environment Canada, 1994, 1995). Penaeid shrimps are considered among the most sensitive estuarine crustaceans for toxicity tests (Cripe, 1994). Penaeid postlarvae (PL), after reaching the stage of PL7, develop a burrowing behaviour, making them particularly suitable for bulk-sediment testing. The tests, based on early-life stages, involve end-points that

## Introducción

La Bahía de Todos os Santos, una de las más grandes del mundo en un complejo estuarino, se encuentra bordeada por manglares; sin embargo, se caracteriza principalmente por tener condiciones oceánicas (Nascimento *et al.*, 2000a, 2000b). La circulación del agua permite altos niveles de reciclaje en la bahía, excepto en algunas áreas de los bordes. Como ha sido demostrado por Nascimento *et al.* (2000a), este recambio de agua no previene totalmente la toxicidad del sedimento en algunas áreas con actividad de Petrobras (Compañía de Petróleos de Brasil), quien hace 50 años comenzó sus actividades en el noreste de la Bahía de Todos os Santos, Bahía, Brasil ( $38^\circ37'30''$  W,  $12^\circ52'30''$  S). Sin embargo, el primer diagnóstico ambiental en la zona se realizó en los años noventa. Este estudio comprendió observaciones socioeconómicas, químicas, bénticas y ecotoxicológicas para definir el posible impacto generado por la industria (Peso-Aguiar y Almeida, 1996; da Silva *et al.*, 1997); sin embargo, no incluyó pruebas de toxicidad de sedimentos.

Los sedimentos son reconocidos como sumideros y fuentes de contaminación en los ecosistemas acuáticos (Ipper *et al.*, 1998), especialmente en áreas pantanosas. Debido a ello, su análisis puede indicar efectos a largo plazo de niveles bajos de polución; sin embargo, los efectos ecológicos de los sedimentos marinos contaminados aún son difíciles de demostrar (Roper *et al.*, 1988; Cairns *et al.*, 1992), así como lo es la interpretación de los resultados de pruebas de toxicidad de los sedimentos en términos de significado ecológico.

Para evaluar el impacto ecológico de la contaminación, el uso de la sensibilidad de especies locales en pruebas de toxicidad puede proveer resultados más precisos para evaluar la condición del ambiente actual (Environment Canada, 1994, 1995). Los camarones peneidos son considerados entre los crustáceos estuarinos más sensibles para las pruebas de toxicidad (Cripe, 1994). Después de alcanzar el estadio de PL7, la postlarva desarrolla un comportamiento béntico que es particularmente apropiado para probar la toxicidad de los sedimentos.

have ecological significance since they reflect population recruitment (McKim, 1985).

Based on the above considerations, the objectives of this study are three-fold: (1) to evaluate, based on a new and complimentary approach, the environmental impact induced by 50 years of exposure to the local petroleum industry; (2) to associate PL responses with the presence of petroleum hydrocarbons in sediments; and (3) to assess the possibility of predicting benthic effects by using bulk sediment as the source of contamination and penaeid PL as indicator organisms.

## Materials and methods

Sediment samples (oxic layer, 1 cm deep) were collected during low tide from intertidal mudflats, 50 cm above the water line. The samples were collected using a SS spatula and transported to the laboratory in ice boxes (4°C). Sediment for the chemical analysis was well mixed and kept frozen until analysis. For the bioassays, sampling was carried out at three-month intervals, at six sites, while for the chemical analysis, samples were taken at six-month intervals during the dry and rainy seasons. Four of these sites are areas with petroleum activity, including oil extraction (station 4), transportation lane (station 2), transport terminal (station 3) and refinery (station 1), and are located, respectively, at Ilha das Fontes (12°43' S, 32°38' W), Ilha de Pati, Ilha de Madre de Deus (12°43' S, 32°37' W) and Mataripe (RELAM; 12°43' S; 38°34' W). Two other sites (stations 5 and 6), free from the influence of the petroleum industry, were used as reference stations for the bioassays. Station 5 is located near the entrance of the bay, in the channel between the mainland and Itaparica Island. The chemical analysis only considered Madre Deus Island as a transportation area and one control station outside the bay (Barra dos Carvalhos; 13°39' S, 38°57' W).

For the bioassays, the sediment samples were placed in plastic boxes, homogenized and kept under refrigeration for 48 h prior to the toxicity test. After being homogenized in the laboratory, subsamples of 200 g were taken for bulk-sediment static bioassays, conducted for 96 h, using 7–8 day old *Litopenaeus vannamei* PL. The assays were carried out in three replicated 2.5-L plastic jars containing 200 g of surface sediment, covered by 2 L of the laboratory dilution water (filtered seawater, collected from a control station, with salinity of 28 ppt). Previously, sediment samples from all stations were comparatively analyzed for particle-size distribution, measured by wet sieving and pipette analysis (Folk, 1968). No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found among stations. The same sediment from reference station 5 was used as control after being treated in accordance with general procedures recommended by Environment Canada (1995). In order to free it from organic matter, the sediment was washed with distilled water, dried at 105°C and treated with 10 vol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a temperature of 60°C for 3 h, and boiled for 20 min three times in distilled water; decanting was carried out for 1 h and the supernatant discarded at each interval.

Las pruebas basadas en estadios de vida tempranos conducen a parámetros de valoración (*end point*) que poseen una significancia ecológica, ya que reflejan reclutamiento poblacional (McKim, 1985).

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, los objetivos de este trabajo con: (1) evaluar el impacto producido al medio ambiente por las actividades de la industria petrolera local durante 50 años, con base en un método nuevo y complementario método; (2) asociar las respuestas de las postlarvas con la presencia de hidrocarburos en los sedimentos; y (3) acceder a la posibilidad de predecir efectos bénticos usando los sedimentos como fuente de contaminación y larvas de peneidos como organismos indicadores.

## Materiales y métodos

Se recolectaron muestras de sedimento (capa oxigenada, 1 cm de profundidad) durante la bajamar (50 cm por debajo de la línea del agua). Los sedimentos fueron recolectados usando una espátula SS y transportados al laboratorio en contenedores isotérmicos (4°C). Los sedimentos para los análisis químicos fueron bien mezclados y mantenidos en refrigeración antes de las determinaciones. Para el bioensayo se realizaron muestreos a intervalos de tres meses y en seis sitios, mientras que para los análisis químicos las muestras fueron tomadas a intervalos de seis meses, en las estaciones seca y lluviosa. Cuatro de esos sitios fueron áreas de actividad petrolera, incluyendo extracción (estación 4), ruta de transportación (estación 2) y refinera (estación 1), localizadas respectivamente en Ilha das Fontes (12°43' S, 32°38' W), Ilha de Pati, Ilha de Madre de Deus (12°43' S, 32°37' W) y Mataripe (RELAM; 12°43' S, 38°34' W). Dos de los otros sitios (estaciones 5 y 6) se caracterizan por estar libres del impacto de la industria petrolera y fueron utilizadas como estaciones de referencia para los bioensayos. La estación 5 estuvo localizada cerca del canal de entrada de la bahía, en el canal entre tierra firme y la Isla de Itaparica. Para el análisis químico sólo se consideró la Isla de Madre Deus como área de transporte y una estación control fuera de la bahía (Barra dos Carvalhos; 13°39' S, 38°57' W).

Para los bioensayos las muestras de sedimento fueron colocadas en bolsas plásticas, homogeneizadas y mantenidas en refrigeración por 48 h antes de la iniciación de la prueba de toxicidad. Se utilizaron submuestras de 200 g de sedimento y el bioensayo fue conducido durante 96 h usando postlarvas de *Litopenaeus vannamei* de 7–8 días. El ensayo fue llevado a cabo en tres réplicas usando contenedores plásticos de 2.5 L, con 200 g de sedimento y cubiertos con 2 L de agua de mar filtrada, recolectada de la estación control y con una salinidad de 28 ppm. Previamente, las muestras de sedimento de todas las estaciones fueron analizadas comparativamente con relación a la distribución del tamaño de sus partículas medido mediante una tamiz húmedo y pipeta de análisis (Folk, 1968), no encontrándose diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las estaciones. El mismo sedimento de la estación 5 de referencia fue usado como control después de ser tratado de acuerdo a los

The bulk-sediment toxicity was assessed using survival and dry weight gain by shrimp PL, obtained from a commercial cultivation farm (Maricultura da Bahia S/A). All the PL were the same age (7–8 days old) and, in order to minimize genetic interference of different strains in the test results, they were taken from a pool ( $n = 6$ ) of females. One sample of 50 PL was randomly taken for dry weight determination on the first day of the test. The remaining PL were randomly distributed in replicated jars at a density of 15 per vial. Penaeid PL exposed in jars were fed twice daily (in the morning and afternoon) on 60 recently hatched *Artemia salina* nauplii.

Physico-chemical parameters such as salinity, T°C, pH, dissolved oxygen (DO) and ammonia were monitored at the beginning, two days later and at the end of the test period. The PL were maintained throughout the entire test period in seawater of 28 ppt, at  $27 + 2^\circ\text{C}$ , under oxygen saturation. The DO never dropped below  $6.2 \text{ mg L}^{-1}$  and the pH was  $8.1 + 0.4$ . The unionized ammonia (minimum of 0.017 to a maximum of  $0.193 \text{ mg L}^{-1}$ ) values were considered normal for this type of sediment.

Tests were terminated by sieving the contents from each jar through a  $500 \mu\text{m}$  mesh net and counting the live and dead organisms. Missing animals were considered dead. The live organisms were then washed in distilled water and dried for dry weight determination. For correction, the mortality results were expressed as a percentage of net risk calculated by Abbott's formula (Finney, 1971), based on the control sediment effects. The data were checked for normality, arc-sin transformed and analyzed by ANOVA, followed by multiple comparison tests (SNK).

Replicate test results were comparatively analyzed within each sampling period but they varied considerably. The linear transformation formula  $X' = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$  employed by Gower (1971) to standardize the characters used in his general similarity coefficient was used to reduce these variations. The results calculated according to the above formula ranged from 0.0 for minimum response to 1.0 for maximum response. Values for the same sampling station were then reduced to a single mean value that was classified on a qualitative scale of relative toxicity:  $0.00-0.15 =$  relatively non-impacted,  $>0.15-0.30 =$  minimum impact,  $>0.30-0.60 =$  medium impact and  $>0.60-1.00 =$  maximum impact. The dry weight data were treated the same way; however, the relative scale of toxicity was inverted, since a higher gain in dry weight should correspond to better environmental conditions.

Total carbon analysis in sediment samples was determined using a Carlo Erba NA-1500 Elemental Analyzer, following the methodology described by Verardo *et al.* (1990).

Aliphatic and aromatic hydrocarbon analysis was carried out using a technique described by Readman *et al.* (2002). Briefly, the sediments were freeze-dried and dry/wet ratios were determined. Each sediment sample (10–20 g) was spiked with internal standard: C18-1 (for the aliphatic hydrocarbon fraction) and 9,10-dihydroanthracene (for the aromatic hydrocarbon fraction). The samples were Soxhlet extracted for 16 h

procedimientos generales recomendados por Environment Canada (1995). Para obtener el sedimento libre de materia orgánica, éste se lavó con agua destilada, secándose a  $105^\circ\text{C}$  y tratándose con 10 vol  $\text{H}_2\text{O}_2$  a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  por 3 h, hirviéndose durante 20 min tres veces en agua destilada, el decantado se realizó durante 1 h, descartando el sobrenadante en cada intervalo.

La toxicidad del sedimento fue evaluada con base en la supervivencia y el incremento en peso seco de las postlarvas de camarón (PL) obtenidas de una empresa comercial (Maricultura da Bahia S/A). Todas las PL fueron de la misma edad (7–8 días) y, para minimizar la interferencia genética debido al uso de diferentes estirpes en los resultados de la prueba, las PL provinieron de un *pool* ( $n = 6$ ) de hembras. Para las determinaciones del peso al inicio de la prueba se tomó al azar una muestra de 50 PL. Las demás postlarvas fueron distribuidas al azar en los contenedores replicados a una densidad de 15 larvas por contenedor. Las PL de peneidos expuestas en los contenedores fueron alimentadas dos veces al día (mañana y tarde) con 60 nauplios de *Artemia salina*.

Los parámetros fisicoquímicos como la salinidad, temperatura, pH, oxígeno disuelto (DO) y amonio fueron monitoreados al comienzo, a los dos días y al final de la prueba. Las PL fueron mantenidas a 28 ppm,  $27 + 2^\circ\text{C}$  y bajo saturación de oxígeno. El DO nunca bajó de  $6.2 \text{ mg L}^{-1}$  y el pH fue  $8.1 + 0.4$ . Los valores de amonio ( $0.017$  a  $0.193 \text{ mg L}^{-1}$ ) fueron considerados normales para el tipo de sedimento.

La evaluación de la prueba se desarrolló contando el contenido de organismos vivos y muertos en una malla de  $500 \mu\text{m}$ . Las postlarvas ausentes fueron consideradas como muertas. Los organismos vivos fueron lavados con agua destilada y secados para las determinaciones de peso. Los resultados de mortalidad fueron expresados como un porcentaje del riesgo neto calculado por la fórmula de Abbott (Finney, 1971), basada en los efectos del sedimento control. Se verificó la normalidad de los datos, siendo transformados en arco seno y analizados mediante un ANOVA seguido por una prueba de comparaciones múltiple.

Los resultados de la prueba fueron analizados comparativamente entre cada periodo de muestreo y variaron considerablemente. Para reducir la variación se utilizó la fórmula de transformación  $X' = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$  empleada por Gower (1971). Los resultados, de acuerdo a la fórmula, variaron de 0.0 para una respuesta mínima y 1.0 para una respuesta máxima. Los valores de una misma estación de muestreo fueron reducidos a una sola media, la cual fue clasificada a una escala cualitativa de toxicidad relativa:  $0.00$  a  $0.15 =$  no impactada;  $>0.15-0.30 =$  impacto mínimo;  $>0.30-0.60 =$  impacto medio y  $>0.60-1.00 =$  impacto máximo. Los datos de peso seco fueron tratados de la misma manera; sin embargo, la escala relativa de toxicidad fue invertida, ya que a mayor ganancia de biomasa seca deberían corresponder mejores condiciones ambientales.

El carbón total (TOC) en las muestras de sedimento fue determinado usando un analizador elemental Carlo Erba NA-

into hexano/dichloromethane (250 mL). The extract was then concentrated down to a few milliliters using rotary evaporation followed by a gentle nitrogen “blow down”. Sulfur was removed by shaking the extracts with copper turnings until the metal surface remained shiny. Extractable organic matter was determined gravimetrically.

Clean-up and fractionation was performed by passing the extract through a silica/alumina column (silica and alumina were activated at 200°C for 4 h and then partially deactivated with 5% water). Elution was performed using 25 mL of hexane to yield the first fraction (which contains the aliphatic hydrocarbons); then 30 mL of hexane/dichloromethane (90:10) was combined with 20 mL of hexane/dichloromethane (50:50) to obtain the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

Fractions were then analyzed by gas chromatography using a Hewlett Packard HP5890 series II with a flame ionization detector. The capillary column used was a DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) with fused silica (crosslinked 5%-phenyl/95%-dimethylpolysiloxane, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). The temperature was programmed from 40°C to 60°C at 40°C min<sup>-1</sup>, from 60°C to 300°C at 5°C min<sup>-1</sup> and subsequently maintained at 300°C for 20 min. Injector and detector temperatures were set at 40°C and 300°C, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow of 1.2 mL min<sup>-1</sup>. Confirmation of peak identification was obtained for selected extracts using gas chromatography with mass spectrometric detection (Hewlett-Packard 5889B MS “Engine”). Appropriate blanks and reference material IAEA-357 were analyzed simultaneously with each batch.

## Results and discussion

The mortality rates of shrimp PL shown by the toxicity tests conducted on the bulk sediment are presented in table 1; each value represents one sampling period. There were no significant ( $P > 0.05$ ) differences among stations. The relative comparison made by the SNK test showed a large variation in the mortality rate (%) among stations and periods. In general, the mortality rate varied between 1.77% and 28.19%, considering all the sampling periods; however, it did not show a consistent pattern of relative toxicity between stations. Consequently, for this kind of short-term test, the mortality rate was not considered a suitable end-point to discriminate among stations.

In contrast, the dry weight gain data showed significant differences among stations (table 2) when analyzed jointly. A maximum average value was obtained at station 5 (reference 1) and a minimum at station 1 (RELAM refinery). The values of dry weight gain ranged from 0.17 to 0.58 g, including all the stations and periods (table 2). For stations associated with petroleum transportation (stations 2 and 3), the data did not show significant differences ( $P > 0.05$ ) between themselves. Gower's index applied to the net risk values of dry weight gain (fig. 1) clearly showed that this end-point can discriminate areas with different degrees of impact.

1500, siguiendo la metodología descrita por Verardo *et al.* (1990).

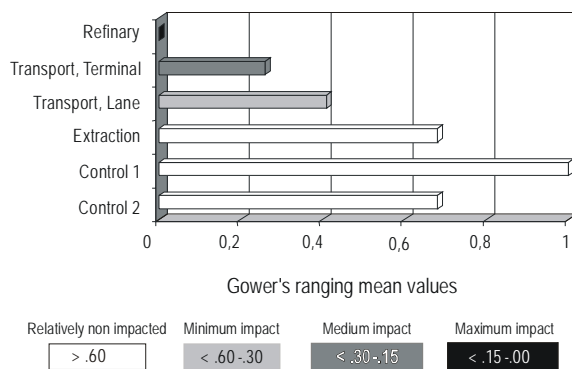
El análisis de hidrocarburos alifáticos y aromáticos fue llevado a cabo usando la técnica descrita por Readman *et al.* (2002). Los sedimentos fueron congelados en seco y se les determinó la tasa seco/húmedo. Cada muestra de sedimento (10–20 g) fue dosificada con estándar interno: C18-1 (para la fracción de hidrocarburo alifático) y 9,10-dihidroantraceno (para la fracción de hidrocarburo aromático). Las muestras fueron extraídas con un Soxhlet por 16 h en hexano/diclorometano (250 mL). El extracto fue, entonces, concentrado a pocos milímetros usando un rotaevaporador y usando nitrógeno. El sulfuro fue retirado agitando el extracto con cobre hasta que el metal se tornó y permaneció brillante. La materia orgánica extraíble fue determinada gravimétricamente.

La limpieza y el fraccionamiento fueron realizados pasando el extracto a través de una columna de silica/aluminio (silica y aluminio fueron activados a 200°C por 4 h y parcialmente desactivados con 5% de agua). La extracción fue realizada usando 25 mL de hexano para producir la primera fracción (la cual contuvo los hidrocarburos alifáticos), luego 30 mL de hexano/diclorometano (90:10) se combinaron con 20 mL de hexano/diclorometano (50:50) para obtener los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

Las fracciones fueron analizadas por cromatografía de gas usando un cromatógrafo Hewlett Packard serie II HP5890 con un detector de llama (FID). Se utilizó una columna de capilaridad DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) con sílica fundida. La temperatura fue programada de 40°C a 60°C a razón de 40°C min<sup>-1</sup>, de 60°C a 300°C a razón de 5°C min<sup>-1</sup> y subsecuentemente mantenida a 300°C por 20 min. El inyector y el detector de temperatura fueron fijados a 40°C y 300°C, respectivamente. Se utilizó helio como gas transportador a un flujo de 1.2 mL min<sup>-1</sup>. La confirmación de los picos fue obtenida seleccionando los extractos por cromatografía de gas e identificándolos por espectrofotometría de masas (Hewlett-Packard 5889B MS “Engine”). Se analizaron blancos apropiados y el material de referencia IAEA-357 simultáneamente con cada determinación.

## Resultados y discusión

Las tasa de mortalidad de las PL del camarón en la prueba de toxicidad llevada a cabo con los sedimentos se presentan en la tabla 1: cada valor representa un periodo de muestreo. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre estaciones. La comparación relativa realizada por la prueba SNK mostró una gran variación en la tasa de mortalidad (%) entre estaciones y periodos. En general la tasa de mortalidad varió entre 1.77% y 28.19%, considerando todos los periodos de muestreo. Sin embargo, no se observó un patrón consistente de la tasa de toxicidad relativa entre estaciones, por lo que no se consideró la mortalidad como un factor adecuado de evaluación (*end point*) para discriminar entre estaciones.



**Figure 1.** Mean values of Gower's index for bulk-sediment toxicity based on dry weight gain by penaeid shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae for different stations in the petroleum industrial area (Todos os Santos Bay, Brazil).

**Figura 1.** Valores del índice de Gower para la toxicidad del sedimento con base en la ganancia de peso seco de las postlarvas de camarón peneido (*Litopenaeus vannamei*) para las diferentes estaciones del área industrial petrolera de Bahía Todos os Santos (Brasil).

In many pollution studies, benthic communities have been shown to be affected along well-established contamination gradients (Pearson and Rosenberg, 1978; Carr *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 1998); however, this kind of survey is expensive and time-consuming, and thus unlikely to be possible for the majority of routine programs (Gray *et al.*, 1988). An ecotoxicity test using bulk sediment as substrate, a sensitive species and one relevant end-point would be expected to provide more useful information (ASTM, 1993, 1994) to distinguish impacted from non-impacted areas, but it is especially difficult to detect the effects of pollutant contamination when the level of sediment contamination is low as determined for the sediments used in this bioassay. This explains why the mortality rate, taken as an end-point, failed to show differences among the studied sites. Nevertheless, a gain in dry weight (a sublethal effect), even whilst not showing significant variations among stations during some of the considered periods, was able, when all the data were analyzed together, to discriminate impacted stations (1, 2 and 3) from control stations. This result shows that the test is a good procedure for assessing sediment quality.

The results found using Gower's coefficient (fig. 1) showed that station 1, where the Landulfo Alves refinery is located, suffered maximum impact in relation to reference station 1. Station 2 (transport terminal) was considered to suffer medium impact, while station 3 (transport lane) was considered to suffer minimum impact on the same relative scale. Sediment from station 4 (extraction) did not show detrimental effects to *L. vannamei* PL.

This qualitative scale, based on the means of ranged values, has an important limitation. When significant differences exist among stations, the most impacted ones will consistently yield high values (near 1.0), while the least impacted stations will yield low values (near 0.0) regardless of the absolute degree of

En contraste, los datos de ganancia en peso seco mostraron diferencias significativas entre estaciones (tabla 2). La estación 5 (referencia 1) mostró un promedio máximo y la estación 1 (RELAM-Refinería) un mínimo. Los valores de la ganancia en peso seco fueron de 0.17 a 0.85 g, incluyendo todas las estaciones y periodos (tabla 2). No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las estaciones relacionadas con el transporte de petróleo (estaciones 2 y 3). El índice de Gower aplicado al valor neto de riesgo de la ganancia en pesos secos (fig. 1) mostró claramente que este factor de evaluación puede discriminar entre áreas con diferentes grados de impacto.

En muchos estudios de contaminación, las comunidades benthicas se muestran afectadas a lo largo de gradientes de contaminación bien establecidos (Pearson y Rosenberg, 1978; Carr *et al.*, 1996; Nascimento *et al.*, 1998). Sin embargo, este tipo de estudios es muy caro y consume tiempo, por lo que es poco factible utilizarlos en programas de rutina (Gray *et al.*, 1988). Es de esperar que una prueba usando sedimento como sustrato, una especie sensible y un factor de evaluación relevante provea información más útil (ASTM, 1993, 1994) para distinguir entre áreas impactadas y no impactadas. No obstante, es especialmente difícil detectar los efectos de contaminantes cuando los niveles de contaminación en los sedimentos son bajos, como ha sido determinado en el presente bioensayo. Esto explica porque la tasa de mortalidad, tomada como un factor de valorización, no es efectiva para mostrar diferencias entre los sitios estudiados. Sin embargo, la ganancia en peso seco (un efecto subletal), aún cuando no mostró diferencias significativas entre estaciones durante alguno de los periodos considerados, fue capaz de discriminar las estaciones impactadas (1, 2 y 3) de las estaciones control, cuando todos los datos se analizaron juntos. Este resultado muestra que esta prueba es un buen procedimiento para estimar la calidad del sedimento.

Los resultados usando el coeficiente de Gower (fig. 1) mostraron que la estación 1 (donde se localiza la refinería Landulfo Alves) sufrió el mayor impacto con relación a la estación de referencia 1. La estación 2 (terminal de transporte) fue considerada como medianamente impactada, mientras que la estación 3 (ruta de transporte) se consideró con un impacto menor en la misma escala relativa. El sedimento de la estación 4 (donde se realizan actividades de extracción) no mostró efectos negativos en las PL de *L. vannamei*.

Esta escala de calidad, basada en promedios de valores ordenados en rangos, posee una limitación importante. Cuando existen diferencias significativas entre estaciones, las más impactadas podrían generar consistentemente valores altos (cerca de 1.0), mientras que las estaciones menos impactadas podrían generar valores bajos (cerca de 0.0). La escala es, entonces, relativa en un estudio específico. El intervalo de valores es consistente con los valores de riesgo originales, pero no son apropiados para las comparaciones paramétricas (ANOVAS).

Un análisis no paramétrico basado en rangos (prueba de Friedman) proporciona la significancia de las diferencias entre medias y la diferenciación jerárquica obtenida por el

**Table 1.** Mean mortality ( $\bar{X} \pm SD$ ) data of *Litopenaeus vannamei* postlarvae in four three-month sampling periods after exposure to sediment from different sampling stations in the Petrobras area (station 1, refinery; station 2, transport terminal; station 3, transport lane; station 4, extraction) and reference areas (stations 5 and 6) in Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. Values united by a dashed line are not significantly ( $P > 0.05$ ) different.

**Tabla 1.** Promedio del porcentaje de mortalidad ( $\bar{X} \pm DE$ ) de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en los diferentes muestreos tres meses (1 al 4) después de la exposición al sedimento de las estaciones en el área de Petrobras (estación 1, refinería; estación 2, terminal de transporte; estación 3, ruta de transporte; estación 4, zona de extracción) y áreas de referencia en la Bahía de Todos os Santos, Bahía, Brasil. Los valores unidos por una línea no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ).

Sampling period	Mean percent mortality data per station						
	Station	6	1	5	2	4	3
1	Mortality rate (%)	11.28 ± 9.59	11.66 ± 7.25	13.47 ± 0.0	15.79 ± 12.60	23.81 ± 11.37	28.19 ± 11.37
/-----/							
2	Mortality rate (%)	05.58 ± 4.35	8.19 ± 4.39	15.70 ± 10.84	17.40 ± 16.63	18.01 ± 0.0	18.01 ± 0.0
/-----/							
3	Mortality rate (%)	1.77 ± 1.29	2.53 ± 2.47	14.55 ± 14.22	16.98 ± 10.47	17.91 ± 7.40	22.11 ± 2.70
/-----/							
4	Mortality rate (%)	1.77 ± 0.0	3.78 ± 3.76	5.18 ± 3.16	8.03 ± 3.70	10.41 ± 5.23	11.22 ± 9.62
/-----/							

**Table 2.** Mean data ( $\bar{X} \pm SD$ ) of dry weight gain by *Litopenaeus vannamei* postlarvae in four different three-month sampling periods after exposure to sediment from different sampling stations in the Petrobras area (station 1, refinery; station 2, transport terminal; station 3, transport lane; station 4, extraction) and reference areas (stations 5 and 6) in Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. Values united by a dashed line are not significantly ( $P > 0.05$ ) different.

**Tabla 2.** Promedio de la ganancia en peso seco ( $\bar{X} \pm DE$ ) de las postlarvas de *Litopenaeus vannamei* en los diferentes muestreos tres meses (1 al 4) después de la exposición al sedimento de las estaciones en el área de Petrobras (estación 1, refinería; estación 2, terminal de transporte; estación 3, ruta de transporte; estación 4, zona de extracción) y áreas de referencia en la Bahía de Todos os Santos, Bahía, Brasil. Los valores unidos por una línea no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ).

Sampling period	Mean data per station						
	Station	1	2	4	3	6	5
1	Dry weight gain (mg)	0.17 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.06	0.57 ± 0.04	0.58 ± 0.04
/-----/							
2	Dry weight gain (mg)	0.22 ± 0.24	0.29 ± 0.08	0.33 ± 0.10	0.35 ± 0.09	0.37 ± 0.23	0.39 ± 0.21
/-----/							
3	Dry weight gain (mg)	0.27 ± 0.09	0.30 ± 0.08	0.31 ± 0.05	0.40 ± 0.03	0.42 ± 0.06	0.44 ± 0.02
/-----/							
4	Dry weight gain (mg)	0.25 ± 0.07	0.25 ± 0.05	0.29 ± 0.09	0.30 ± 0.13	0.33 ± 0.05	0.43 ± 0.06
/-----/							

impact. The scale is, therefore, relative to the specific study. The ranged values are more consistent than the original net risk values, but are inappropriate for parametric ANOVA comparisons.

A non-parametric analysis based on ranks (Friedman's test) provided the significance of the differences between means and proved the ranking obtained by Gower's coefficient. Apart from the non-toxic site (extraction area at station 4), these results were confirmed by other toxicity tests (Nascimento *et al.*, 2000a), using other species as bioindicators and other materials as substrates, such as pore water and transient surface water, from the same sampling stations. The integration of the data from toxicological assays (Nascimento *et al.*, 2000a) using acute mortality of brine shrimp nauplii, and chronic abnormalities of sea-urchin and mangrove oyster larvae permitted a single multispecies ordination of the study sites. Tests with the sediment pore water revealed maximum impact (toxicity) at stations 1 (refinery) and 4 (extraction). Stations 2 and 3 (transport terminal and transport lane) revealed medium impact, and station 5 (reference 1) minimum impact when compared with reference station 6 (control station 2) on a qualitative scale (Nascimento, 1996; Nascimento *et al.*, 1998). These results were also confirmed by other biological studies, based on benthic community responses (Peso-Aguiar and Almeida, 1996).

The sediments in the study sites were mostly muddy or sandy mud. Total organic carbon varied from 0.3% to 5.2%. The highest value was found at the control site. Twenty-seven individual aliphatic hydrocarbons ( $n\text{-C}_{12}$  to  $\text{C}_{36}$ ) and twenty-four PAHs were analyzed (tables 3, 4).

For the dry season, the total aliphatic concentration values were  $37.0 \text{ mg g}^{-1}$  (dry wt) at the reference site,  $33.4 \text{ mg g}^{-1}$  (dry wt) at Madre de Deus (transport lane),  $43.8 \text{ mg g}^{-1}$  (dry wt) at RLAM (refinery site) and  $184.6 \text{ mg g}^{-1}$  (dry wt) at Ilha das Fontes (oil extraction site). For the rainy season, the concentration values of total aliphatics were 43.0, 58.9, 91.5 and  $399.6 \text{ mg g}^{-1}$  (dry wt), respectively, for the reference site (lowest value in terms of organic carbon), Madre de Deus, Ilha das Fontes and RLAM (refinery). These levels indicate comparatively little contamination. Organic-rich marine sediments may contain up to  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  of "total" aliphatic hydrocarbons, but concentrations higher than these are usually associated with petroleum inputs (Volkman *et al.*, 1992; Bouloubassi and Saliot, 1993). Compared with other regions of the world (Readman *et al.*, 2002), the lower levels are comparable to those encountered in places where hydrocarbon contamination was considered relatively low, whereas the higher levels are comparable to those reported for locations known to be chronically contaminated by oil, for example, Odessa, in the Black Sea ( $110\text{--}310 \mu\text{g g}^{-1}$  dry wt), Hong Kong ( $60\text{--}646 \mu\text{g g}^{-1}$  dry wt) and the New York Bight ( $35\text{--}2900 \mu\text{g g}^{-1}$  dry wt).

In general, the presence of an unresolved complex mixture (UCM) in aliphatic hydrocarbon chromatograms is considered to be associated with degraded or weathered petroleum

coeficiente de Gower. Aparte del sitio no tóxico (área de extracción en la estación 4), los resultados fueron confirmados mediante otras pruebas de toxicidad (Nascimento *et al.*, 2000a), usando otras especies como bioindicadores y otros materiales como substratos tales como el agua intersticial y superficial de los sedimentos en las mismas estaciones muestreadas. La integración de los datos de los ensayos toxicológicos (Nascimento *et al.*, 2000a), usando mortalidad aguda de nauplios de camarones marinos, y anomalías crónicas de larvas de erizos y ostra de mangle, permitió una ordenación simple multispecífica de los sitios de estudio. Pruebas con el agua intersticial del sedimento revelaron un impacto máximo (toxicidad) en las estaciones 1 (refinería) y 4 (extracción). La estación 2 y 3 (terminal y ruta de transporte) revelaron un impacto medio y la estación 5 (referencia 1) impacto mínimo, cuando se compararon con la estación 6 (estación 2 de control) en una escala cualitativa (Nascimento, 1996; Nascimento *et al.*, 1998). Estos resultados fueron también confirmados por otros estudios biológicos basados en respuestas de comunidades bénticas (Peso-Aguiar y Almeida, 1996).

Los sedimentos utilizados fueron en su mayoría limoso o arenoso-limoso. El carbón orgánico total (TOC) varió de 0.3% a 5.2%. El valor alto más fue encontrado en el sitio de control. Se analizaron 27 hidrocarburos alifáticos individuales ( $n\text{-C}_{12}$  a  $\text{C}_{36}$ ) y 24 PAHs (tablas 3, 4).

Durante la estación seca, el total de los hidrocarburos alifáticos fue  $37.0 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco) en el sitio de referencia,  $33.4 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco) para Madre de Deus (ruta de transporte),  $43.8 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco) para RELAM (sitio de refinación) y  $184.6 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco) para Ilha das Fontes (sitio de extracción). Durante la estación lluviosa las concentraciones de alifáticos fueron de 43.0, 58.9, 91.5 y  $399.6 \text{ mg g}^{-1}$  (peso seco), respectivamente, para el sitio de referencia (el valor más bajo en términos de carbón orgánico), Madre de Deus, Ilha das Fontes y RELAM (refinería). Estos niveles muestran poca contaminación. Los sedimentos marinos ricos en materia orgánica pueden contener hasta  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  de hidrocarburos alifáticos totales, pero concentraciones mayores se asocian con actividades petroleras (Volkman *et al.*, 1992; Bouloubassi y Saliot, 1993). Los niveles bajos de hidrocarburos encontrados en los sedimentos, comparados con los de otras regiones del mundo (Readman *et al.*, 2002), son similares a regiones caracterizadas por bajos niveles de contaminación, mientras que los niveles altos registrados son, sin embargo, comparables con los reportados en localidades contaminadas crónicamente por petróleo; por ejemplo, Odessa, en el Mar Negro ( $110\text{--}310 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco), Hong Kong ( $60\text{--}646 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco), y la Bahía de Nueva York ( $35\text{--}2900 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco).

En general, la presencia de una mezcla compleja no resuelta (UCM) en el cromatograma de los hidrocarburos alifáticos se considera asociada con residuos de petróleo degradados o intemperizados (Farrington y Tripp, 1977; Le Dréau *et al.*, 1997). Tasas de no resueltos y resueltos (U/R)  $>4$  confirman la presencia de residuos de petróleo ampliamente esparcidos (Mazurek y Simoneit, 1984; Lipiatou y Saliot,



**Table 3.** Concentrations of aliphatic hydrocarbons ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) and total organic carbon (%) in sediments from oil industry areas and control sites during the dry and rainy seasons. ND = below detection limit.

**Tabla 3.** Concentraciones de hidrocarburos alifáticos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  peso seco) y carbono orgánico total (%) en sedimentos del área industrial petrolera y sitios control durante las estaciones seca y lluviosa. ND = por debajo del límite de detección.

Aliphatic hydrocarbon ( $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight)	Dry season				Rainy season			
	Refinery	Transport	Extraction	Control	Refinery	Transport	Extraction	Control
C12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C13	ND	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	0.01
C14	0.01	ND	0.05	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
C15	0.08	0.04	1.72	0.20	0.09	0.03	0.03	0.08
C16	0.03	0.04	0.24	0.07	0.03	0.01	0.01	0.02
C17	0.32	0.23	0.95	3.01	0.15	0.16	0.11	0.23
Pristane	0.05	0.01	0.19	0.15	0.09	0.02	0.01	0.62
C18	0.08	0.03	0.13	0.09	0.30	0.02	0.04	0.03
Phytane	0.05	0.02	0.07	0.03	0.17	0.03	0.03	0.03
C19	0.09	0.01	0.15	0.11	0.21	0.02	0.04	0.14
C20	0.07	0.01	0.09	0.03	0.13	0.02	0.06	0.06
C21	0.08	0.01	0.19	0.29	0.14	0.04	0.07	0.38
C22	0.09	0.01	0.15	0.08	0.20	0.04	0.08	0.12
C23	0.09	0.02	0.27	0.29	0.30	0.05	0.14	0.45
C24	0.09	0.02	0.18	0.19	0.24	0.04	0.06	0.19
C25	0.11	0.05	0.65	0.81	0.50	0.12	0.28	1.11
C26	0.08	0.03	0.35	0.37	0.23	0.09	0.15	0.51
C27	0.10	0.11	0.91	1.77	0.44	0.18	0.36	2.51
C28	0.07	0.05	0.46	0.81	0.19	0.10	0.21	1.18
C29	0.15	0.28	2.20	4.11	0.81	0.53	0.78	5.91
C30	0.07	0.04	0.41	0.80	0.21	0.16	0.15	1.18
C31	0.09	0.14	1.23	2.27	0.54	0.30	0.50	3.29
C32	0.04	0.03	0.21	0.24	0.87	0.07	0.10	0.35
C33	0.05	0.07	0.60	0.54	0.17	0.15	0.24	0.55
C34	0.03	0.02	0.21	0.05	0.21	0.04	0.06	0.11
C35	0.03	0.02	0.20	0.12	0.10	0.09	0.09	0.16
C36	0.02	ND	0.04	0.05	ND	0.07	0.04	0.07
Sum <i>n</i> -C14-35	1.9	1.3	11.5	16.3	6.1	2.3	3.5	18.6
Total aliphatic	43.8	33.4	184.6	37.0	399.6	58.9	91.5	43.0
UCM	40.8	31.5	155.7	14.2	385.6	55.9	84.9	22.7
Resolved aliphatics	3.1	1.9	28.9	22.8	14.1	3.0	6.6	20.3
% UCM	93.0	94.3	84.3	38.4	96.5	94.9	92.8	52.7
Unresolved/resolved	13.3	16.6	5.4	0.6	27.4	18.7	12.9	1.1
Odd/even	1.8	3.7	3.6	4.9	1.3	2.5	2.8	3.9
Pristane/phytane	1.2	0.7	2.5	5.2	0.5	0.7	0.5	22.5
Total organic carbon (%)	0.3	0.3	1.23	3.60	0.4	0.4	0.7	5.2

**Table 4.** Concentrations of aromatic hydrocarbons (ng g<sup>-1</sup> dry weight) and total hydrocarbons (µg g<sup>-1</sup> dry weight) in sediment from oil industry areas and control sites during the dry and rainy seasons. ND = below detection limit.**Tabla 4.** Concentraciones de hidrocarburos aromáticos (ng g<sup>-1</sup> peso seco) e hidrocarburos totales (µg g<sup>-1</sup> peso seco) en sedimentos del área industrial petrolera y sitios control durante las estaciones seca y lluviosa. ND = por debajo del límite de detección.

Aromatic hydrocarbon (ng g <sup>-1</sup> dry weight)	Dry season				Rainy season			
	Refinery	Transport	Extraction	Control	Refinery	Transport	Extraction	Control
Naphthalene	4.3	ND	6.3	5.8	ND	ND	ND	ND
2-Methyl naphthalene	ND	ND	2.4	8.4	ND	ND	ND	ND
1-Methyl naphthalene	ND	ND	2.7	ND	ND	ND	ND	ND
Biphenyl	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2,6-Dimethyl naphthalene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaphthylene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acenaphthene	ND	ND	ND	ND	5.1	ND	ND	ND
2,3,5-Trimethyl naphthalene	ND	ND	ND	ND	1.0	ND	ND	ND
Fluorene	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phenanthrene	14.0	21.7	21.7	ND	13.8	18.7	4.0	2.1
Anthracene	13.0	12.9	11.4	ND	ND	ND	ND	ND
1-Methyl phenanthrene	ND	2.9	4.0	ND	6.3	2.2	ND	ND
Fluoranthene	73.5	64.2	84.0	ND	7.5	40.8	8.8	14.7
Pyrene	8.6	58.3	84.7	ND	43.9	41.0	8.1	11.1
Benzo(a)anthracene	ND	6.4	27.9	2.8	ND	ND	ND	ND
Chrysene	23.5	36.9	49.4	8.5	6.3	24.2	ND	ND
Benzo(b)fluoranthene	70.6	73.0	115.0	9.0	33.7	49.4	19.0	15.7
Benzo(k)fluoranthene	30.9	27.7	36.5	ND	9.2	17.4	7.2	7.5
Benzo(e)pyrene	34.9	43.4	84.5	3.3	44.4	27.3	12.8	6.2
Benzo(a)pyrene	44.5	41.6	51.5	ND	9.1	27.6	8.0	6.5
Perylene	21.4	10.2	29.8	ND	5.7	6.2	1.4	6.0
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	45.7	36.7	60.2	ND	15.3	22.1	7.6	4.6
Dibenzo(a,h)anthracene	6.5	18.1	12.7	2.9	24.5	5.3	4.7	1.8
Benzo(g,h,i)perylene	48.7	40.6	92.0	3.6	84.7	27.5	14.5	6.7
Sum PAHs (24 compounds)	440.2	494.5	776.6	44.3	310.5	309.7	96.1	83.1
Total aromatic	46,356	6,110	66,575	389	59,054	9,003	14,000	5,373
UCM	33,873	4,518	63,719	240	55,167	7,528	13,482	3,248
Resolved aromatics	12,483	1,592	2,856	149	3,887	1,476	518	2,125
% UCM	73.1	73.9	95.7	61.8	93.4	83.6	96.3	60.5
Unresolved/resolved	2.7	2.8	22.3	1.6	14.2	5.1	26.0	1.5
Total hydrocarbon (µg g <sup>-1</sup> )	70.2	39.5	251.1	37.3	458.7	67.9	105.5	48.4

residues (Farrington and Tripp, 1977; Le Dréau *et al.*, 1997). Ratios of unresolved to resolved (U/R) >4 confirm the widespread presence of important petroleum-related residues (Mazurek and Simoneit, 1984; Lipiatou and Saliot, 1991). In the oil related sites, the UCM was by far the major component of the "total" sedimentary aliphatic hydrocarbons. UCM concentrations varied from 32 to 386 µg g<sup>-1</sup> dry wt, which

1991). En los sitios relacionados con el petróleo, la UCM fue el mayor componente de los hidrocarburos alifáticos totales, variando de 32 a 386 µg g<sup>-1</sup> peso seco, lo cual supone del 84–97% del total de los hidrocarburos alifáticos (tabla 3). Las tasas de U/R van de 5.4 a 27 (tabla 3), lo que indica contribuciones crónicas de petróleo a esos sedimentos, particularmente en el área de refinación. Por otra parte, en el sitio de control las

accounted for 84–97% of the “total” aliphatic hydrocarbons (table 3). The U/R ratio ranged from 5.4 to 27 (table 3), indicating chronic petroleum contributions to these sediments, particularly for the refinery site. On the other hand, at the control site, UCM concentrations were 14 and 23  $\mu\text{g g}^{-1}$  (dry wt), accounting for 38% and 53% of the “total” aliphatic hydrocarbons (dry and rainy seasons, respectively) (table 3). The U/R ratio was about 1, indicating low chronic petroleum contributions to these sediments.

Pristane (C<sub>19</sub>) and phytane (C<sub>20</sub>) are common isoprenoids detected in coastal marine sediments. They are often considered good indicators of petroleum contamination. As a rule, a high ratio of pristane to phytane or the predominance of a single isoprenoid (such as pristane) indicate a biogenic source (UNEP/IOC/IAEA, 1992). The pristane to phytane ratios in the sediments were =1 in most of the oil related sites (except for the extraction during the dry season), reflecting contamination originated from petroleum. The highest pristane to phytane ratios (>2.0) were recorded at the reference site, reflecting biogenic origins.

Concentrations of “total” PAHs (the sum of 24 parental and alkylated compounds) in sediments of the oil related sites ranged from 440 to 777  $\text{ng g}^{-1}$  (dry wt) and from 96 to 310  $\text{ng g}^{-1}$  (dry wt) for the dry and rainy seasons, respectively (table 4). These concentrations are comparable to moderately polluted locations worldwide (Readman *et al.*, 2002). Conversely, the concentration observed for the reference site (rainy season) was lower than 50  $\text{ng g}^{-1}$  (dry wt), which is a typical concentration for locations distant from extensive anthropogenic activities (Baumard *et al.*, 1998a). The dry season, however, showed a slightly higher value (83  $\text{ng g}^{-1}$  dry wt) (table 4).

Concentrations of aromatic UCM ranged from 4518 to 63719  $\text{ng g}^{-1}$  (dry wt) and from 7528 to 55167  $\text{ng g}^{-1}$  (dry wt) for the dry and rainy seasons, respectively, which accounted for 73–96% of the “total” aromatic hydrocarbons (table 4) and 11–38% of the “total” (aromatic + aliphatic) hydrocarbons. Conversely, values were lower than 3250  $\text{ng g}^{-1}$  (dry wt) for the reference site, accounting for less than 62% of the “total” aromatic hydrocarbons, and 0.6% (dry) and 6.7% (rainy) of the “total” (aromatic + aliphatic) hydrocarbons.

Among several chemical contaminants, the pollution caused by hydrocarbons is of the greatest concern. This is due to the carcinogenicity and therathogenicity of the highest molecular weight compounds and the toxicity of the most soluble compounds (Baumard *et al.*, 1998a, 1998b). The significance of contamination by hydrocarbons has been recognized considering the hydrophobic nature of most of these compounds (Neff, 1979; Hellow *et al.*, 1993; Djomo *et al.*, 1996; Baumard *et al.*, 1999a, 1999b).

Total PAH levels found for the bulk surficial sediment from the Petrobras sampling locations are below the concentrations proposed by MacDonald *et al.* (1996) as able to affect the biota; however, due to their characteristic of being bound to organic substrates, it has been proven that hydrocarbons may

concentraciones de UCM fueron de 14 a 23  $\mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco), las cuales representaron 38% y 53% del total de los hidrocarburos alifáticos, en la estación seca y lluviosa respectivamente (tabla 3). Las tasas U/R estuvieron cerca de 1, indicando bajas contribuciones crónicas de petróleo a esos sedimentos.

El pristano (C<sub>19</sub>) y el fitano (C<sub>20</sub>) son isoprenos comúnmente detectados en sedimentos costeros marinos que son frecuentemente considerados como buenos indicadores de contaminación por petróleo. Por regla general, altas tasas de pristano a fitano o la predominancia de simples isoprenos (tales como pristano) indican una fuente biogénica (UNEP/IOC/IAEA, 1992). Las tasas de pristano a fitano en los sedimentos fue = 1 en la mayoría de los sitios relacionados con el petróleo (excepto en la zona de extracción en la estación seca), reflejando contaminación originada por petróleo. Por otra parte, para el sitio de referencia se estimaron altas tasas de pristano a fitano (>2.0), lo que indica origen biogénico.

La concentración de los PAH totales (la suma de 24 alifáticos y sus derivados) en sedimentos de los sitios relacionados con el petróleo varió de 440 a 777  $\text{ng g}^{-1}$  (peso seco) y de 96 a 310  $\text{ng g}^{-1}$  (peso seco) para las estaciones seca y lluviosa, respectivamente (tabla 4). Estas concentraciones son comparables con localidades moderadamente contaminadas en el mundo (Readman *et al.*, 2002). En contraste, la concentración observada para el sitio de referencia durante la estación lluviosa fue menor a 50  $\text{ng g}^{-1}$  (peso seco), lo cual es típico de localidades alejadas de intensas actividades antropogénicas (Baumard *et al.*, 1998a). En la estación seca, sin embargo, los valores fueron ligeramente más altos (83  $\text{ng g}^{-1}$  peso seco) (tabla 4).

Las concentraciones de UCM de aromáticos fue de 4518 a 63719  $\text{ng g}^{-1}$  (peso seco), y de 7528 y 55167  $\text{ng g}^{-1}$  (peso seco) para las estaciones seca y lluviosa, respectivamente, mismas que representaron 73–96% del total de hidrocarburos aromáticos (tabla 4) y de 11–38% del total de hidrocarburos (aromáticos + alifáticos). Por el contrario, los valores menores a 3250  $\text{ng g}^{-1}$  (peso seco) registrados en el sitio de refinería, representaron menos de 62% del total de hidrocarburos aromáticos y 0.6% (seca) y 6.7% (lluviosa) del total de hidrocarburos (aromáticos + alifáticos).

Entre varios contaminantes químicos, la polución causada por hidrocarburos es de gran impacto. Ello se debe a la carcinogenicidad y teratogenicidad de los componentes de alto peso molecular, y a la toxicidad de la mayoría de los compuestos solubles (Baumard *et al.*, 1998a, 1998b). La importancia de la contaminación por hidrocarburos ha sido reconocida considerando el carácter hidrofóbico de la mayoría de sus componentes (Neff, 1979; Hellow *et al.*, 1993; Djomo *et al.*, 1996; Baumard *et al.*, 1999a, 1999b).

Los niveles totales de PAH encontrados en los sedimentos recolectados de las localidades de Petrobras están por debajo de las concentraciones propuestas por MacDonald *et al.* (1996) como capaces de causar efectos en la biota. Sin embargo, debido a la forma en que éstos están unidos a los sustratos orgánicos, se estima que los hidrocarburos pueden causar efectos biológicos adversos aún cuando los criterios de calidad no

cause adverse biological effects even though quality criteria are not exceeded (NRC, 1989). The lower shrimp PL dry weight gain provides evidence of a chronic deleterious effect on shrimp PL, which denotes a physiological alteration. This response indicates that the whole-sediment toxicity test on *L. vannamei* PL is a sensitive tool to discriminate among impacted and non-impacted areas.

In short, the test for determining sediment quality, using bulk sediment as substrate, *L. vannamei* PL as species test and the dry weight gain as an end-point, was able to discriminate between impacted and non-impacted areas at Todos os Santos Bay (Brazil), where the petroleum industry prevails. The test results indicate that the impact of the petroleum industry has a chronic effect, since the weight gain of shrimp PL, taken as an end-point, succeeded in discriminating between impacted and reference stations, even though the chemical concentrations of PAHs did not exceed quality criteria.

### Acknowledgements

This research was financed by Petrobras and by the Brazilian Research Council's (CNPQ) northeast program for research and postgraduate study. All experiments were carried out in accordance with national and institutional guidelines for animal welfare.

### References

ASTM (American Society for Testing and Materials) (1993). Standard guide for designing biological tests with sediments. E 1525-93. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol 11.4, Philadelphia, pp. 1339-1351.

ASTM (American Society for Testing and Materials) (1994). Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods. E 1367-92. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.4, Philadelphia, pp. 1138-1163.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T. and Bellocq, J. (1998a). Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.*, 36(12): 951-960

Baumard, P., Budzinski, H., Mchin, Q., Garrigues, P., Burgeot, T. and Bellocq, J. (1998b). Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 47: 77-90.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X. and Bellocq, J. (1999a). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.*, 47: 415-439.

Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Dizer, H. and Hansen, P.D. (1999b). Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments and mussels (*Mytilus edulis*) from the western Baltic Sea: Occurrence, bioavailability and seasonal variations. *Mar. Environ. Res.*, 47: 17-47.

Bouloubassi, I. and Salot, A. (1993). Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). *Oceanol. Acta*, 16: 145-161.

Cairns, J.J., Niederlehner, B.R. and Smith, E.P. (1992). The emergence of functional attributes as endpoints in ecotoxicology.

se excedan (NRC, 1989). El menor peso seco de las PL de camarón evidencia efectos deletéreos crónicos en larvas de camarones, los cuales se traducen en una alteración fisiológica. Esta respuesta indica que la prueba de toxicidad del sedimento en postlarvas de *L. vannamei* constituye una herramienta sensible para discriminar entre áreas impactadas y no impactadas por contaminación.

En conclusión, la prueba para determinar la calidad de sedimentos usando sedimentos gruesos como sustrato, postlarvas del peneido *Litopenaeus vannamei* como especie de prueba y su ganancia de peso como un factor de evaluación (*end point*), fue capaz de discriminar entre áreas impactadas y no impactadas por la industria petrolera que se desarrolla en la Bahía Todos os Santos, Brasil. Los resultados de la prueba indican que el impacto de la industria petrolera tiene un efecto crónico, ya que la ganancia en peso de las postlarvas de camarones, tomadas como un factor de valorización discrimina entre áreas impactadas o no, aún cuando las concentraciones de PAH no exceden de los criterios de calidad.

### Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el programa de investigación y postgrado del noreste del Consejo Brasileño de Investigación. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con las normas nacionales e institucionales de protección a los animales.

Traducido al español por los autores.

In: G.A. Burton Jr. (ed.), *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis, Boca Raton, Florida, pp. 111-128.

Carr, R., Long, E., Windom, H., Chapman, D., Thursby, G., Sloane, G. and Wolfe D. (1996). Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1218-1231.

Cripe, G. (1994). Comparative acute toxicities of several pesticides and metals to *Mysidopsis babia* and postlarval *Penaeus duorarum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1867-1872.

Da Silva, E.M., Peso-Aguiar, M.C., Navarro, M. de F.T. and Chastinet, C. de B. e A. (1997). Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(1): 112-118.

Djomo, J.E., Garrigues, P., and Narbonne, J.F. (1996). Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Bracydanio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1177-1181.

Environment Canada (1994). Guidance Document on Collection and Preparation of Sediments for Physicochemical Characterisation and Biological Testing. Environmental Protection Series 1/RM/29, 132 pp.

Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision using Control Sediment Spiked with a Reference Toxicant. Environmental Protection Series 1/RM/30, 56 pp.

Farrington, J.W. and Tripp, B.W. (1977). Hydrocarbons in western North Atlantic surface sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 41: 1627-1641.

Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 333 pp.

- Folk, R. (1968). Petrology of Sedimentary Rocks. Hemphill, Austin.
- Gray, J., Aschan, M., Carr, M., Clarke, K., Green, R., Pearson, T., Rosenberg, R. and Warwick, R. (1988). Analysis of community attributes of the benthic macrofauna of Frierfjord/Langesundfjord and in a mesocosm experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46: 151–165.
- Gower, J.C. (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, 27: 857–871.
- Hellow, J., Upshall, C., Payne, J.F., Naidu, S. and Paranjape, M.M. (1993). Total unsaturated compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in molluscs collected from waters around New Foundland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24: 249–257.
- Le Dréau, Y., Jacquot, F., Doumenq, P., Guiliano, M., Bertrand, J.C. and Mille, G. (1997). Hydrocarbon balance of a site which had been highly and chronically contaminated by petroleum wastes of a refinery (from 1956 to 1992). *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 456–468.
- Lipiatou, E. and Saliot, A. (1991). Hydrocarbon contamination of the Rhone delta and western Mediterranean. *Mar. Pollut. Bull.*, 22: 297–3.
- Mazurek, M.A. and Simoneit, B.R.T. (1984). Characterization of biogenic and petroleum-derived organic matter in aerosols over remote rural and urban areas. In: L.H. Keith (ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Air*. Ann Arbor Science, Butterworth, Boston, pp. 353–370.
- MacDonald, D.D., Carr, R.S., Calder, F.D., Long, E.R. and Ingersoll, C.G. (1996). Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology*, 5: 253–278.
- McKim, J.M. (1985). Early life stage toxicity tests. Chapter 3. In: G.M. Rand and S.R. Petrocelli (eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publ. Corp., New York, pp. 58–95.
- Nascimento, I.A. (1996). Relatório do subprojeto “Testes Ecotoxicológicos” do programa de Monitoramento dos Ecossistemas ao norte da Baía de Todos os Santos, Convênio Petrobrás/UFBA, July 1996. Convênio PETROBRAS/UFBA. Contracts 220.2.045.93-5 and 220.2.051.94-8. 80 pp.
- Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Smith, D.H. and Evangelista, A.J.A. (1998). Testes ecotoxicológicos usados para avaliação de impacto ambiental resultante da extração e refino de petróleo na Bahia de Todos os Santos, Bahia, Brasil. *Trab. Oceanogr. Univ. Fed. Pe.*, 26(1): 135–143.
- Nascimento, I.A., Smith, D.H., Pereira, S.A., Sampaio de Araújo, M.M. and Mariani, A.M. (2000a). Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. In: *State of Brazilian Aquatic Ecosystem Health*. J. Aquat. Ecosyst. Health Manage. (Canada), Spec. issue, 3(4): 485–497.
- Nascimento, I.A., Smith, D.H., Gomes, M.G.S., Santos, G.V. and Pereira, S.A. (2000b). Ecotoxicological diagnosis of Aratu Bay, Bahia, Brazil: A new approach to validate a reactive short-term toxicity end-point by comparison with intertidal benthic activity. In: *State of Brazilian Aquatic Ecosystem*. J. Aquat. Ecosyst. Health Manage. (Canada), Spec. issue, 3(4): 449–458.
- Nipper, M.G., Roper, D.S., Williams, E.K., Martin, M.L., Van Dam, L.F. and Mills, G.N. (1998). Sediment toxicity and benthic communities and mildly contaminated mudflats. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(3): 502–510.
- NRC. (1989). *Contaminated Marine Sediments - Assessment and Remediation*. National Research Council. National Academic Press, 493 pp.
- Neff, J.M. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: Sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers Ltd., Essex, England. 262 pp.
- Pearson, T. and Rosenberg, R. (1978). Macrobenthic succession in relation to organic enrichment pollution of the marine environment. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 16: 229–311.
- Peso-Aguiar, M.C. and Almeida, V.G. (1996). Relatório Final do Programa de Monitoramento dos Ecossistemas ao Norte da Baía de Todos os Santos. Convênio PETROBRAS/UFBA. Contracts 220.2.045.93-5 and 220.2.051.94-8. 80 pp.
- Readman, J.W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J.P., Catinni, C. and Mee, L.D. (2002). Hydrocarbon residues in sediments from the Black Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, 44(1): 48–62.
- Riebel, P.N. and Percy, J.A. (1991). Acute toxicity of petroleum hydrocarbons to the Arctic shallow-water mysid, *Mysis oculata* (Fabricius). *Sarsia*, 75: 223–232.
- Roper, D., Thrush, S. and Smith, D.H. (1988). The influence of runoff on intertidal mudflat benthic communities. *Mar. Environ. Res.*, 26: 1–18.
- UNEP/IOC/IAEA. 1992. Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference methods for marine pollution studies. No. 20. UNEP, Monaco, 75 pp.
- Verardo, D.J., Froelich, P.N. and McIntyre, A. (1990). Determination of organic carbon and nitrogen in marine sediments using Carlo Erba NA-1500 Analyser. *Deep-Sea Res.*, 37(1): 157–165.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neill, G.P. and Bavor Jr., H.J. (1992). Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Sci. Total Environ.*, 112: 203–219.