

EFFECTOS LETALES Y SUBLETALES EN JUVENILES DE *ARGOPECTEN NUCLEUS* EXPUESTOS A LODOS DE PERFORACIÓN

Simón Andrés Rodríguez-Satizábal¹, Claudia Castellanos¹, Guillermo Contreras¹, Andrés Franco¹ y Marlon Serrano²

¹ Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Programa de Biología Marina, Carrera 2 No. 11 -68, Edificio Mundo Marino, El Rodadero, Santa Marta, Colombia. simrodr@gmail.com, claudiacastellanos05@yahoo.com, gcontreras777@yahoo.com y andres.franco@utadeo.edu.co

² Ecopetrol S.A.-Instituto Colombiano del Petróleo, Kilómetro 7 Vía a Piedecuesta, Bucaramanga, Colombia. Marlon.Serrano@ecopetrol.com.co

RESUMEN

Las exploraciones costa afuera en Colombia están en su etapa inicial y actualmente existen pocos estudios de toxicidad aguda y crónica con organismos marinos evaluando lodos de perforación. Se evaluó la toxicidad aguda y crónica en juveniles de *Argopecten nucleus* expuestos a lodos de perforación de base agua y base sintética estableciendo la concentración letal media (CL₅₀) a 96 h y efectos sobre la supervivencia y crecimiento (talla y peso) para un periodo de 30 d. En las pruebas agudas, tres muestras de lodos de base agua (E2-LBA, E2-LBA-2 y E3-LBA-2) se encuentran por debajo del valor mínimo establecido por EPA (1993) para poder descargar en el ambiente marino. Teniendo en cuenta el valor de la concentración de efecto no observable (CENO), se ordenaron los lodos evaluados en las pruebas crónicas en orden creciente E3-LBA-2 < E1-LBS-2 < E1-LBA < E3-LBS-2. De acuerdo con la clasificación establecida por GESAMP (2002), todos los lodos, tanto en pruebas agudas como en crónicas, son no tóxicos o con un grado de toxicidad despreciable, respectivamente. Los resultados obtenidos son los primeros para pruebas de toxicidad aguda y crónica en una especie de bivalvo expuesta a lodos de perforación en Colombia.

PALABRAS CLAVES: Costa fuera, Toxicidad crónica, Lodos de perforación, CL₅₀, CENO.

ABSTRACT

Lethal and sublethal effects on juvenile *Argopecten nucleus* exposed to drilling muds. Offshore exploration in Colombia is in its initial stage. Currently, only few studies of acute and chronic toxicity with marine organisms evaluate drilling muds. In this paper, we test acute and chronic toxicity in juvenile organisms of *Argopecten nucleus* exposed to water and synthetic based muds. Aim is establish lethal median concentration (LC₅₀) to 96 h and effects on survival and growth (height and weight) for a 30 d period. In acute tests, three water based muds (E2-LBA, E2-LBA-2 y E3-LBA-2) are below the minimal value established by EPA (1993) to be discharged in the marine environment. Given the value of the non observable effect concentration (NOEC), samples were ordered in increasing order, E3-WBM-2 < E1-SBM-2 < E1-WBM < E3-SBM-2. According to classification established by GESAMP (2002), all

drilling muds evaluated from acute and chronic tests are nontoxic or with negligible toxicity, respectively. This results are the first ones in Colombia using a bivalve specie in acute and chronic toxicity tests exposed to drilling muds.

KEY WORDS: Offshore, Chronic toxicity, Drilling muds, LC₅₀, NOEC.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existe una alta demanda de energía, por ello los procesos de exploración costa afuera que permitan nuevos descubrimientos de petróleo y gas siguen realizándose a gran escala. Como producto de estas actividades se generan desechos; entre ellos se encuentran los domésticos, los sanitarios, aguas de formación y los más abundantes que son los cortes y fluidos de perforación (EPA, 1993). Los lodos de perforación son mezclas de compuestos naturales y sintéticos y entre sus principales funciones están la de enfriar y lubricar la sarta y broca de perforación, limpiar el fondo del pozo llevando los cortes hacia la superficie y controlar las presiones de formación por mencionar algunas de ellas (Fink, 2012). Actualmente se utilizan dos tipos de lodos en las perforaciones costa afuera: los lodos base agua y los no acuosos dentro de los cuales se encuentran los lodos de base aceite y de base sintética (Neff, 2008). En general, los lodos causan una alteración en el medio marino, la cual incluye efectos físicos, químicos y biológicos a largo plazo. Los organismos bentónicos se ven afectados principalmente debido a que durante las operaciones petroleras costa afuera se interviene en el fondo ya sea por la construcción de plataformas o en algunos casos por el vertimiento de cortes o lodos de perforación (Environment Canada, 2001).

Desde finales de la década de los años 70 del siglo pasado se han desarrollado investigaciones a nivel mundial utilizando especies de diferentes categorías taxonómicas y con lodos de diferente tipo así como de algunos de sus componentes principales para evaluar el potencial toxicológico de estos en pruebas de toxicidad agudas o crónicas principalmente para determinar efectos letales y subletales (Neff, 2005). Esto ha permitido establecer límites de descarga así como regulaciones establecidas bajo diferentes componentes entre ellos las pruebas de toxicidad, en cuya elaboración participan entidades internacionales tales como: Organización Marítima Internacional (OMI), Grupo de Expertos sobre Aspectos Científicos de Protección Marino Ambiental (GESAMP), Organización para la Salud Pública Americana (APHA) y Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) entre otros. En el caso de Estados Unidos están establecidos los límites de descarga, las pruebas de toxicidad aguda se llevan a cabo con *Americamysis bahia* y se determina la concentración letal media a 96 horas de la fase particulada suspendida (FSP).

Para pruebas de toxicidad crónica en bivalvos se han utilizado diferentes tipos de sustancias que comprenden metales (cadmio, cobre, mercurio y plomo), sedimentos, aguas de formación y lodos de perforación, entre otros. Las especies utilizadas son de amplia distribución y pertenecen a los géneros *Mytilus*, *Perna*, *Macoma*, *Donax* y *Cerastoderma* principalmente (Cranford *et al.*, 1999; Gregory *et al.*, 1999, 2002; Barlow y Kingston, 2001)

Cuando se utiliza como punto final la supervivencia o la tasa de crecimiento, en términos de la longitud total y el peso, para evaluar el potencial tóxico de sedimentos o metales (*e.g.* cobre), los experimentos pueden variar de 7 a 41 d, se utilizan de 5 a 50 organismos, juveniles con talla de hasta 190 mm. Durante el período de exposición se alimentan con microalgas de diferentes especies (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. entre otras), se utiliza aireación y se realiza con diferentes recipientes de prueba que incluyen vasos de precipitado, acuarios y tanques de hasta 30 L. El número de concentraciones utilizadas son de uno a siete, sin tener en cuenta el control, con un máximo de cinco réplicas. Los ensayos utilizan un sistema de flujo continuo o son de renovación estática con recambio cada 48 h (Nipper y Roper, 1995; Soto *et al.*, 2000; Espinoza *et al.*, 2003; Duquesne *et al.*, 2004; King *et al.*, 2004).

De otra parte, para encontrar acumulación de metales de efluentes, sedimentos o al evaluar un metal específico se pueden determinar las concentraciones en el tejido de los organismos: en este caso los ensayos varían de 7 a 24 d, se utilizan de 15 a 400 organismos, con una talla máxima de hasta 65 mm. Durante el periodo de exposición se alimentan con microalgas de diferentes especies (*Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. entre otras), con aireación y acuarios hasta de 100 L. Las concentraciones utilizadas pueden ser hasta cuatro y son sistemas de flujo continuo o estáticos (Haynes *et al.*, 1997; Boisson *et al.*, 1998; Gregory *et al.*, 1999, 2002; Barlow y Kingston, 2001; Paul-Pont *et al.*, 2011).

Efectos subletales como la tasa de filtración, respiración, excreción o la eficiencia de absorción se han utilizado para evaluar la exposición a sedimentos, lodos de perforación, aguas de formación, metales o clorinados. Para ello se realizan experimentos cuya duración fluctúa entre 7 y 24 d, utilizando de 15 a 100 individuos con una talla de hasta 70 mm. Se alimentan con microalgas y se utiliza aireación durante el periodo de exposición en acuarios de hasta 30 L. Las concentraciones y réplicas pueden estar en el ámbito de tres a cinco por cada una y se utilizan sistemas de flujo continuo o estático con renovación cada 24, 48 o 96 h (Din y Abu, 1992; Sobral y Widdows, 1997; Cranford *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2003).

Para Colombia, dentro de los usos del agua y de los residuos líquidos, Decreto 3930 de 2010, se establecen definiciones y conceptos para bioensayos acuáticos, toxicidad aguda y crónica y concentración media letal a 96 h (INS, 2015).

De otra parte, en el Decreto 4741 de 2005 se reglamenta la prevención y el manejo de residuos y se establece que para considerar a un residuo peligroso como tóxico, este se debe clasificar según criterios de toxicidad agudos, crónicos y ecotoxicológicos. Por medio de la Resolución 578 de 2007 el Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT) otorgó la licencia ambiental a una empresa del sector petrolero para el Proyecto “Perforación exploratoria de hidrocarburos en aguas marinas” ubicado en el Caribe colombiano (ANLA, 2014). En este documento el Ministerio se pronunció sobre la utilización y descarga de lodos de perforación de base agua, determinando que se debían presentar estudios de toxicidad tanto aguda como crónica en organismos marinos adjuntando el valor de la concentración letal media de la FSP, de la concentración de efecto no observado (CENO) y de la concentración de efecto observado (CEO). Posteriormente, en la resolución 1544 de 2010 expedida por el MAVDT, se establecieron los términos de referencia genéricos para la elaboración del Estudio de Impacto Ambiental (EIA) para proyectos de perforación exploratoria de hidrocarburos (ANLA, 2014b), los cuales fueron modificados en la resolución 0421 de 2014 (ANLA, 2014c) expedida por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS). Es en los EIA donde diferentes compañías del sector anexan los resultados de pruebas agudas o crónicas con lodos de perforación, realizadas con diferentes especies, en el país o a nivel internacional.

Teniendo en cuenta estos aspectos y ante los pocos estudios con lodos de perforación en Colombia empleando organismos marinos, el objetivo del presente estudio fue evaluar efectos letales a través de pruebas de toxicidad aguda en seis lodos de perforación, y subletales por medio de pruebas crónicas en cinco lodos de perforación, sobre juveniles del pectínido *Argopecten nucleus*. Se escogió como organismo esta especie debido a características fisiológicas, ecológicas y económicas. Teniendo en cuenta la presencia de cultivos experimentales en la región, que tienen el paquete tecnológico de reproducción desarrollado y que es una especie de interés comercial para el país (INVEMAR, 2003; Velasco y Barros, 2008). Además porque se encuentra ampliamente distribuida en el Caribe en las ecorregiones Tayrona Magdalena, Palomino y Guajira principalmente. Es una especie filtradora, común en fondos arenosos y vegetados con pastos marinos en aguas someras hasta 50 m de profundidad (Díaz y Puyana 1994; Velasco, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los períodos comprendidos entre febrero y diciembre de 2011 (fase I) y enero de 2012 a abril de 2013 (fase II) se llevaron a cabo pruebas de toxicidad agudas y crónicas para evaluar el potencial tóxico de lodos base agua (LBA) y lodos

base sintética (LBS) en juveniles de *A. nucleus*. La totalidad de las pruebas fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Toxicología Marina de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (UJTL), sede Santa Marta, ubicado en el Caribe colombiano en zona costera de la ensenada de Gaira.

Suministro de agua

El agua de mar utilizada durante el curso de los experimentos (preparación de los lodos, obtención de la fase suspendida particulada, preparación de las diluciones para las concentraciones de prueba y actividades de mantenimiento) fue bombeada desde la ensenada de Gaira; prefiltrada a través de cuatro terrazas de grava, filtrada por medio de cartuchos (20 μm , 1 μ , y carbón activado) y finalmente esterilizada por medio de una lámpara de luz ultravioleta.

Lodos de perforación

Se evaluaron seis lodos provistos por tres empresas del sector petrolero, cada una suministro un LBA y un LBS.

Muestras

Se rotularon teniendo en cuenta tres factores: el número de la empresa (*e.g.* E1), si era lodo base agua o base sintética (LBA o LBS) y finalmente se añadió el número 2 si se realizó la prueba en la fase II del proyecto.

Preparación lodos de perforación

Los lodos de perforación utilizados fueron preparados por personal experto de tres reconocidas empresas de la industria petrolera en el Laboratorio de Oceanografía y Química de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano (UJTL).

Fase suspendida particulada (FSP) del lodo

Durante las pruebas de toxicidad aguda y crónica se evaluó la fase suspendida particulada (FSP) de los lodos; para su almacenamiento, obtención y posterior preparación de las concentraciones de ensayo se siguieron las recomendaciones de Duke *et al.* (1984), Jones *et al.* (1986) y EPA (1993).

Almacenamiento del lodo y de la FSP

Las muestras de lodos de perforación se mantuvieron entre 0 y 4°C y se utilizaron durante un periodo máximo de 60 d posterior a su preparación. A su vez, la FSP para los ensayos y los recambios se prepararon máximo 24 h antes de su uso.

Obtención de la FSP

Se homogenizó el lodo durante 10 min usando un agitador eléctrico (aproximadamente a 1600 RPM), posterior a esto se mezcló volumétricamente una parte del lodo con nueve partes de agua de mar filtrada durante 30 min de manera constante para luego dejarlo asentar por una hora. Una vez cumplido este tiempo se procedió a

sifonear la FSP, es decir, el líquido que se encuentra por encima de la fase sólida que se forma en el fondo pero ligeramente por debajo de la superficie de la solución (Figura 1).

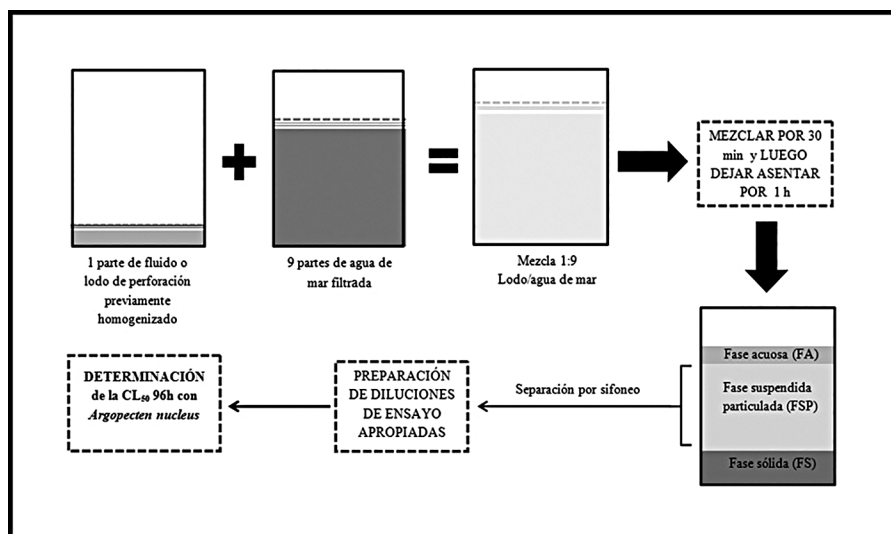


Figura 1. Obtención de la fase suspendida particulada del lodo (FSP). Modificada de Contreras-León *et al.* (2013).

Concentraciones de ensayo para pruebas de toxicidad

A partir de la FSP, se prepararon las diferentes concentraciones de ensayo considerando la FSP como el 100%.

Organismos de prueba

Obtención de organismos

Los juveniles de 40 a 60 d, fueron obtenidos del Laboratorio de Moluscos y Microalgas de la Universidad del Magdalena, localizado en la bahía de Taganga. Se transportaron dentro de cavas térmicas entre láminas de espuma humedecidas con agua de mar con el fin de protegerlos durante el recorrido hasta las instalaciones del laboratorio de la UJTL, ubicado a una distancia aproximada de 10 km desde Taganga.

Periodo de aclimatación y actividades de mantenimiento

Los organismos se aclimataron durante un período mínimo de ocho días previo a su uso en las pruebas. Se colocaron en acuarios de 60 L a una densidad adecuada, conteniendo agua de mar filtrada y con aireación constante. Se realizaron recambios diarios del 80%, se alimentaron dos veces al día con 150 mL de una dieta mixta de microalgas (*Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis* sp.) a una concentración aproximada de 80000 cél/ml y se registraron a diario variables fisicoquímicas como temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto.

Acceptabilidad del lote de organismos

Si la mortalidad no es mayor al 10% de la población durante el periodo de aclimatación el lote es aceptado.

Pruebas de toxicidad

En la fase I se evaluaron seis muestras de lodos de perforación por pruebas de toxicidad aguda: E1-LBA, E1-LBS, E2-LBA, E2-LBS, E3-LBA y E3-LBS. Por otra parte, en la fase II, se evaluaron cuatro muestras de lodos de perforación por toxicidad aguda (E1-LBS-2, E2-LBA-2, E3-LBA-2 y E3-LBS-2) con el fin de establecer las concentraciones de ensayo y cinco muestras por toxicidad crónica: E1-LBA, E1-LBS-2, E2-LBA-2, E3-LBA-2 y E3-LBS-2. Para el LBA de la empresa uno, no se realizaron pruebas agudas durante la fase II.

Pruebas agudas

Tipo de ensayo

Se condujeron pruebas de renovación estática a 96 h para determinar la concentración letal media (CL_{50}). Se establecieron pruebas de búsqueda para establecer las concentraciones de ensayo utilizadas en las definitivas.

Método de ensayo

Cada lodo fue evaluado con cinco concentraciones (excepto E1-LBS-2) y un control negativo (agua de mar) por cuadruplicado, con 20 organismos sembrados de manera aleatoria en cada concentración (cinco cada réplica), se usaron recipientes plásticos inertes (polietileno tereftalato - PET) de primer uso de un litro, con 800 mL de solución de ensayo y se realizó un recambio de las soluciones a las 48 h (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de ensayo para las pruebas de toxicidad aguda y crónicas con *Argopecten nucleus*.

	Aguda	Crónica
Tipo de ensayo	Estático con renovación (100%, 48 h)	Estático con renovación (60%, 24 h; 100 %, 7d)
Tiempo de exposición	96 h	30 d
Alimentación	No	Dos veces al día
Edad de los organismos		40 a 60 d
Temperatura		25-27 °C
Salinidad		33-37 ‰
Oxígeno disuelto	> 60% de saturación	
Aireación	No	Constante
Agua de dilución	Agua de mar filtrada a través de un sistema de cartuchos	
Fotoperíodo	12 h día/ 12 h noche	
Recipiente de prueba	Frascos plásticos (1 L)	Acuarios de vidrio (10 L)
Volumen de muestra de ensayo	800 mL	8 L
Número de concentraciones	5 (más el control)	3 (más el control)
Número de replicas	4	4
Número de organismos por réplica	5	50
Efecto final medido	Mortalidad; CL50 96 h	Supervivencia Crecimiento (talla y peso)
Validación de la prueba	Cuando la mortalidad en el control negativo es $\leq 10\%$	-

Variables fisicoquímicas

Al inicio y al final de cada ensayo para una réplica de cada concentración se registró: temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto.

Expresión de los resultados

Como punto final se consideró la mortalidad, esta se registró cada 24 h, considerando muertos a los organismos cuyas valvas se encontraban totalmente abiertas o si no existía respuesta ante un estímulo y con una cuchara fueron removidos intentando retirar el menor volumen de solución posible.

Análisis estadístico

La concentración letal media (CL_{50}) se determinó por medio de los programas de libre acceso de la EPA, Programa Probit v.1.5 o Programa Trimmed Spearman Karber v.1.5 (USEPA, 1990).

Carta control

La sensibilidad de los organismos así como la viabilidad del lote se calibró a través de experimentos bajo las mismas condiciones llevadas a cabo con el tóxico de referencia dicromato de potasio.

Validación de la prueba

Se considera válido cuando la mortalidad en el control negativo es igual o menor al 10% (ABNT, 2005).

Pruebas crónicas

Tipo de ensayo

Se condujeron pruebas de renovación estática a 30 d para determinar efectos letales y subletales en términos de la supervivencia y el crecimiento (talla y peso). Las concentraciones definitivas crónicas fueron determinadas a partir de los análisis de mortalidad de las pruebas agudas, utilizando para todos los ensayos crónicos las concentraciones equivalentes a la CL_5 , CL_{10} y CL_{20} a 96 h de cada lodo. Estas tres concentraciones se seleccionaron con el fin de garantizar la supervivencia a largo plazo y para comparar los resultados obtenidos entre los diferentes lodos.

Concentraciones utilizadas

Las concentraciones definitivas utilizadas fueron: 12637, 16166 y 27454 ppm (E1-LBA); 6628, 7111 y 7432 ppm (E2-LBA-2); 5686, 6549 y 7660 ppm (E3-LBA-2); 12214, 15918 y 24955 ppm (E1-LBS-2) y finalmente E3-LBS-2 en el cual solo se utilizó una concentración 573439 ppm (CL_{20}), debido a los altos volúmenes de lodo requerido. Para el LBS de la empresa dos, no se realizaron pruebas crónicas.

Método de ensayo

Cada lodo fue evaluado con tres concentraciones (excepto E3-LBS-2) y un control negativo (agua de mar) por cuadruplicado (Figura 2), 800 organismos fueron usados y sembrados de manera aleatoria empleando 50 por cada réplica (excepto

E1-LBS-2 donde se usaron 45), se usaron acuarios de vidrio de 10 L (30 X 25 X 20 cm) con ocho L de solución de ensayo, cada réplica fue alimentada con 25 ml de una dieta mixta de microalgas (*Chaetoceros* sp., *Isochrysis* sp. y *Nannochloropsis* sp.) a una concentración aproximada de 80000 cél/ml, dos veces al día.

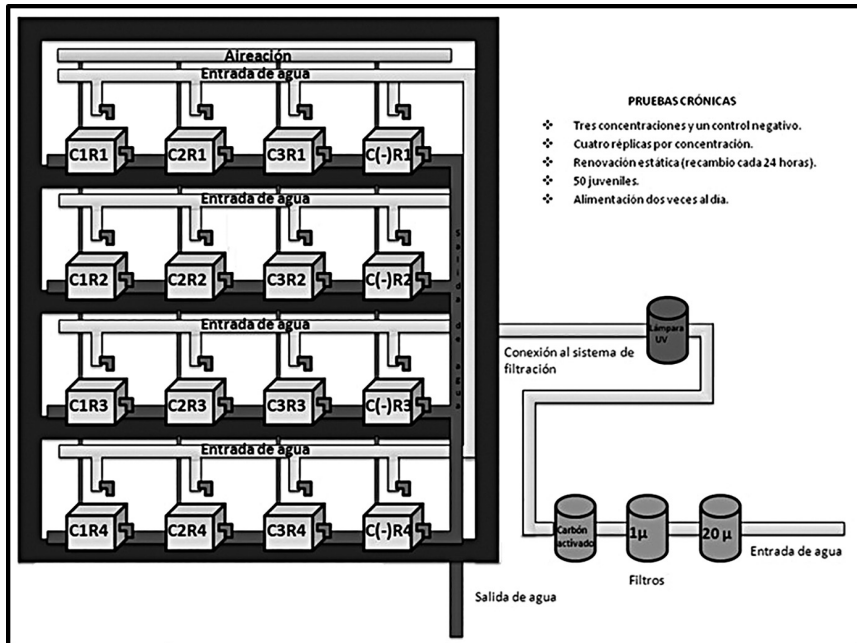


Figura 2. Batería de acuarios utilizada en las pruebas crónicas para evaluar un lodo de perforación.

Se realizaron recambios de dos tipos; un recambio diario del 60% de la solución y cada siete días un recambio del 100% que incluía un lavado general de los acuarios en caso de ser necesario, todo el material de vidrio se lavó de acuerdo a las recomendaciones de EPA (2002) y Castillo (2004).

Variables fisicoquímicas

Diariamente se registraron la temperatura, la salinidad, el pH y el oxígeno disuelto para una réplica de cada concentración de ensayo.

Registro de talla, peso y supervivencia

Durante los días 0, 15 y 30 de cada ensayo se realizaron muestreos para las mediciones de talla y peso y en los días 15 y 30 se registró también la supervivencia.

Muestra inicial de talla y peso

Se separaron aleatoriamente 50 organismos del lote que iba a entrar en la prueba, los organismos fueron sacrificados y posteriormente se registró la longitud

total (talla) de cada individuo por medio de un calibrador. Posterior a esto, los organismos fueron colocados en un horno eléctrico por un periodo de 24 h (60° C), se retiraron del horno y se pusieron en un desecador para finalmente registrar el peso final de cada individuo por medio de una balanza analítica.

Muestra de talla, peso y supervivencia a los 15 y 30 d

Se extrajeron cinco individuos de cada una de las réplicas (20 en total) de cada concentración utilizada y cuando había organismos disponibles, repitiendo el procedimiento descrito anteriormente. La supervivencia se hizo a través del conteo directo de los organismos, se consideraban muertos cuando las valvas estaban totalmente abiertas o si no existía respuesta ante un estímulo y se removían. Se tuvieron en cuenta en el conteo de supervivientes a los individuos utilizados para las mediciones de talla y peso.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las diferencias en supervivencia, talla y peso entre las concentraciones de cada ensayo, así como para la comparación entre diferentes lodos (agua o sintético) se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS® Centurion v.XVI. Se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (Levene), para determinar diferencias estadísticas entre el control y cada una de las concentraciones de prueba, así mismo para comparar entre los lodos la supervivencia, la talla y el peso. Se utilizó un análisis de varianza a una vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparaciones múltiples (LSD de Fisher) y se estableció como nivel significativo $p < 0.05$ (Quinn y Keough, 2002).

RESULTADOS

Pruebas agudas

Lodos base agua

La mayor mortalidad que se presentó en el control fue de 5% (E1-LBA, E3-LBA y E2-LBA-2). En E2-LBA-2 y E3-LBA-2 a medida que aumentaba la concentración era mayor la mortalidad. En el caso de E2-LBA y E3-LBA, las concentraciones intermedias: 6250, 12500 y 25000 ppm, tuvieron una mortalidad menor o igual a la de la más baja (Tabla 2). Al cumplirse el tiempo de exposición en las concentraciones más altas, 50000 y 100000 ppm, hubo una mortalidad de 100% (excepto E3-LBA).

Lodos base sintético

El control de E1-LBS y E2-LBS presento una mortalidad de 10%. En el caso de E2-LBS no se presentó mortalidad en 75000 ppm, mientras que en E3-LBS-2 las primeras tres concentraciones tampoco presentaron mortalidad (62500, 125000 y 500000 ppm) y en E3-LBS las mortalidades en todas las concentraciones

estuvieron por debajo de 30%. A medida que aumentaba la concentración fue mayor la mortalidad para las pruebas realizadas en E1-LBS y E1-LBS-2, esta mortalidad estuvo entre 25 y 100% en las diferentes pruebas (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad (96 h) para las pruebas de toxicidad aguda con lodos de base agua y base sintético de las empresas 1,2 y 3.*E1-LBS-2 se utilizaron cuatro concentraciones únicamente cada una con 15 organismos.

E1-LBA						E1-LBS					E1-LBS-2*						
Concentración de la FSP (ppm)																	
0	6250	12500	25000	50000	100000	0	37500	75000	150000	300000	600000	0	12500	25000	50000	100000	
5	0	20	10	25	100	10	25	30	75	95	100	0	5	20	40	70	
E2-LBA						E2-LBA-2					E2-LBS						
0	3125	6250	12500	25000	50000	0	3125	6250	12500	25000	50000	0	37500	75000	150000	300000	600000
0	10	5	75	100	100	5	0	5	95	100	100	10	20	0	50	70	85
E3-LBA						E3-LBA-2					E3-LBS						
0	3125	6250	12500	25000	50000	0	6250	12500	25000	50000	100000	0	62500	125000	250000	500000	1000000
5	5	0	5	30	60	0	10	60	100	100	100	0	5	15	15	25	5
E3-LBS-2																	
0	62500	125000	250000	500000	1000000												
0	0	0	0	10	70												

Concentración letal media (CL₅₀)

A partir de los resultados de mortalidad obtenidos en las pruebas agudas se determinó la concentración letal media (CL₅₀) con un intervalo de confianza de 95% (Tabla 3). En los LBA el valor para la empresa uno fue de 50446 ppm y los valores obtenidos para las pruebas realizadas en el lodo de la empresa dos fueron similares (9978 y 9113 ppm) y caso contrario ocurrió en el caso de la empresa tres donde hay una diferencia de 30000 ppm entre los valores. Para los LBA, los resultados se encuentran entre 9000 y 51000 ppm. En los LBS los valores para la empresa uno, fueron de 40520 y 113578 ppm, la empresa dos de 231631 ppm (Tabla 3) y en la empresa tres los valores fueron superiores a 800000 ppm, en general la concentración media letal los de base sintética estuvo por encima de 40000 ppm.

Tabla 3. Concentración letal media (CL₅₀ con intervalo de confianza al 95%) para *Argopecten nucleus* en en LBA y LBS para las empresas 1, 2 y 3. *Calculado por Probit, **Calculado por Trimmed Spearman Karber, ***La mortalidad en la concentración más alta fue de 5%.

Muestra	CL50 96 h	Límite inferior (ppm)	Límite superior
E1-LBA	50446**	41454	61388
E1-LBS	113578*	68302	151729
E1-LBS-2	40520*	30069	55749
E2-LBA	9978**	8518	11689
E2-LBA-2	9113*	6545	10711
E2-LBS	231631*	137453	324930
E3-LBA	41243**	28308	60086
E3-LBA-2	10780*	8931	12 966
E3-LBS	>1000000***	-	-
E3-LBS-2	818133*	682031	1024334

Pruebas Crónicas Empresa uno

Supervivencia. El LBA presentó una supervivencia alta para las tres concentraciones y el control hasta el día 15, presentándose el valor más bajo en CL₂₀ con 85% ± 14.17; para el día 30 la supervivencia del control fue de 89% ± 3.83 y en la CL₂₀ se redujo hasta 2% (Figura 3a), lo que hizo que esta última concentración no se tuviera en cuenta para los análisis de talla y peso a 30 d. LBS, al día 15 la supervivencia en la concentraciones se presentó por debajo de 50%, mientras que en el control fue de 60.56% ± 11.23. Para el día 30 siguió bajando hasta ser de menos de 35% (Figura 3b) en las concentraciones y de 48.88 ± 7.02% en el control, valor más bajo para el total de las pruebas crónicas realizadas.

Incremento en talla. La talla promedio en el LBA fue de 15.17 mm ± 1.66, para el día 15 el mayor valor se presentó en el control y la CL₅ (16.20 mm ± 0.16 y 16.30 mm ± 0.38) y para el día 30 todas las concentraciones (excepto CL₂₀) se mantuvieron por encima de 17 mm (Figura 3c). En el LBS el valor promedio de la talla al iniciar la prueba fue de 13.6 mm ± 1.72, para los 15 d los valores más altos se presentaron en la CL₅ y en la CL₂₀ con valores de 14.68 mm ± 2.06 y 14.37 mm ± 1,63 (Figura 3d), al día 30 la talla se encontraba por encima de 14 mm en el control y todas las concentraciones.

Incremento en peso. El vLBA tuvo los valores de peso promedio al inicio del ensayo fueron de 0.61 g ± 0.17, en el día 15 el peso aumento en el control y en todas las concentraciones, mientras que a los 30 d, el control con 0.75 g ± 0.13 presentó el más alto (Figura 3e). En el LBS, el valor inicial fue de 0.37 g ± 0.15. A los 15 d, el mayor se presentó en el control con 0.43 g ± 0.13 (Figura 3f) y finalmente en el día 30 la CL₂₀ tuvo el valor más alto (0.51 g ± 0.15) con una diferencia de 0.04 g respecto al control.

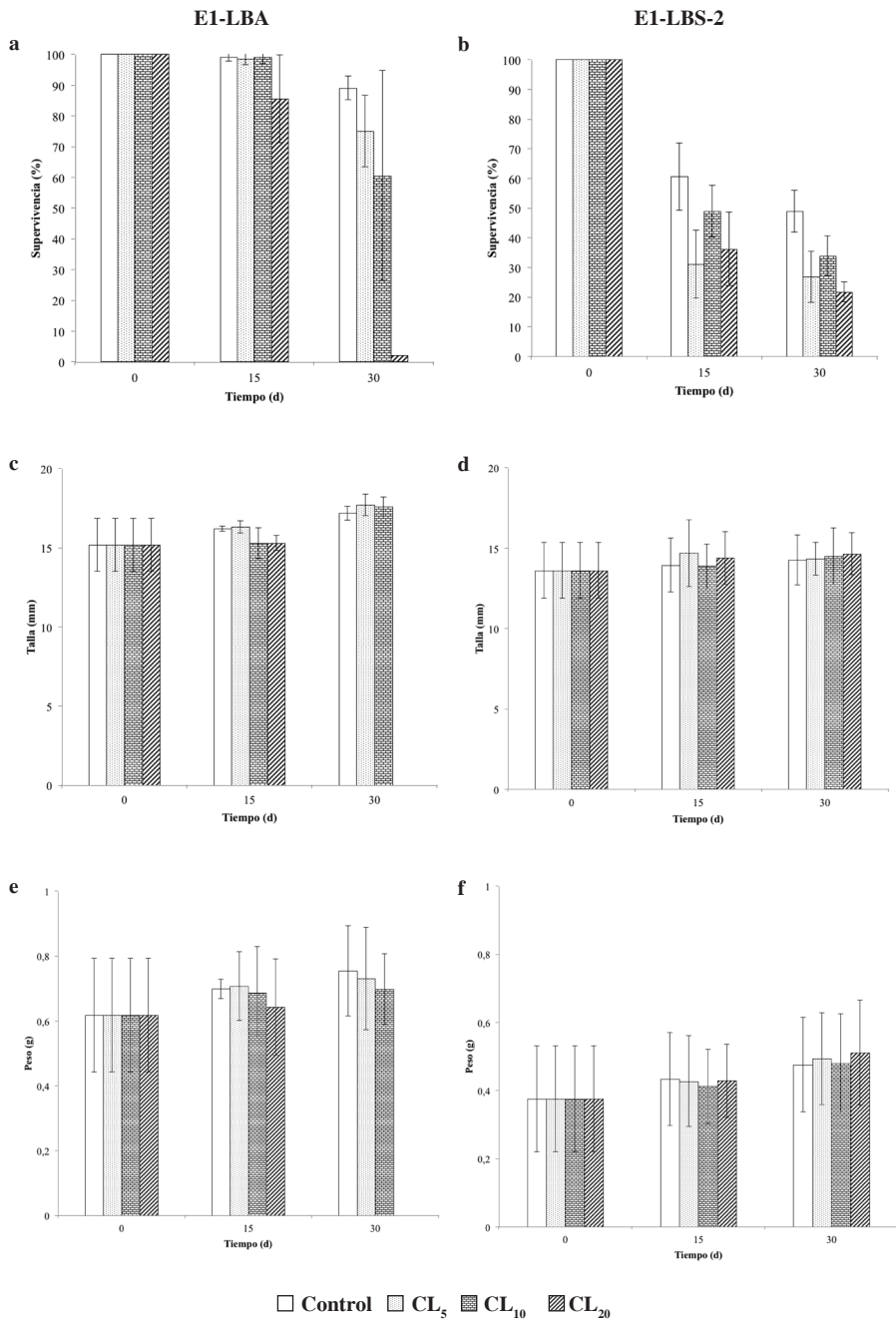


Figura 3. Porcentaje de supervivencia (a y b), talla (c y d) y peso (e y f) de juveniles de *A. nucleus* expuestos a lodos de perforación de base agua y base sintética de la empresa 1 durante las pruebas crónicas.

Tasa de crecimiento. Para la comparación del crecimiento en los lodos analizados se utilizó la tasa de crecimiento, tanto en talla como en peso, debido a que los valores iniciales para cada prueba fueron variables porque se usaron diferentes lotes. En el LBA, el mayor valor en talla se presentó en CL₅ con 1.26 mm ± 0.33, seguido por CL₁₀ y el control (Figura 4a). Sin embargo, en términos del peso fue el control quien presentó el valor mayor, 0.06 g ± 0.01 (Figura 4b). Para el LBS, la talla tuvo valores similares en el control y en la CL₁₀ (Figura 4a), mientras que en CL₂₀ (0.51 mm ± 0.60) fue el mayor. En términos del peso, los valores del control y la CL₅ fueron parecidos y en el CL₂₀ se presentó el mayor con 0.06 g ± 0.015.

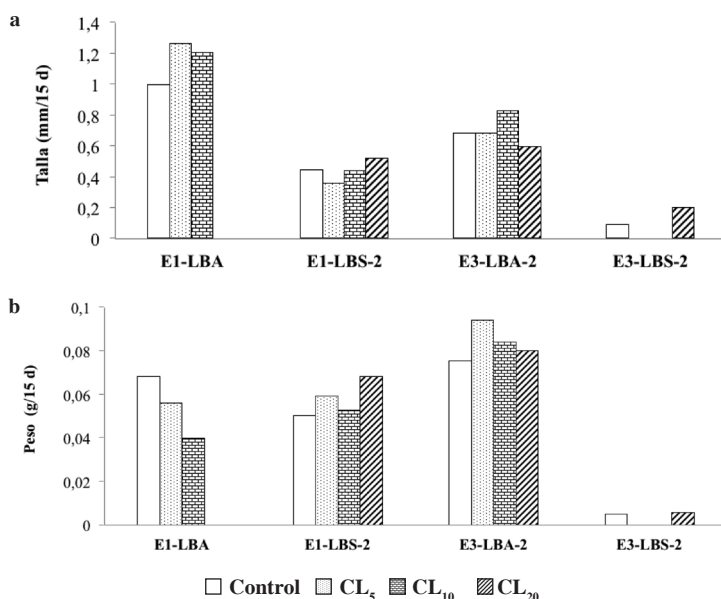


Figura 4. Tasa de crecimiento en términos de talla (a) y peso (b) entre lodos base agua y base sintética de las empresas 1 y 3. * CL₂₀ de E1-LBA no tiene tasa debido a supervivencia < 2% en 30 d.

Empresa dos

Supervivencia. El ensayo del lodo base agua tuvo una duración de 13 d, en este punto la supervivencia máxima en las concentraciones fue de 2% ± 2.82 (CL₂₀) pero en el control fue del 83.5% ± 7.54 (Figura 5). Se determinó no tener en cuenta esta muestra para los análisis de incremento en talla y peso por haber presentado mortalidades altas en las concentraciones de ensayo antes de completar los 30 d de duración.

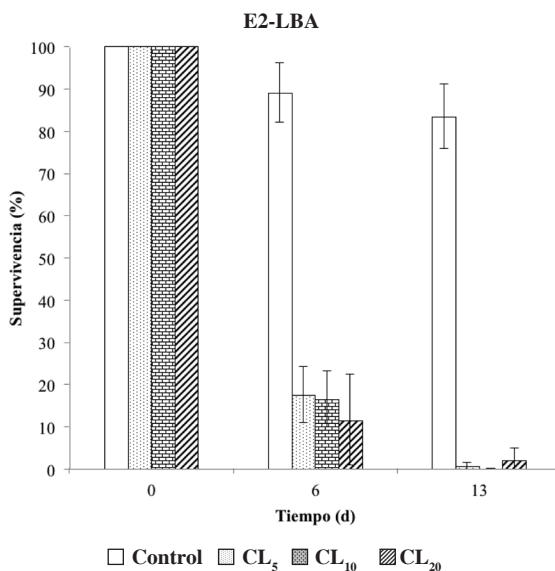


Figura 5. Porcentaje de supervivencia de juveniles de *A. nucleus* expuestos al lodo de perforación de base agua de la empresa 2 durante las pruebas crónicas; * esta prueba tuvo una duración de 13 d.

Empresa tres

Supervivencia. A los 15 d de la prueba con el LBA, la supervivencia más baja estaba en la CL₂₀ (69.5 ± 13.98) mientras que en el control y en las otras dos concentraciones (CL₅ y CL₁₀) se encontraba por encima del 90% (Figura 6a). A los 30 d, la CL₅ y la CL₂₀, estuvieron por debajo del 40% mientras que en el control fue de $75\% \pm 6.61$. En el LBS, trabajado con una sola concentración de ensayo, en el día 15 la supervivencia del control y de la CL₂₀ fue superior al 95% (figura 6b), mientras que para el final del ensayo en la CL₂₀ disminuyo hasta un $73.5\% \pm 1.63$ pero en el control se mantuvo.

Incremento en talla. En el LBA los organismos empezaron con una talla promedio de $12.16 \text{ mm} \pm 0.63$, en el día 15 se mantuvieron sobre los 12 mm (Figura 6c) y para el final es en la concentración de CL₁₀ donde se presenta la mayor talla con un valor de $13.81 \pm 0.71 \text{ mm}$. En el LBS los organismos tuvieron una talla promedio inicial de $12.35 \text{ mm} \pm 0.37$, aunque para el día 15 ambos presentaron un aumento en la talla de 0.8 mm aproximadamente para el control y la concentración utilizada (Figura 6d). En el día 30 su talla fue de $12.52 \text{ mm} \pm 0.25$ y $12.75 \text{ mm} \pm 0.31$ (control y CL₂₀).

Incremento en peso. En el LBA, el peso promedio inicial fue de $0.26 \text{ g} \pm 0.05$, a los 15 d el mayor fue de $0.28 \text{ g} \pm 0.08$ (CL₂₀) y al finalizar el experimento la CL₅ tuvo el mayor con un valor de $0.34 \text{ g} \pm 0.11$ (Figura 6e). En el LBS, el valor inicial fue de $0.26 \text{ g} \pm 0.06$, en los días 15 y 30 no se presentó crecimiento ni en el control ni en la concentración evaluada (Figura 6f).

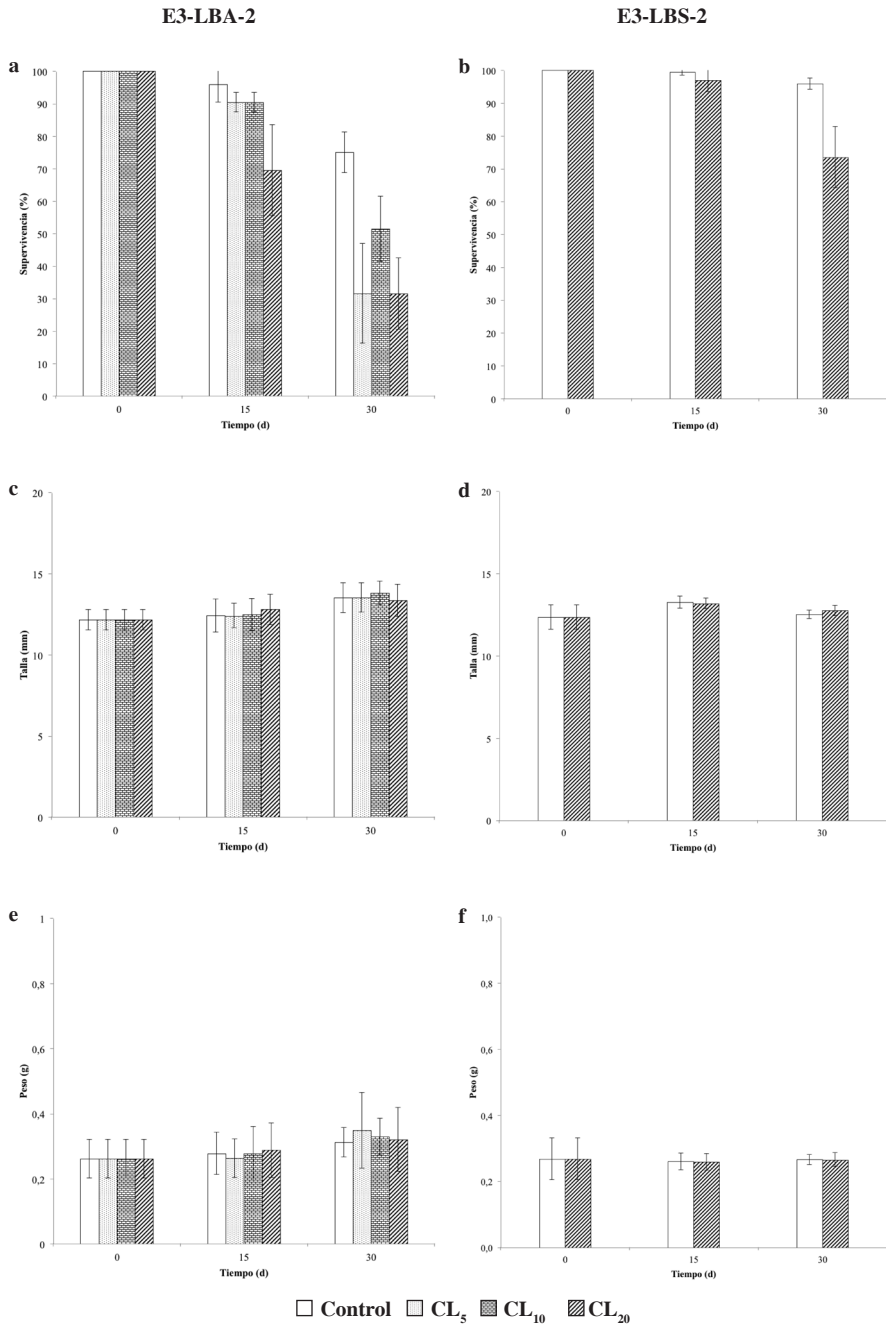


Figura 6. Porcentaje de supervivencia (a y b), talla (c y d) y peso (e y f) de juveniles de *A. nucleus* expuestos a lodos de perforación de base agua y base sintética de la empresa 3 durante las pruebas crónicas.

Tasa de crecimiento. En el LBA, para la talla; el control y la CL₅ obtuvieron valores similares (0.68 mm ± 0.30 y 0.68 mm ± 0.16) y en la CL₁₀ se obtuvo el valor más alto con 0.82 mm ± 0.10 (Figura 4a). El menor peso se presentó en el control (0.07 g ± 0.02) mientras que en la CL₅ fue el mayor (Figura 4b). En el LBS, la CL₂₀ presento una mayor talla (0.20 mm ± 0.15) pero en términos del peso fue similar fue similar al control (Figura 6f).

Comparación entre lodos. Se realizó un ANOVA a una vía con una comparación de múltiples rangos para comparar la tasa de crecimiento (talla y peso) entre los lodos. Se encontraron diferencias significativas para ambos casos talla y peso respectivamente (F: 21.47, *p* = 0.000; F: 14.68, *p* = 0.000), entre lodos únicamente no se observaron diferencias para E1-LBA - E1-LBS-2 (Tabla 4).

Tabla 4. Anova a una vía y prueba de comparación múltiple de rangos (LSD) para el efecto de la tasa de crecimiento (talla y peso) sobre los lodos en las pruebas crónicas. ^a d.f entre grupos, ^b d.f dentro de grupos ^c no existen diferencias, * diferencias significativas (< 0.05).

	Tasa de crecimiento (talla)	Tasa de crecimiento (peso)
	a = 3, b = 45	a = 3, b = 42
E1-LBA - E1-LBS-2	*	c
E1-LBA - E3-LBA-2	*	*
E1-LBA - E3-LBS-2	*	*
E1-LBS-2 - E3-LBA-2	*	*
E1-LBS-2 - E3-LBS-2	*	*
E3-LBA-2 - E3-LBS-2	*	*

DISCUSIÓN

Hacia finales de la década de los años setenta del siglo pasado, la EPA (1979) estableció que no debería haber descarga en aguas navegables de residuos contaminantes de ningún tipo, entre ellos cortes y lodos de perforación. En 1986, ya se había establecido el límite de descarga mínimo de lodos de perforación para pozos ubicados en aguas marítimas de Estados Unidos en 30000 ppm basados en pruebas de toxicidad aguda realizadas en la fase suspendida particulada (EPA, 1993).

En 1991 se realizó una revisión de las normas existentes y con base a esto se propuso un control adicional no solamente para los lodos de perforación sino también para los cortes producidos durante el proceso de perforación. En ella, los pozos ubicados a una distancia mínima de 5.5 km en relación de las costas de Estados Unidos deberían implementar una política de cero descargas. Mientras que para aquellos que se encontraran a una distancia mayor a 5.5 km debían tener en cuenta los siguientes parámetros; el límite de descarga anteriormente nombrado

(> 30000 ppm), concentraciones máximas de 1 mg/kg para mercurio y de 3 mg/kg para cadmio utilizados en durante la preparación de los lodos o de los cortes, se prohibió la descarga de aceite diésel y para el caso de otro tipo de aceites que pudieran causar una película o efectos en la superficie del agua, estos deberían pasar la prueba estática de Sheen (EPA, 1993, 1996).

De acuerdo con esta regulación y para las pruebas agudas, únicamente los lodos evaluados correspondientes a las muestras E2-LBA, E2-LBA-2 y E3-LBA-2 se encuentran por debajo del valor mínimo establecido (FSP) para poder descargar en el ambiente marino (9978, 9113 y 10780 ppm respectivamente), todos ellos son de base agua. Sin embargo, para la clasificación establecida por GESAMP (2002) para pruebas agudas todos los lodos (base agua y base sintético) se clasificaron como no tóxicos (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación para toxicidad aguda y crónica acuática. Modificado de GESAMP (2002).

Clasificación	Aguda		Crónica	
	Descripción	CL ₅₀ (ppm)	Descripción	CENO (ppm)
0	No tóxico	>1000	Despreciable	> 1
1	Prácticamente no tóxico	> 100 - ≤ 1000	Bajo	> 0.1- ≤ 1
2	Ligeramente tóxico	> 10 - ≤ 100	Moderado	> 0.01- ≤ 0.1
3	Moderadamente tóxico	> 1- ≤ 10	Alto	> 0.001- ≤ 0.01
4	Altamente tóxico	> 0.1- ≤ 1	Muy alto	≤ 0.001
5	Muy tóxico	> 0.01- ≤ 0.1		
6	Extremadamente tóxico	≤ 0.01		

El organismo más utilizado para pruebas de toxicidad en lodos de perforación es el misidáceo, *Americamysis bahia*. Duke *et al.* (1984) llevaron a cabo un estudio donde evaluaron ocho fluidos de perforación con la especie anteriormente nombrada, encontrando una toxicidad de la FSP entre 27000-1000000 ppm (Tabla 6). De otra parte, estudios realizados en Brasil con el mismo organismo muestran una toxicidad de 41528 ppm (Labtox, 2006). Estudios de toxicidad aguda llevados a cabo por Contreras-León *et al.* (2013) con el camarón *Litopenaeus vannamei* muestran que LBA evaluados se encuentran entre 4000-27000 ppm, valores inferiores a los presentados en este estudio que se encuentran entre 9000-51000 ppm, y LBS se encuentran entre 40000-310000 ppm (Tabla 6), valores también inferiores a los presentados por estudio (100000-1000000 ppm). Por último, estudios de toxicidad aguda realizados también con *L. vannamei* por Garcia *et al.* (2014) muestran que los LBA evaluados se encuentran entre 34100-1000000 ppm y los LBS entre 148000-1000000 ppm.

Tabla 6. Cuadro comparativo de CL50 agudas en lodos de perforación para diferentes especies de invertebrados marinos. * Se expresa como ppm de la FSP.

Tipo de lodo	Organismo	CL50*	Lim. Inf.	Lim. Sup.	Autor
KCl (polímero)		27,000	25,000	29,000	
Lignosulfato agua marina		516,000	472,000	565,000	
Con cal	<i>Americamysis</i>	163,000	124,000	202,000	Duke <i>et al.</i>
Polímero no dispersado	<i>bahia</i>	> 1,000,000	-	-	1984
Lignosulfato (ligero)		654,000	544,000	804,000	
Lignosulfato agua dulce		293,000	272,000	315,000	
SYN-TEQ	<i>Lytechinus variegatus</i>	125,000	-	-	Labtox, 2011a
SYN-TEQ	<i>Americamysis</i>	> 1,000,000	-	-	Labtox, 2011b
Hydro-Guard/CMC	<i>bahia</i>	41,528	-	-	Labtox, 2006
Lodo base agua – E1		24,841	18,027	28,799	
Lodo base agua – E2		4,224	2,542	6,045	
Lodo base agua – E3	<i>Litopenaeus</i>	26,635	21,712	32,671	Contreras-León
Lodo base sintético – E1	<i>vannamei</i>	40,781	30,058	50,073	<i>et al.</i> 2013
Lodo base sintético – E2		301,813	175,484	766,085	
Lodo base sintético – E3		308,249	226,503	510,325	
Aquagel		> 1,000,000	-	-	
Viscoelástico A		109,000	-	-	
Viscoelástico B		34,100	-	-	
No dispersado	<i>Litopenaeus</i>	156,000	-	-	García <i>et al.</i> ,
OI C16-C18	<i>vannamei</i>	> 1,000,000	-	-	2014
Aceite mineral baja toxicidad		148,000	-	-	
Ester vegetal		748,100	-	-	

La carta control con el tóxico de referencia dicromato de potasio (Figura 7), se realizó con seis puntos, obteniendo una $CL_{50} - 96$ h promedio de 16.47 (\pm 5.05) con un CV% de 30.67. La carta control debe tener al menos cinco puntos, es responsabilidad del laboratorio mantenerla actualizada y la máxima variabilidad se establece en $\leq 30\%$ para el CV (EPS, 1990; EPA, 2002).

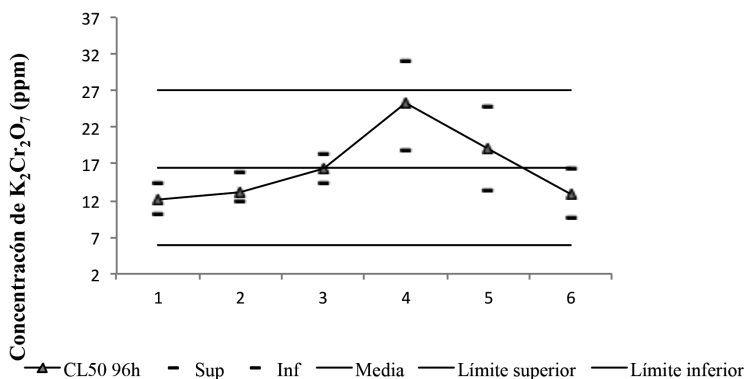


Figura 7. Carta control a 96 h de *Argopecten nucleus* con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia.

En el presente estudio, la mayor concentración de ensayo (CL_{20}) de E1-LBA mostró diferencias significativas frente al control y a las otras dos diluciones de ensayo en la supervivencia a los 30 d. En este mismo lodo, se presentó el mayor aumento en tasa de crecimiento (talla), con un valor de 1.26 mm/15d. Este valor es similar a lo registrado por Gómez *et al.* (2010) de organismos de cultivo mantenidos en ambiente natural (0.15 mm/d) y por Invemar (2003) de 2.8 mm/mes. Para el caso de E3-LBA-2 no se observaron diferencias significativas en peso y talla entre los tratamientos ensayados. Según los ensayos y las concentraciones utilizadas, se pudo determinar que el LBA que produjo un mayor efecto letal crónico sobre los organismos fue el E2-LBA-2. En los LBS, E1-LBS-2 y E3-LBS-2 no se presentaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos para los parámetros de crecimiento. Sin embargo, si presentan diferencias en supervivencia, de las concentraciones de ensayo usadas.

Casos particulares de mortalidades altas para *A. nucleus* podrían explicarse relacionándolas no únicamente con la toxicidad del lodo, sino también con relación al efecto subletal sobre su fisiología, tal como su sistema inmune, lo que podría facilitar la infección con organismos patógenos presentes o latentes en su organismos que finalmente causen la mortalidad (Araya *et al.*, 1999; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008). La supervivencia en el control fue superior a 70% (excepto E1-LBS-2). De acuerdo con las concentraciones de efecto no observable (Tabla 7), se ordenaron los lodos en orden creciente E3-LBA-2 < E1-LBS-2 < E1-LBA < E3-LBS-2 y siguiendo la clasificación de la GESAMP (2002), los cuatro lodos evaluados tienen un grado de toxicidad despreciable.

Tabla 7. Concentración de efectos no observables de lodos de perforación analizados en *Argopecten nucleus*. ^a Menor concentración de ensayo que no presenta diferencias significativas en peso y talla pero sí en supervivencia. ^b Concentración única de ensayo que no presenta diferencias significativas en peso y talla pero sí en supervivencia.

Muestra	CENO (ppm)
E1-LBA	16166
E1-LBS-2	12214
E3-LBA-2	< 5686 ^a
E3-LBS-2	< 573439 ^b

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son los primeros para pruebas de toxicidad aguda y crónica en una especie de bivalvo expuesta a lodos de perforación en Colombia. Según los criterios de clasificación de sustancias de la GESAMP (2002), para toxicidad aguda los lodos estudiados se describen como no tóxicos y en el caso de las crónicas se clasifican como de toxicidad despreciable para algunas de las variables

estudiadas. Se pudo observar que los efectos subletales en términos del crecimiento y la supervivencia fueron mayores en los LBA que en los LBS.

La especie utilizada mostró un buen comportamiento en el laboratorio y durante las pruebas a largo plazo. Estudios de este tipo buscan ayudar a la legislación en Colombia que regula la posible descarga de lodos de perforación en las costas. Se recomienda realizar estudios en lodos de perforación con especies de diferentes niveles tróficos para ampliar el espectro ecotoxicológico además de determinar otros efectos subletales ya sea en función al éxito reproductivo, utilizando diferentes estadios larvales, la respuesta fisiológica y en el potencial de bioacumulación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente al Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) – Ecopetrol, a la Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, al Programa de Biología Marina y a la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la UJTL por la financiación total del proyecto, al personal científico, administrativo y logístico de ambas entidades por el apoyo prestado durante el mismo. Esta investigación se realizó dentro del marco del Convenio de Cooperación Tecnológica No. 007 de 2009 suscrito entre ICP-Ecopetrol y la UJTL, en los Proyectos “Evaluación de la toxicidad de los lodos de perforación base agua y sintético sobre *Litopenaeus vannamei*, *Artemia salina* y *Argopecten nucleus* en el desarrollo de las pruebas de toxicidad de los componentes activos de lodos de perforación en invertebrados marinos (fase I)” y “Desarrollo de pruebas toxicidad crónica y bioacumulación de lodos de perforación en *Litopenaeus vannamei* y *Argopecten nucleus* (fase II)”, dentro del Grupo de Investigación Dinámica y Manejo de Ecosistemas Marino-Costeros, de la UJTL. Al Laboratorio de Moluscos y Microalgas de la Universidad del Magdalena por el suministro de los juveniles de *A. nucleus*.

BIBLIOGRAFÍA

- ABNT. 2005. Ecotoxicología acuática - toxicidade aguda - método de ensaio com misidáceos (Crustácea). *NBR 15308*. Associação Brasileira de Normas Técnicas. 17 p.
- ANLA. 2014a. Resolución 578 del 29 de marzo de 2007. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA). http://www.anla.gov.co/documentos/res_0578_290307.pdf. 30/12/14.
- ANLA. 2014b. Resolución 1544 del 6 de agosto de 2010. Autoridad de Licencias Ambientales (ANLA). http://www.anla.gov.co/documentos/normativa/res_1544_060810.pdf
- ANLA. 2014c. Resolución 0421 del 20 de marzo de 2014. Autoridad de Licencias Ambientales (ANLA). <http://www.anla.gov.co/documentos/normativa/RES.%200421%20del%2020%20de%20marzo%20de%202014.pdf>
- Araya, R.A., M.A. Jorquera y C.E. Riquelme. 1999. Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Rev. Chil. His. Nat.*, 72: 261-271.



- Barlow, M.J. y P.F. Kingston. 2001. Observations on the effects of barite on the gill tissues of the suspension feeder *Cerastoderma edule* (Linné) and the deposit feeder *Macoma balthica* (Linné). *Mar. Pollut. Bull.*, 42(1): 71-76.
- Boisson, F., M.G.J. Hartl., S.W. Fowler y C. Amiard-Triquet. 1998. Influence of chronic exposure to silver and mercury in the field on the bioaccumulation potential of the bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Environ. Res.*, 45(4-5): 325-340.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. 327-337. En: Lovatelli, A., A. Farfás e I. Uriarte (Eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. Actas de Pesca y Acuicultura No. 12, FAO, Roma. 359 p.
- Castillo, G (Ed). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Jiutepec, Morelos, México. 189 p.
- Contreras-León, G.J., S.A. Rodríguez-Satizábal., C.M. Castellanos-Romero, A. Franco-Herrera y M. Serrano-Gómez. 2013. Acute toxicity of drilling muds on *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) postlarvae. *Cienc. Tecnol. Futuro.*, 5(3): 127-138.
- Cranford, P.J., D.C Gordon, K. Lee, S.L. Armsworthy y G.H. Tremblay. 1999. Chronic toxicity and physical disturbance effects of water- and oil-based drilling fluids and some major constituents on adult sea scallops (*Placopecten magellanicus*). *Mar. Environ. Res.*, 48(3): 225-256.
- Díaz J. y M. Puyana. 1994. Moluscos del Caribe colombiano. Un catálogo ilustrado. Colciencias, Fundación Natura e Invenmar, Bogotá. 291 p.
- Din, Z.B y A.B. Abu. 1992. Sublethal effects of produced water from crude oil terminals on the clam *Donax faba*. En: Ray, J.P y F.R Engelhardt (Eds.), Produced Water: Technological/Environmental Issues and Solutions. Nueva York. 445-454.
- Duke, T.W., P.R. Parrish, R.M. Montgomery, S.D. Macauley, J.M. Macauley y G.M. Cripe. 1984. Acute toxicity of eight laboratory-prepared generic drilling fluids to mysids (*Mysidopsis bahia*). EPA-600/S3-84-067. United States Environmental Protection Agency. Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, EE.UU. 35 p.
- Duquesne, S., M. Liess y D.J. Bird. 2004. Sub-lethal effects of metal exposure: physiological and behavioural responses of the estuarine bivalve *Macoma baltica*. *Mar. Environ. Res.*, 58(2-5): 245-250.
- Environment Canada. 2001. EPS 1/RM/41 Biological test method: test for survival and growth in sediment using spionida polychaete worms (*Polydora cornuta*). Environmental Protection Series, Ottawa, Canadá. 108 p.
- EPA. 1979. Effluent guidelines and standards, Oil and gas extraction point source category. 40 CFR Part 435. Federal Register, 44(73): 10 p.
- EPA. 1993. Oil and gas extraction point source category, offshore subcategory effluent limitations guidelines and new source performance standards. 40 CFR Part 435. Federal Register, 58(41): 59 p.

- EPA. 1996. Final effluent limitations guidelines and standards for the coastal subcategory of the Oil and Gas extraction point source category, final rule. 40 CFR Part 435. Federal Register, 61(242): 44 p.
- EPA. 2002. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA-821-R-02-013, Cuarta edición, EPA, Washington, EE.UU. 335 p.
- EPS 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Environment Canada. Environmental Protection Series. EPS 1/RM/12, Ontario, Ottawa, Canada. 85 p.
- Espinoza, C., R. Díaz y M. Zúñiga. 2003. Toxicidad aguda y crónica de cobre y cadmio sobre dos especies de mitílidos: *Perumytilus purpuratus* y *Aulacomya ater*. Cienc.Tecnol. Mar., 26(2): 73 – 78.
- Fink, J.K. 2012. Petroleum engineer's guide to oil field chemicals and fluids. Chapter One: Drilling muds. Gulf Professional Publishing, Waltham, EE.UU. 785 p.
- García, J.V., E. Zamora-Ledezma y K. Aguilar. 2014. Environmental performance of drilling fluids selected for offshore operations in Venezuela. World. Appl. Sci. J., 29(10): 1310 – 1314.
- GESAMP. 2002. The revised Gesamp hazard evaluation procedure for chemical substances carried by ships. IMO, FAO, Unesco-IOC, WMO, WHO, IAEA, UN y UNEP. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (Gesamp), Gesamp Reports & Studies No. 64. Pub. No. 493/02, Londres. 121 p.
- Gómez-León, J., E. Acosta, C. Castellanos y M. Santos. 2010. Cultivo de pectínidos en el Caribe colombiano. Proyecto. Optimización de la producción de postlarvas del ostión *Nodipecten nodosus* y la conchuela *Argopecten nucleus* en el Caribe colombiano. Código 2105-09-17982. Serie de Publicaciones generales No. 40. ISBN 978-958-8448-09-01. Santa Marta. 160 p.
- Gregory, M.A., R.C. George, D.J. Marshall., A. Anandraj y T.P McClurg. 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). Mar. Pollut. Bull., 39(1-12): 116-121.
- Gregory, M.A., D.J. Marshall., R.C. George., A. Anandraj y T.P McClurg. 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. Mar. Pollut. Bull., 45(1-12): 114-125.
- Haynes D., J. Leeder y P. Rayment. 1997. A comparison of the bivalve species *Donax deltoides* and *Mytilus edulis* as monitors of metal exposure from effluent discharges along the Ninety Mile Beach, Victoria, Australia. Mar. Pollut. Bull., 34(5): 326-331.
- INS, 2015. Decreto 3930 de 2010. Instituto Nacional de Salud (INS). <http://www.ins.gov.co:81/normatividad/Decretos/DECRETO%203930%20DE%202010.pdf>
- INVEMAR. 2003. Validación y desarrollo de un cultivo piloto de bivalvos en Santa Marta, Caribe colombiano. Informe técnico. ECOFONDO-INVEMAR. Santa Marta, Colombia, 125 p.
- Jones, F.V., C.M. Moffit, W. Bettge, R. Garrison y A.J.J Leuterma.. 1986. Drilling fluids firms respond to EPA toxicity concerns. Oil. Gas. J., 84: 71-76.
- King, C.K., M.C. Dowse., S.L Simpson, y D.F Jolley. 2004. An assessment of five Australian polychaetes and bivalves for use in whole-sediment toxicity tests: toxicity and accumulation of copper and zinc from water and sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 47(3): 314-323.
- Labtox. 2006. Ensaio de toxicidade do fluido hydro-guard/CMC/Lordril (Claygrabber y Claysync) utilizando *Mysidopsis juniae* (Crustacea-Mysidacea). Laboratório de Análise Ambiental Ltda. Rio de Janeiro, 7 p.

- Labtox. 2011a. Ensaio ecotoxicológico como fluido de perforacao SYN-TEQ (Lote 02/2011) utilizando *Lytechinus variegatus* (Echinodermata-Echinoidea). Laboratório de Análise Ambiental Ltda. Rio de Janeiro, 7 p.
- Labtox. 2011b. Ensaio ecotoxicológico como fluido de perforacao SYN-TEQ (Lote 02/2011) utilizando *Mysidopsis juniae* (Crustacea-Mysidacea). Laboratório de Análise Ambiental Ltda. Rio de Janeiro, 6 p.
- Neff, J.M. 2005. Composition, environmental fates, and biological effect of water based drilling muds and cuttings discharged to the marine environment: A synthesis and annotated bibliography. Reported prepared for Petroleum Environmental Research Forum (PERF) and American Petroleum Institute, Duxbury, Massachusetts. 73 p.
- Neff, J.M. 2008. Estimation of bioavailability of metals from drilling mud barite. *Integ. Environ. Assess. Manage.*, 4(2): 184-193.
- Nipper, M.G y D.S. Roper. 1995. Growth of an amphipod and a bivalve in uncontaminated sediments: implications for chronic toxicity assessments. *Mar. Pollut. Bull.*, 31(4-12): 424-430.
- Paul-Pont, I., P. González., M. Baudrimont., F. Jude., N. Raymond., L. Bourrasseau., N. Le Goic., F. Haynes., A. Legeay., C. Paillard y X. De Montaudouin. 2010. Interactive effects of metal contamination and pathogenic organisms on the marine bivalve *Cerastoderma edule*. *Mar. Pollut. Bull.*, 60(4): 515-525.
- Presidencia de Colombia. 2005. Decreto 4741 para la prevención y el manejo de los residuos generados en el marco de la gestión integral.
- Quinn G.P y M.J. Keough. 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, New York, EE.UU, 537 p.
- Rajagopal, S., V.P. Venugopalan., G. Van der Velde y H.A. Jenner. 2003. Tolerance of five species of tropical marine mussels to continuous chlorination. *Mar. Environ. Res.*, 55(4): 277 – 291.
- Shin, P.K.S., F.N. Yau, S.H. Chow, K.K Tai y S.G Cheung. 2002. Responses of the green-lipped mussel *Perna viridis* (L.) to suspended solids. *Mar. Pollut. Bull.*, 45: 157-162.
- Sobral, P. y J. Widdows. 1997. Effects of copper exposure on the scope for growth of the clam *Ruditapes decussatus* from Southern Portugal. *Mar. Pollut. Bull.*, 34(12): 992-1000.
- Soto, M., M.P. Ireland e I. Marigómez. 2000. Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in “Mussel-Watch” programmes. *Sci. Total. Environ.*, 247: 175-187.
- USEPA. 1990. Dunnet program version 1.5, Probit program version 1.5 y Trimmed-Spearman Karber (TSK) program version 1.5., Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory, United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, EE.UU.
- Velasco, L.A. 2007. Energetic physiology of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus* fed with different microalgal diets. *Aquaculture*, 270: 299-311.
- Velasco, L.A. y J. Barros. 2008. Cultivo de bivalvos en Colombia: ¿utopía o apuesta de futuro? En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. 115-128.

RECIBIDO: 27/12/2013

ACEPTADO: 21/08/2015