

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DE LA FASE SUSPENDIDA
PARTICULADA DE UN LODO DE EXPLORACIÓN DE HIDROCARBUROS
OFFSHORE CON LA MICROALGA *Isochrysis galbana* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO.**

ANA XIMENA PINTA PAGUATIAN

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2014**

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD CRÓNICA DE LA FASE SUSPENDIDA
PARTICULADA DE UN LODO DE EXPLORACIÓN DE HIDROCARBUROS
OFFSHORE CON LA MICROALGA *Isochrysis galbana* EN CONDICIONES DE
LABORATORIO**

ANA XIMENA PINTA PAGUATIAN

**Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero en Producción Acuícola**

**Directora
GLORIA HELENA OSPINA SALAZAR
Bióloga M. Sc.**

**Co-directores
JUAN JOSE LOZADA CASTRO
Ph.D. Ciencias Químicas**

**MARISOL SANTOS ACEVEDO
Bióloga Cand. M. Sc.**

**Asesor estadístico
MARCO ANTONIO IMUÉS FIGUEROA
Zootecnista M. Sc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS HIDROBIOLÓGICOS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO, COLOMBIA
2014**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la Tesis de Grado, son responsabilidad exclusiva de su autor”

Artículo primero del acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

GLORIA HELENA OSPINA SALAZAR.
Directora de tesis - Invemar

JUAN JOSE LOZADA CASTRO
Co-director de tesis- Universidad de Nariño

MARISOL SANTOS ACEVEDO.
Co-director de tesis- Invemar

JULBRINNER SALAS BENAVIDES
Jurado delegado

GLORIA LUCÍA CÁRDENAS
Jurado

San Juan de Pasto, junio 11 de 2014

DEDICO A:

Dios y a las personas que hicieron todo en la vida para que pudiera lograr mi sueño, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento: Yeni Paguatian y Omar Pinta.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis sinceros agradecimientos a:

Gloria Helena Ospina Salazar	Bióloga., M. Sc. Investigadora INVEMAR
Juan José Lozada Castro	Ph.D. Ciencias Químicas. Docente departamento de Química Universidad de Nariño.
Marisol Santos Acevedo	Bióloga marina., Cand. M. Sc. Investigadora INVEMAR
Marco Antonio Imués Figueroa	Zoot., Esp., M. Sc. Docente Ing. Producción Acuícola universidad de Nariño.
Javier Gómez León	Biólogo marino. Ph.D. Investigador INVEMAR
Katherine Carreño	Bióloga marina. Auxiliar de investigación INVEMAR
Carlos Puentes	Químico. Investigador INVEMAR
Johann López Navarro	Ingeniero pesquero. Investigador INVEMAR
Miguel Sánchez	Auxiliar de investigación INVEMAR
Marlon Montero	Auxiliar de investigación INVEMAR
Camilo Lennin Guerrero	Ing. Producción Acuícola
Piedad Mejía	Secretaria Ing. Producción Acuícola UDENAR
Oscar Iván Mejía	Economista UDENAR

Y a todas las personas de la Universidad de Nariño y del Instituto de Investigaciones Marinas y costeras José Benito de Adreís-INVEMAR que aportaron al desarrollo de mi trabajo de grado.

CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 MARCO REFERENCIAL	22
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1 UBICACIÓN.....	29
4.2 INSTALACIONES	29
4.3 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD.....	30
4.3.1 Adecuaciones	30
4.3.2 Determinación de la densidad inicial óptima para los ensayos de toxicidad y sus fases de crecimiento:	36
4.4 ENSAYOS DE TOXICIDAD	38
4.4.1 Materiales, equipos, reactivos y formatos	38
4.4.2 Preparación del material.	39
4.4.3 Preparación del medio de cultivo	40
4.4.4 Preparación de los cultivos madre	40
4.4.5 Pruebas de toxicidad y elaboración de la carta control con el tóxico de referencia.....	41
4.4.6 Pruebas de toxicidad con un lodo en base agua.....	46
4.5 ANÁLISIS DE DATOS	50
4.5.1 Intensidad lumínica.....	50
4.5.2 Pruebas para la estandarización del protocolo.....	51
4.5.3 Formulación de hipótesis.....	51
4.5.4 Cálculo de la Concentración de Inhibición Media (CI_{50-72h}).....	52
4.5.5 Elaboración de la carta control.....	53
4.5.6 Fisicoquímicos	54
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS	56

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD.....	56
5.1.1 Verificación de efectividad del sistema de filtración de agua usada para los cultivos.....	56
5.1.2 Intensidad lumínica.....	57
5.1.3 Mantenimiento del cultivo de microalgas.....	58
5.1.4 Determinación de la densidad inicial óptima para los ensayos de toxicidad y sus fases de crecimiento.....	59
5.2 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD.....	63
5.2.1 Establecimiento de las condiciones generales y protocolo de los bioensayos.....	63
5.2.2 Determinación de la Concentración de Inhibición media (CI_{50-72h}) del sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia y elaboración de la carta control.....	67
5.2.3 Determinación de la concentración de inhibición media (CI_{50-72h}) de un lodo de exploración de hidrocarburos en base agua.....	78
5.2.4 Cálculo del CI_{50-72h} con el lodo en base agua.....	87
6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	90
6.1 CONCLUSIONES.....	90
6.2 RECOMENDACIONES.....	91
7 BIBLIOGRAFÍA.....	92
8 ANEXOS.....	100

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Formulación usada en el LABBIP para la preparación del medio Guillar F/2.....	33
Tabla 2. Descripción de las diferentes etapas del cultivo de <i>I. galbana</i> en el LABBIP para el desarrollo de pruebas de toxicidad.	34
Tabla 3. Ensayos de filtración del lodo, mezclado con <i>I. galbana</i> para la realización de los conteos algales en placas de Neubauer al microscopio en aumento 40x. ...	48
Tabla 4. Intensidad lumínica en las estanterías del cepario usadas para el desarrollo de los bioensayos, desviación estándar (D.E.) y coeficientes de variación.	57
Tabla 5. Monitoreo de la densidad inicial y final en las diferentes etapas del cultivo tipo <i>batch</i> de <i>I. galbana</i> en el LABBIP.....	59
Tabla 6. Densidad celular final por tratamiento para la selección del inóculo inicial en bioensayos de toxicidad.....	60
Tabla 7. Inóculos de microalgas utilizados para bioensayos de toxicidad en otros estudios.	62
Tabla 8. Condiciones generales establecidas para realizar experimentos de toxicidad a 72h con la microalga <i>Isochrysis galbana</i>	64
Tabla 9. Búsqueda de rangos o <i>screening test</i> realizados con <i>I. galbana</i> , utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia a diferentes concentraciones.	68
Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos iniciales y finales, en las pruebas de <i>screening test</i> utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.....	70
Tabla 11. Tasa específica de crecimiento (TEC) de los bioensayos definitivos, a diferentes concentraciones de sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de	

referencia. Los valores están expresados como el promedio de tres bioensayos± D.E.	71
Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos iniciales y finales promedio de las pruebas definitivas, utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.	73
Tabla 13. Carta control de <i>I. galbana</i> utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.	75
Tabla 14. Búsqueda de rangos o “ <i>screening test</i> ” realizados con <i>I. galbana</i> , utilizando un lodo de exploración <i>offshore</i> en base agua a diferentes concentraciones.	79
Tabla 15. Parámetros fisicoquímicos iniciales y finales, en las pruebas de <i>screening test</i> utilizando lodo de exploración <i>offshore</i> en base agua.	80
Tabla 16. Tasa específica de crecimiento (TEC) en los bioensayos definitivos a diferentes concentraciones de un lodo de exploración <i>offshore</i> en base agua. Los valores están expresados como el promedio de tres bioensayos± D.E.	81
Tabla 17. Valores promedio de parámetros fisicoquímicos iniciales y finales, en las pruebas definitivas utilizando un lodo de exploración <i>offshore</i> en base agua.	85
Tabla 18. Valores de CI_{50-72h} en <i>I. galbana</i> con un lodo de exploración <i>offshore</i> en base agua.	87

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Laboratorio de Bioprospección Marina - LABBIP del INVEMAR.	29
Figura 2. Cultivo de <i>Isochrysis galbana</i> en el LABBIP. Área del cepario y cultivo masivo.	30
Figura 3. Niveles seleccionados para los ensayos de toxicidad en el cepario. Los puntos rojos indican los lugares donde la intensidad lumínica fue medida.	31
Figura 4. Metodología de recuento celular con placas Neubauer en microscopio.	35
Figura 5. Cultivos madre (área cultivo masivo).	41
Figura 6. Preparación de las soluciones con sulfato de cobre penta-hidratado a diferentes concentraciones.	42
Figura 7. Protocolo para el desarrollo de ensayos de toxicidad con <i>Isochrysis galbana</i>	43
Figura 8. Proceso de homogeneización y almacenamiento del lodo puro.	46
Figura 9. Preparación de la Fase Suspendida Particulada (FSP) y concentraciones de prueba con un lodo en base agua.	50
Figura 10. Determinación de CL ₅₀ para pruebas de toxicidad con múltiples concentraciones.	54
Figura 11. Curvas y fases de crecimiento de <i>I. galbana</i> a diferentes densidades iniciales de siembra: 150.000cél.mL ⁻¹ (T1), 300.000cél.mL ⁻¹ (T2) y 500.000cél.mL ⁻¹ (T3). Los valores están reportados como el promedio de tres réplicas ± D.E.	61
Figura 12. Porcentaje de inhibición (%I) del crecimiento poblacional de <i>Isochrysis galbana</i> a diferentes concentraciones, usando sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O) como tóxico de referencia. Los valores están expresados como el promedio de tres ensayos ± D.E. La línea roja indica el 50% del %I.	72
Figura 13. Carta control para <i>I. galbana</i> utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.	76

Figura 14. Porcentaje de inhibición (%) del crecimiento poblacional de *Isochrysis galbana* a diferentes concentraciones de un lodo en base agua. Los valores están expresados como el promedio de tres ensayos \pm D.E .La línea roja indica el 50% del %l.82

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Formato para los conteos de microalgas con cámara Neubauer, durante el desarrollo de los ensayos de toxicidad.....	100
Anexo 2. Formato para la toma de parámetros fisicoquímicos, durante el desarrollo de los ensayos de toxicidad.	101
Anexo 3. Registro de la densidad algal (cel.mL^{-1}) para la fase de cultivo usado en los experimentos de toxicidad en recipientes de 500mL en el LABBBIP año 2012.	102
Anexo 4. Resultados del análisis microbiológico de agua del sistema de filtración y U.V.	103
Anexo 5. Supuestos estadísticos y análisis de varianza para intensidad lumínica (lux) y comparaciones múltiples por nivel.	104
Anexo 6. Análisis de Varianza de la Tasa Específica de Crecimiento (TEC) a tres densidades iniciales de siembra.	105
Anexo 7. Densidad celular diaria y CV% a tres densidades iniciales de siembra: T1 ($150.000\text{cel.mL}^{-1}$), T2 ($300.000\text{cel.mL}^{-1}$) y T3 ($500.000\text{cel.mL}^{-1}$).	106
Anexo 8. Protocolo para la realización de bioensayos de toxicidad con la microalga <i>galbana</i>	107
Anexo 9. Supuestos estadísticos para bioensayos con tóxico de referencia.....	106
Anexo 10. Análisis de varianza de los bioensayos definitivos son sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia, utilizando modelos lineales generalizados.	106
Anexo 11. Comparaciones Múltiples para TEC por CuSO_4 . Con método: 95% Scheffe	106
Anexo 12. Análisis de Varianza para valores de Oxígeno iniciales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.	107

Anexo 13. Análisis de Varianza para valores de Oxígeno finales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.	108
Anexo 14. Análisis de Varianza para valores de pH iniciales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.	109
Anexo 15. Análisis de Varianza para valores de pH finales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.	110
Anexo 16. Análisis de Varianza para valores de temperatura iniciales para tóxico de referencia.	111
Anexo 17. Análisis de Varianza para valores de temperatura finales para tóxico de referencia.	112
Anexo 18. Prueba de Hipótesis para Salinidad inicial-Salinidad final.	112
Anexo 19. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 1 con tóxico de referencia.	113
Anexo 20. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 2 con tóxico de referencia.	114
Anexo 21. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 3 con tóxico de referencia.	115
Anexo 22. Supuestos estadísticos para bioensayos con Lodo.	116
Anexo 23. Análisis de Varianza para bioensayos con lodo, utilizando modelos lineales generalizados.	116
Anexo 24. Comparaciones Múltiples para TEC por Lodo. Con método: 95% Scheffe.	116
Anexo 25. Análisis de Varianza para valores de oxígeno iniciales de lodo y prueba de Duncan.	117
Anexo 26. Análisis de Varianza para valores de oxígeno finales de lodo y prueba de Duncan.	118
Anexo 27. Análisis de Varianza para valores de pH iniciales de lodo y prueba de Duncan.	119
Anexo 28. Análisis de Varianza para valores de pH finales de lodo y prueba de Duncan.	120

Anexo 29. Análisis de Varianza para valores de temperatura iniciales de lodo. ...	121
Anexo 30. Análisis de Varianza para valores de temperatura finales de lodo.	122
Anexo 31. Prueba de Hipótesis para Salinidad Inicial-Salinidad Final de bioensayos definitivos con lodo.	122
Anexo 32. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 1 con lodo.	123
Anexo 33. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 2 con lodo.	124
Anexo 34. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 3 con lodo.	125
Anexo 35. Clasificación de la toxicidad de los lodos de perforación.....	126

GLOSARIO

BIOENSAYO: ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.

CARTA CONTROL: es un gráfico o tabla utilizada para monitorear cambios a través del tiempo del punto final medido para un compuesto tóxico de referencia. En el eje X se grafica la fecha del ensayo y en el eje Y la concentración tóxica efectiva. Se toman como límite de alerta dos desviaciones estándar de la media histórica de la concentración letal media.

CONTROL: es un tratamiento donde se duplican todos los factores que puedan afectar el resultado, excepto la condición que está siendo investigada (sinónimo de control negativo).

CONTROL POSITIVO: evaluación de la respuesta tóxica con una sustancia de referencia, utilizada para controlar la sensibilidad de los organismos en el momento en el cual se evalúa el material problema.

CI₅₀: concentración de Inhibición Media. Concentración del material en agua, suelo o sedimento que se estima afecta al 50% de los organismos de ensayo. La CI₅₀ y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de un análisis estadístico.

CRÓNICO: ocurre durante un periodo relativamente largo de exposición (una porción significativa de la vida del organismo (>10%).

ENSAYO DE TOXICIDAD: determinación del efecto de un material o mezcla, sobre un grupo de organismos seleccionados bajo condiciones definidas. Mide las proporciones de organismos afectados o el grado de efecto luego de la exposición a la muestra.

FLUIDO DE PERFORACIÓN A BASE DE AGUA: la fase continua y medio de suspensión de los sólidos es un líquido soluble en agua, independientemente de la presencia de petróleo.

FLUIDO O LODO DE PERFORACIÓN: fluido circulante (lodo), que se utiliza en la perforación rotatoria de pozos para limpiar y acondicionar el agujero y compensar la presión.

PROTOCOLO: es un conjunto de procedimientos explícitos descritos para un ensayo o experimento.

RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA: relación cuantitativa entre la cantidad de un tóxico administrado o tomado y la incidencia o alcance de los efectos adversos.

RÉPLICA: recipiente de ensayo, conteniendo un número especificado de organismos en una concentración/dilución de muestra definida o de agua de dilución como control.

TASA DE CRECIMIENTO: incremento en biomasa por unidad de tiempo.

TOXICIDAD CRÓNICA: efectos tóxicos a largo plazo relacionados con cambios en el metabolismo, crecimiento o capacidad de supervivencia.

TÓXICO DE REFERENCIA: compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado en pruebas de toxicidad con fines de control de calidad analítica de los organismos a utilizar en las pruebas.

RESUMEN

En los procesos de perforación costa afuera (*offshore*) para la exploración de hidrocarburos, se originan efluentes como lodos y ripio que pueden generar impactos ambientales. Considerando que el desarrollo de tecnologías en ambientes marinos para la aplicación de pruebas de toxicidad es aún limitado y que esta exploración se están llevando a cabo en nuestro país, el objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad crónica de un lodo de exploración de hidrocarburos *offshore* con la microalga *Isochrysis galbana* en condiciones de laboratorio, iniciando con la implementación de un protocolo para la realización de los bioensayos toxicológicos y al mismo tiempo determinando la toxicidad mediante el cálculo de la Concentración de Inhibición media (CI_{50-72h}). Dentro del protocolo para el mantenimiento de la especie, se estableció iniciarlos cultivos de la microalga con tubos de ensayo a una densidad promedio de $29.958 \text{cél.mL}^{-1}$ para obtener un cultivo madre con densidad $\geq 1 \times 10^7 \text{cél.mL}^{-1}$, garantizando una fase exponencial de crecimiento y suficiente cantidad de muestra para los bioensayos. Adicionalmente se estableció una densidad óptima inicial de siembra de $500.000 \text{cél.mL}^{-1}$ para cada réplica en los bioensayos y un coeficiente de variación (CV%) no mayor al 5% entre tratamientos y $\leq 15\%$ entre réplicas. Para observar la adecuada respuesta de las microalgas a los efectos del lodo, los cultivos fueron utilizados en fase exponencial de crecimiento, bajo condiciones óptimas de nutrientes, luminiscencia ($1.444 \pm 8,36 \text{lux}$), temperatura ($21-23,5^\circ\text{C}$), salinidades 35,13 a 35,37 UPS, oxígeno inicial $>6,5 \text{mg.L}^{-1}$ y pH inicial de 7,43-7,93, por un período de 72h en el que se calculó el porcentaje de inhibición (%I). Se utilizó sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como tóxico de referencia llevando a cabo pruebas preliminares de detección o “*screening test*” y tres bioensayos definitivos, obteniendo un set de seis concentraciones en las cuales se presentaron %I entre 0 y 100% (30, 50, 70, 80, 90 y $120 \text{mg.L}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). En la carta control se determinó la CI_{50-72h} promedio en 58mg.L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, con un límite inferior de $51,81 \text{mg.L}^{-1}$ y superior de $65,06 \text{mg.L}^{-1}$. Al estimar la toxicidad crónica de la fase suspendida particulada del lodo, se establecieron cinco concentraciones que presentaron %I entre 0 y 100% para evaluarse en tres bioensayos definitivos (350.000, 400.000, 450.000, 500.000 y 600.000mg.L^{-1}), estableciendo una CI_{50-72h} promedio de 432.900mg.L^{-1} lodo.

Palabras clave: Toxicidad, *Isochrysis galbana*, lodos de perforación, concentración de inhibición media, CI_{50-72h} .

ABSTRACT

In the process of offshore drilling (*offshore*) for hydrocarbon exploration, effluents and sludge and rubble that can generate environmental impacts originate. Whereas the development of technologies in marine environments for the application of toxicity testing is still limited and that these scanning processes are taking place in our country, the objective of this study was to evaluate the chronic toxicity of a drilling mud for offshore exploration with the microalgae *Isochrysis galbana* in laboratory conditions, starting with a protocol implementation to develop toxicological tests, establishing the medium inhibition concentration (IC_{50-72h}). Within the protocol for the maintenance of the species, was established to initiate cultures of microalgae with test tubes at an average density of $29.958 \text{ cé.l.mL}^{-1}$ for stem density culture with $\geq 1 \times 10^7 \text{ cé.l.mL}^{-1}$, ensuring a phase exponential growth and sufficient sample for testing. Additionally an initial optimum planting density for each $500.000 \text{ cé.l.mL}^{-1}$ replication in trials and a coefficient of variation (CV %) of no more than 5% between treatments and $\leq 15\%$ between replicates was established. To observe the proper response of microalgae to the effects of mud, crops were used in exponential growth phase under optimal nutrient conditions and luminescence ($1.444 \pm 8,36 \text{ lux}$), temperature (21 to 23.5° C), salinity 35, from 35,13 to 35,37 UPS, initial oxygen $> 6.5 \text{ mg.L}^{-1}$ and initial pH of 7.43 to 7.93, for a period of 72h by calculating the percent inhibition (% I). Sulfate penta – hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) as a reference toxicant copper was used carrying out preliminary tests or " screening test" and three definitive bioassays, obtaining a set of six concentrations in which presented % I between 0 and 100 % (30 , 50, 70 , 80, 90 and $120 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) . In the Control menu - 72h average IC_{50} was determined $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 58 mg.L^{-1} , with a lower limit of 51.81 mg.L^{-1} and above of 65.06 mg.L^{-1} . When estimating the chronic toxicity of the sludge suspended particulate phase , presenting five concentrations between 0 % and 100% for final three bioassays assessed (350,000 , 400,000 , 450,000 , 500,000 and $600.000 \text{ mg.L}^{-1}$) is established by setting $IC_{50} - 72h$ $432.900 \text{ mg.L}^{-1}$ average mud.

Keywords: Toxicity, *Isochrysis galbana*, drilling muds, mean inhibition concentration, $IC_{50} - 72h$.

1. INTRODUCCIÓN

Zamora¹ afirma que Colombia es uno de los países líderes en la producción de petróleo crudo en Suramérica, donde actualmente ocupa el tercer puesto. El sector de los hidrocarburos ha generado un elevado plan de inversiones en exploración y producción que al mismo tiempo se enfoca en incrementar su presencia en el Caribe colombiano con recientes contratos de exploración fuera de la plataforma continental comúnmente conocido con el término “*offshore*”. En este contexto, “el país tiene grandes oportunidades petroleras en el mar, lo que genera para este tipo de entidades y para la economía Nacional, la necesidad de implementar con prontitud esta nueva tecnología de exploración, considerando la posición clave en el continente”².

“Como resultado de la realización de perforaciones de prueba, tanto el lodo como el ripio de perforación utilizados, son descargados al mar e introducen hidrocarburos y otros contaminantes a la columna de agua”³. En este sentido, Zanuzzi *et al.*⁴ indican que la liberación de sustancias tóxicas en los ecosistemas acuáticos producen una gran variedad de respuestas complejas en los organismos como adicción, inhibición, bioacumulación y biomagnificación, afectando a las poblaciones o comunidades existentes; adicionalmente, al recibir el agua una diversidad de agentes químicos, es difícil determinar a través de los análisis fisicoquímicos rutinarios las fracciones de esas sustancias que están disponibles para ejercer un efecto tóxico en los organismos. Es por esto que en la actualidad, organizaciones como la Agencia de Protección Ambiental conocida por sus siglas en inglés como la E.P.A.⁵, implementan ensayos de toxicidad como métodos alternativos y complementarios para la caracterización de las aguas, en donde se realizan bioensayos con diferentes organismos de la cadena trófica, como una herramienta técnica para el control y monitoreo de la contaminación ambiental, en programas de reducción de la toxicidad de efluentes industriales y en evaluación de la toxicidad de productos puros, entre otros. Con esto, se puede valorar si el efecto de la mezcla de contaminantes con el agua o su presencia en el sedimento, es capaz de causar mortalidad en un organismo de prueba sensible a partir de la determinación de la concentración letal, mediante la exposición a una serie de

¹ZAMORA. Colombia, tercer país latinoamericano en la producción de petróleo. [En línea]. Medellín (Colombia). Radio Múnera.2012 ZAMORA, A. Dirección agencia nacional de Hidrocarburos.2011-[Citado 4 agosto de 2012]. Disponible en internet: http://www.radiomunera.com/contenidos/contenidos/colombia_tercer_pais_latinoamericano_en_la_produccion_de_petroleo.php.

²Carta Petrolera. [En línea]. Ed.109.Colombia.Julio – agosto 2010- [Citado 27 Julio 2012].Disponible en internet: http://www.ecopetrol.com.co/especiales/carta_petrolera108/rev_exploracion.htm

³UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S., Environmental Protection Agency, Cincinnati,1994. 315 p.

⁴ZANUZZI, A.; PIEROTTO, M. y PROSPERI, C. Laboratorio de Hidrobiología.2 ed. Fac. CEF y N. Universidad Nacional de Córdoba, Colombia, 2005. p.219

⁵ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.Air Pollution Control Cost Manual. Office of Air Quality Planning and Standard [online]. Vol. 2, 2002.[Cited 23 July 2012].Section 4 Chapter 2. Available in internet: <http://www.epa.gov/ttn/catc/dir1/cs4-2ch2.pdf>

diluciones de la muestra, logrando estimar así el riesgo potencial de los contaminantes en las comunidades acuáticas. “En el caso particular de las microalgas, el interés en obtener datos a partir de la realización de bioensayos, es que estos organismos integran un grupo de esencial importancia, ya que constituyen la base de las redes tróficas como productores primarios, siendo un grupo clave desde el punto de vista funcional.⁶”

En las últimas dos décadas, de acuerdo con la Organización para la Cooperación Económica u O.E.C.D.⁷ por sus siglas en inglés, se han desarrollado protocolos internacionales estandarizados que cubren las exigencias científicas y prácticas para realizar ensayos de toxicidad con diferentes tipos de organismos marinos como peces, erizos, misidáceos y microalgas. En cuanto a este último grupo, son pocos los géneros con los cuales se han desarrollado protocolos de toxicidad, entre ellos están *Selenastrum*, *Thalassiosira* y *Skeletonema*, utilizados rutinariamente por agencias de protección ambiental en países como Estados Unidos, Canadá, Francia y Alemania y que son requeridos legalmente por la Comunidad Europea; sin embargo es importante ampliar el espectro de especies y por ello se consideró la microalga *I. galbana*, ya que es una especie comúnmente utilizada en cultivo y ha sido usada para evaluar metales pesados en algunos estudios, con buenos resultados. Ello, teniendo en cuenta que la E.P.A.⁸ sugiere que algunas especies pueden ser más sensibles que las especies recomendadas en sus manuales.

Considerando que en Colombia es muy escasa la información relacionada con ensayos de toxicidad en especies marinas, en esta investigación se evaluó la toxicidad crónica de un lodo de exploración de hidrocarburos, como aporte al conocimiento de algunos efectos que estos efluentes puedan causar en el crecimiento poblacional de la microalga *I. galbana*.

⁶ZANUZZI, Op. cit., p. 299.

⁷ORGANIZATION FOR ECONOMIC DEVELOPMENT. Alga growth inhibition test: Test Guideline. En: Guidelines for Testing of Chemicals. June, 1984. No. 201, p. 2-14

⁸UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed. Op cit., p. 21

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un lodo de perforación usado en la exploración de hidrocarburos en la microalga marina *Isochrysis galbana* por medio de un estimador de crecimiento poblacional específico para cuantificar la respuesta de toxicidad (CI_{50-72h}).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar las técnicas de manejo de *I. galbana* en condiciones controladas de laboratorio para el desarrollo de las pruebas de toxicidad.
- Determinar la concentración de inhibición media a 72h (CI_{50-72h}) del sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO₄.5H₂O) como tóxico de referencia sobre el crecimiento poblacional de la microalga *I. galbana*.
- Determinar la concentración de inhibición media a 72h (CI_{50-72h}) de un fluido de exploración de hidrocarburos, sobre el crecimiento poblacional de la microalga *I. galbana*.

3. MARCO REFERENCIAL

Actualmente los hidrocarburos fósiles son la fuente de energía más usada por el hombre, sin embargo su producción no es ilimitada, de manera simultánea la población mundial aumenta y la demanda de energía también, llegando al punto en que difícilmente se puede cubrir. Consecuentemente, se tuvieron que desarrollar y adaptar las tecnologías necesarias para explorar, perforar y producir dichos hidrocarburos en nuevas zonas, originándose así la explotación costa afuera u “*offshore*”⁹. En términos generales, la perforación de un pozo petrolero empieza cuando se hinca una tubería que evita que el agua se filtre a su interior, luego la mecha es bajada hasta el fondo marino, ésta puede componerse de varios materiales principalmente acero o tungsteno con pequeños diamantes industriales, la cual es conectada a una tubería de perforación que se hace rotar desde la plataforma. La perforación del hoyo puede durar semanas o meses, a medida que se hace rotar la mecha es necesario hacer circular un fluido de perforación que sale por unos inyectores, usualmente éstos son diseñados de acuerdo a las características de la formación, pero existen tres grupos: base agua, base aceite y base sintética. Además de estabilizar el hoyo y reducir la fricción, el fluido de perforación se encarga de transportar los ripios desde el hoyo hasta la plataforma donde luego de ser tratado, es recirculado¹⁰.

De acuerdo con Doir¹¹, el método de perforación más moderno es el sistema de rotación, en el cual se requiere de una circulación de lodos a través del pozo mientras éste avanza. Los lodos se bombean desde la superficie a través de una tubería que llega hasta el fondo del agujero y regresan a través del espacio anular que queda entre el agujero y la tubería. El lodo suele ser una mezcla de agua, arcilla, material de cimentación y variedad de productos químicos que permiten ajustar sus propiedades para satisfacer las necesidades de cada pozo y es un factor importante en el éxito del programa de perforación. Se utiliza en las operaciones *offshore* y terrestres y sirve para eliminar los cortes desde el fondo del agujero y llevarlos a la superficie, transmitir potencia hidráulica a la broca, enfriar y lubricar la cadena de taladro y la broca, ejercer una presión hidrostática suficiente para controlar los fluidos y la presión, reducir al mínimo la puesta en solución de los cortes cuando la circulación se detiene temporalmente, debe tener propiedades que le permitan a los cortes asentarse en la superficie del sistema para apoyar y proteger las paredes del agujero y reducir al mínimo los daños a las formaciones penetradas.

Si bien, los fluidos o lodos son esenciales para perforar con éxito un pozo de petróleo, también pueden convertirse en uno de los aspectos más

⁹Soluciones submarinas. [en línea]. España, Schlumberger, 2007-[Citado 3 Agosto 2012]. Disponible en internet: http://www.slb.com/media/services/resources/oilfieldreview/spanish00/win00/p2_19.pdf

¹⁰Ibid., p. 2.

¹¹DOIR. Petroleum Guidelines. Drilling Fluids Managements. Australia, Department of Industry and Resources. Environment Division. Government of Western Australia. 2006. 56 p.

complicados de una operación. Los detritos que se extraen se desechan, al igual que todo fluido o lodo que quede impregnado en ellos y aunque el daño provocado al medio ambiente en el lugar del pozo es relativamente pequeño y se limita a los alrededores de la operación, el impacto ambiental en las zonas próximas a la plataforma puede ser muy grande. El nivel de daño que los lodos producen en el medio ambiente depende del tipo que se use y de las condiciones medio ambientales predominantes; mar adentro, el lodo a base de agua es por lo general el que menos daño ocasiona si se lo compara con el lodo a base de petróleo. Para pronosticar su impacto en el medio ambiente, se utilizan las pruebas de toxicidad, los resultados de estos experimentos sirven para estimar la cantidad máxima de material que se puede desecharse sin que produzca un efecto directo y tóxico en el medio ambiente¹².

Las pruebas o bioensayos de toxicidad son experimentos que permiten evaluar el grado de toxicidad de una sustancia química, un efluente o cuerpo de agua entre otros, empleando organismos vivos y pueden ser de dos tipos: agudas o crónicas. Dentro de ellas encontramos las pruebas estáticas sin renovación, donde los organismos de ensayo se exponen a la misma solución a evaluar durante toda la realización de la prueba y pruebas estáticas con renovación, donde se exponen a una solución recién preparada de la misma concentración de muestra cada 24h u otro intervalo prescrito, ya sea mediante la transferencia de los organismos de una cámara de ensayo a otra o mediante la sustitución parcial o total de la solución en las cámaras de ensayo. La selección del tipo de prueba dependerá de los objetivos, recursos disponibles, requisitos de los organismos de prueba y las características de los efluentes¹³.

Dependiendo de los objetivos que se tengan en cada ensayo, la E.P.A.¹⁴ recomienda la forma en la cual estas pruebas pueden expresarse, ya sea en términos de concentración efectiva (CE), letal (CL) o de inhibición (CI), que causen un efecto en un porcentaje establecido de la población; por ejemplo el CI_{50} es la concentración de una sustancia que podría causar la inhibición del 50% en el crecimiento de la población de prueba. Otra manera de expresarlo es a través del NOEC o concentración a la cual no se observa un efecto y el LOEC que corresponde a la concentración más baja que cause efectos adversos a los organismos de prueba.

“Los bioensayos ecotoxicológicos son complementarios a los resultados de los parámetros fisicoquímicos y son utilizados en el monitoreo y control de las perturbaciones del ambiente acuático, además se pueden emplear como indicadores para designar puntos clave o “*hot spots*” durante un programa de monitoreo ambiental”¹⁵. “La selección de las especies de prueba está determinada

¹²Ibid., p. 19.

¹³ZANUZZI, Op. cit., p. 299.

¹⁴UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed. Op. cit., p.37.

¹⁵Ibid., p. 22.

por su relevancia, prevalencia, accesibilidad, relación costo-eficacia y facilidad de mantenimiento, observación y cuantificación¹⁶ y los principales criterios de valoración para determinar las respuestas de los organismos incluyen mortalidad, supervivencia, fertilización y crecimiento¹⁷.

Cuando no se tiene conocimiento de la toxicidad de las muestras se debe realizar una búsqueda de intervalos de toxicidad también conocida como “*screening test*”, se recomienda realizar pruebas preliminares empleando un amplio número de concentraciones sin réplicas, haciendo diluciones logarítmicas (p. ej.: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 y 100mg.L-1) y/o geométricas, con un factor de dilución no menor de 0.5, lo que permite cubrir un amplio intervalo de dilución, (p. ej.: 100; 50; 25; 12,5; 6,25, etc.)¹⁸. Las pruebas consisten en establecer una escala descendente de por lo menos cinco concentraciones y un tratamiento control, en donde se establezca una curva dosis-respuesta de los organismos distribuida entre 0 y 100% de la variable respuesta que se esté midiendo¹⁹.

De acuerdo con Castillo²⁰, en los bioensayos de toxicidad también se hace necesaria la utilización de un tóxico de referencia, que es un compuesto químico orgánico o inorgánico utilizado con fines de control de los organismos a utilizar en las pruebas. Para ello, en la etapa inicial del montaje de un método de prueba debe seleccionarse un compuesto con disponibilidad en el mercado, pureza consistente, solubilidad y estabilidad en agua, a la cual se le realicen pruebas de toxicidad para una especie determinada, con el fin de establecer el intervalo de concentración que produce el efecto esperado, definiendo el patrón de relación dosis-respuesta para el compuesto elegido. Posteriormente a partir de estas pruebas, se elabora una carta control que es la herramienta de registro que brinda los elementos de juicio para establecer los intervalos aceptables de variación de la respuesta de los organismos de prueba al tóxico de referencia y se genera a partir de los resultados de pruebas sucesivas, para las cuales se obtiene el valor de la concentración de efecto medio (CE₅₀, CL₅₀ o CI₅₀), utilizando cualquiera de las técnicas estadísticas recomendadas con un margen de confianza del 95%; el registro histórico es el medio de referencia para evidenciar el control de la sensibilidad de la especie empleada, la estabilidad de la respuesta biológica y la repetitividad (exactitud) de los resultados obtenidos.

¹⁶JIANGNING, C. et al. Ecotoxicological evaluation of 4-aminobiphenyl using a test battery. En: Ecotoxicology Environmental Safety. Mayo, 2004. Vol. 58, p. 104-109

¹⁷UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.40

¹⁸ CASTILLO. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México, IMTA, 2004.

¹⁹UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.188

²⁰ CASTILLO. Op. cit., p. 127

Al desarrollar pruebas de toxicidad, para una muestra problema, se recomienda realizar dos controles: uno negativo y otro positivo. En el primero, los organismos se desarrollan por el mismo periodo de tiempo, en condiciones iguales a los ensayos pero sin tóxico en la solución de prueba, mientras que el segundo corresponde a una solución de concentración conocida del tóxico de referencia cuyo efecto esté bien establecido²¹.

Los efectos tóxicos en algas han sido estudiados por algunos investigadores²² durante las últimas décadas, sin embargo, la mayoría de los ensayos se centran en las respuestas tóxicas a metales pesados, demostrando que éstos tienen influencia directa y negativa en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos. Stauber y Davies²³ establecieron que las bacterias y algas unicelulares en particular, son muy sensibles a los compuestos tóxicos. De acuerdo con Lewis²⁴, Alayo y Lannacone²⁵ y Gorbiet *al.*²⁶, para la selección de una microalga como herramienta ecotoxicológica deben conjugarse tanto aspectos biológicos como funcionales en laboratorio, las ventajas relativas del uso de una especie en particular dependen del cultivo, crecimiento, manipulación, sensibilidad y abundancia en la naturaleza.

²¹ Ibid. p.49

²² BARÓN, M., ARELLANO, J. and LÓPEZ, G. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plant.* [online]. Vol.94. no.1. April 2006 [cited 3 september 2012]. Available from internet: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00799.x/abstract>

²² THOMAS, W.H. and SEIBERT, D.L.R. Effects of copper on the dominance and the diversity of algae: controlled ecosystem pollution experiment. *En: Bulletin of Marine Science.* 1977. Vol.27,no. 1, p.24.

²² SUNDA, W.G. and LEWIS, J.A.M. Effects of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *En: Limnology Oceanography.* 1978.No. 23, p.874.

²² CANTERFORD, G.S. and CANTERFORD, D.R. Toxicity of heavy metals to the marine diatom. *En: Ditylum Bright wellie*(West) Grunow: correlation between toxicity and metal speciation. 1980. Vol. 60, p. 227.

²² PETERSON, R. Influence of Cu and Zn on the growth of a freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda*: the significance of chemical speciation. *En: Environmental Science Technology.* 1982.vol. 16, no. 8, p. 442-447.

²² BRAND, L.E., SUNDA, W.G and GUILLARD R.R.L. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. *En: Limnology and Oceanography.* 1983. No.28, p. 42-43

²² RACHLIN, J.W. and GROSSO, A. The growth of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. *En: Environmental Contamination Toxicology.* 1993. No. 24, p. 16-20

²² MACFIE, S.M. and TARMOHAMED, Y. Effects of cadmium, cobalt and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. *En: Environmental Contamination Toxicology.* 1994. No. 5, pp. 454-458.

²² OKAY, O.S., DONKIN, P., PETERS, L.D. and LIVINGSTONE, D.R. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *En: Environmental Pollution.* 2000.No.110. p. 103.

²³ STAUBER, J.L. AND DAVIES, C.M. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *En: Environmental Reviews.* 2000.No.8, p. 255-301.

²⁴ LEWIS, M.A. Freshwater primary producers. *En: Handbook of Ecotoxicology.* U.K., Blackwell Scientific Publ., 1993, p. 28-51.

²⁵ ALAYO, M. IANNAONE, J. y ARRASCUE, A. La microalga marina *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, como bioensayo alternativo para la evaluación del cromo. *En: Ecología Aplicada.* 2000. Vol. 4, no. 2, p. 69-75.

²⁶ GORBI, G.; CORRADI, M.G.; INVIDIA, M. and BASSI, M. Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *En: Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2001. No. 48, p. 36-42.

Vadas²⁷; Shaw y Chadwick²⁸; Okayet *et al.*²⁹, Landis y Yu³⁰ y Canterford y Canterford³¹ afirman que el fitoplancton representa los productores primarios base de la cadena trófica los cuales pueden ser absorbidos por los consumidores primarios, creando una red de alimentación para todos los organismos del nivel trófico como lo son el zooplancton, peces o invertebrados; es por ello que la productividad de las aguas marino-costeras es altamente dependiente de éstos.

La microalga marina *Isochrysis galbana* es una especie unicelular fitoflagelada que se caracteriza por presentar un ciclo de vida cercano a las 30h, su diámetro promedio es de 10µm y se cultiva a una temperatura alrededor de los 20°C. Es rica en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son de gran valor nutricional para estadios larvarios y juveniles de moluscos, crustáceos y peces. Está catalogada entre las mejores especies cultivables con fines de acuicultura debido a su tamaño, valor nutricional, facilidad de cultivo y ausencia de efectos negativos asociados, como toxicidad³²

De acuerdo con Parke³³, su clasificación taxonómica es:

Reino: Plantae
Filo: Haptophyta
Clase: Prymnesiophyceae
Orden: Isochrysidales
Familia: Isochrysidaceae
Género: *Isochrysis*
Especie: *Isochrysis galbana*

“La producción de microalgas depende de varios parámetros fisicoquímicos, entre los principales están: tipo y concentración de nutrientes, temperatura, pH, salinidad e intensidad lumínica”³⁴. “El efecto independiente y combinado de estos factores varía de acuerdo a la especie y sus rangos de tolerancia”³⁵, así como

²⁷VADAS, R.L. Food web patterns in ecosystems: a reply to Fretwell and Oksanen.vol 56.Oikos, 1989. pp. 339–343.

²⁸SHAW, IC. Y CHADWICK, J. Principios de toxicología ambiental. 8 ed. Londres, Taylor and Francis,1998. pp. 47-65.

²⁹OKAY, O.S. Op. cit., pp.103-113.

³⁰LANDIS, W.G.and YU, M.H. Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems.2 ed. Boca Ratón, Lewis Publishers, 1995, pp. 48–51.

³¹CANTERFORD, G.S. and CANTERFORD, D.R. Op. cit., pp. 227-242.

³²MORETTI,A.,*et al.* Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Rome, FAO,1999.194 p.

³³PARKE, M. Estudios sobre flagelados marinos. Revista de la Asociación de Biología Marina del Reino Unido. Vol. 28.Reino Unido, 1949. pp. 255-288.

³⁴PANIAGUA *et al.* Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe OC-89-01. México, CICESE,1989.

LAVENS,P. Y SORGELOOS. Manual of the production and use of live food for aquaculture., Rome, Italy, FAO Technical paper 361, 1996. 295 p.

³⁵ LOBBAN, C.S., P.J. HARRISON Y M.J. DUNCAN. The physiological ecology of seaweeds. New York, Cambridge University Press, 1985. 200 p.

también de las condiciones específicas de las zonas donde las microalgas son cultivadas tal como lo afirma Brown *et al*³⁶.

En lo que respecta a la toxicidad de fluidos de perforación utilizando microalgas, específicamente *I.galbana*, las especies más ampliamente utilizadas para estas pruebas y únicamente con evaluación de metales pesados, en agua dulce son: *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus* y *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa* y *Anabaena flosaquae* y la diatomea, *Navicula pelliculosa*. En agua salada, las especies más ampliamente utilizadas son: *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta* y *Phaeodactylum tricornutum* de las cuales, *S. costatum* se reporta para el Caribe Colombiano³⁷, por lo cual utilizando parte de la metodología ya establecida en este estudio, podría usarse en bioensayos posteriores de toxicidad con el propósito de lograr un mayor aporte hacia los impactos que causan los lodos de perforación.

Específicamente en *I.galbana*, las investigaciones con lodos de perforación en base agua son muy escasas, encontrándose únicamente un estudio en Australia occidental, realizado por Cobby³⁸, donde fue usada como organismo de prueba en una evaluación a 96h para un fluido de perforación sintético, en el que afirma que la CE₅₀ fue de 242,42mg.L⁻¹, siendo no tóxico de acuerdo con las normativas establecidas en la zona mencionada.

Los pocos resultados encontrados permiten determinar que se hace necesario conocer las características de toxicidad de los fluidos de perforación y la influencia o impactos en las comunidades marinas, específicamente *I. galbana*, dado que “los resultados de éstos bioensayos o pruebas dependen de la ubicación de la actividad de perforación, la naturaleza y sensibilidad del medio receptor, hecho que obliga al diseño de investigaciones basadas en pruebas toxicológicas, orientadas al conocimiento de información que permita dilucidar los posibles efectos de los fluidos en la biota y, por lo tanto, una base sobre la cual evaluar su aceptabilidad medioambiental”³⁹.

“En los ensayos de toxicidad con microalgas, los intentos de estandarizar las pruebas con fines de regulación han puesto de manifiesto una serie de problemas metodológicos, donde comparaciones realizadas entre diferentes laboratorios demuestran que, hasta la fecha, la mayoría de los procedimientos de ensayo de

³⁶ BROWN, M., S. JEFFREY, J. Y G. DUNSTAN. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, Australia, Elsevier, 1997. pp. 315-331.

³⁷ LOZANO-DUQUE, Y.; VIDAL, L.; NAVAS, R. Listado de diatomeas (bacillariophyta) registradas para el mar caribe colombiano. *En: Bol. Invest. Mar. Cost.* 2010. Vol. 39. No. 1. p. 83-116

³⁸ COBBY, G.L. Changes to the Environmental Management of Produced Formation Water Offshore Australia. Australian Petroleum Production and Exploration Limited [online]. 2002 [Cited 14, September, 2012]. Available from internet: <http://dmp.wa.gov.au/documents/EnvMgmtFormationWaterGuideline.pdf>

³⁹ Petroleum Guidelines Drilling Fluids Management. [online]. Australia. Government of western Australia, Department of Mines and Petroleum. 2002- [Cited 20 September, 2012]. Available from internet: <http://www.dmp.wa.gov.au/documents/ENV-PEB-188.pdf>

uso común no revelan resultados comparables”⁴⁰. “Varios protocolos para las pruebas de toxicidad con microalgas de agua dulce ya están establecidos, pero son pocos los que se pueden describir como "estándar" de microalgas marinas, aunque las directrices han sido publicadas y algunas especies marinas se han recomendado como cepas de prueba”⁴¹; la mayoría de autores como Moreno-Garrido *et al.*⁴², Stauber y Davies⁴³ y Franklin *et al.*⁴⁴ concluyen que la concentración de tóxico que afecta el crecimiento de las microalgas es variable y depende de las especies utilizadas, la densidad celular y la composición del medio de cultivo, lo que provoca grandes diferencias en los resultados y no permite la comparación fiable de los datos obtenidos en diferentes trabajos. En este sentido Luoma y Rainbow⁴⁵, establecieron que el efecto de la toxicidad no es sólo una función de la exposición a los contaminantes, sino también del cultivo biológico interno.

⁴⁰NYHOLM, N. and KÄLLQVIST, T. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. En: Environmental Toxicology Chemical. Agosto, 1989. No. 8, p. 689-703.

⁴¹WALSH, G.E. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. En: Environmental Toxicology Chemical. 1988. Vol. 7, p. 979- 987.

⁴²MORENO, I., LUBIÁN, L.M. and SOARES, A.M.V.M. Influence of cellular density in determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. En: Ecotoxicology Environmental safety. 2000. No. 47, p. 112-116.

⁴³STAUBER, J.L. and DAVIES, C.M. *Op.cit.*, p. 255-301.

⁴⁴FRANKLIN, N.M., STAUBER, J.L., APTE, S.C. AND LIM, R.P. Effect of initial cell density of the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. En: Environmental Toxicology Chemical. 2002. No. 21, p. 742-751

⁴⁵LUOMA, S.N. and RAINBOW, P.S. ¿Why is metal bioaccumulation so variable?: Biodynamics as an unifying concept. En: Environmental Science Technology. 2005. Vol. 39, no. 7, pp. 1921-1927.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN

El presente estudio se desarrolló en un periodo de 1 año y 6 meses, en el Laboratorio de Bioprospección Marina - LABBIP del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives De Andrés” – INVEMAR (Figura 1), “ubicado en el cerro de punta Betín, Santa Marta, Colombia a 11°15’2,15” Norte y 74°13’13,95” Oeste”.⁴⁶ (Figura 1)

Figura 1. Laboratorio de Bioprospección Marina - LABBIP del INVEMAR.



Fuente: SANTOS-ACEVEDO M. *et al.* Contribución a la biología y mantenimiento de peces marinos ornamentales: Usos potenciales de la biodiversidad. Serie de publicaciones generales del Invemar No. 47.

4.2 INSTALACIONES

Este trabajo se llevó a cabo en las áreas establecidas en el LABBIP para el cultivo de microalgas denominadas cepario y cultivo masivo. En el cepario se realizaron las pruebas de toxicidad, es un espacio de 4m² donde se trabajó el stock primario de algas en pequeños volúmenes, en recipientes de vidrio que van de 10 a 500mL, en dos estanterías de varios niveles con lámparas de luz fría de 30W para la iluminación (Figura 2).

La zona de cultivo masivo es un espacio de 5m², donde se realizó el mantenimiento de los cultivos primarios de los cuales se tomaron las microalgas

⁴⁶Google Earth. 2012- [Citado Septiembre 20 de 2012]. Disponible en internet: <https://maps.google.com/maps?ie=UTF8&cid=17006282922475028742&q=Instituto+de+Investigaciones+Marinas+y+Costeras+%22Jose+Benito+Vives+de+Andreis%22&iwloc=A&gl=CO&hl=es>

para el desarrollo de los bioensayos, en adelante denominados cultivos madre, los cuales se cultivaron en recipientes de 1L. Cada nivel se conformó por dos a cuatro lámparas de luz fría de 30W y aeración proveniente de un blower Baldor de 5HP, distribuida en tuberías a presión de PVC de ½”, de donde se derivaron los puntos para cada recipiente, regulados por una pequeña válvula conectadas a mangueras y pitillos que fueron los que finalmente entraron en contacto directo con el cultivo de microalgas (Figura 2).

Figura 2. Cultivo de *Isochrysis galbana* en el LABBIP. Área del cepario y cultivo masivo.



4.3 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD.

4.3.1 Adecuaciones

4.3.1.1 **Verificación de la efectividad del sistema de filtración de agua usada para los cultivos:** Con el fin de evaluar la eficacia de la lámpara U.V. localizada e instalada en el sistema de filtración de agua del área de cultivo masivo de microalgas, se enviaron al laboratorio de calidad ambiental marina del INVEMAR (CAM), muestras de agua que pasan por los filtros de cartucho (uno de 5 μ m y otro de 1 μ m) y la lámpara U.V. a tres diferentes flujos: bajo (50,13L.seg⁻¹), medio (9,58L.seg⁻¹) y alto (4,53L.seg⁻¹) para determinar la presencia de *Vibrio sp.*, aerobios mesófilos, coliformes totales y *Escherichia coli* mediante filtración por membrana.

- 4.3.1.2 **Intensidad lumínica:** Se midió la intensidad lumínica en las estanterías del cepario con un luxómetro SperCientific® con el propósito de asegurar condiciones iguales de luminosidad, en los niveles de la estantería disponible, escogiendo tres puntos de medición constantes en cada nivel: dos en los extremos y un punto medio(Figura 3).

Figura 3. Niveles seleccionados para los ensayos de toxicidad en el cepario. Los puntos rojos indican los lugares donde la intensidad lumínica fue medida.



- 4.3.1.3 **Temperatura:** Con el propósito de que las muestras para los diferentes bioensayos se encontraran en el rango de temperatura establecido en el LABBIP (20-24°C), ésta se controló con aire acondicionado de 9.000 BTU programado a 16°C en el día y 18°C en la noche y al cual realizó un mantenimiento semanal para evitar posibles fallas.

4.3.1.4 **Mantenimiento del cultivo de microalgas:** “El cultivo de *Isochrysis galbana* en el LABBIP se realiza en lotes o “*batch*”, en recipientes de diferentes volúmenes que son cosechados totalmente cuando se acercan a su máxima densidad (cél.mL⁻¹) para posteriormente ser usados como inóculos de volúmenes mayores”⁴⁷. De acuerdo con Velasco *et al*⁴⁸, la inoculación es la siembra o transferencia de un pequeño volumen de cultivo de microalgas, a un medio de mayor volumen para dar inicio a uno nuevo. Se usaron únicamente cultivos sanos teniendo en cuenta:

- Alta densidad
- Crecimiento en fase exponencial
- No tener espuma
- No presentar precipitado
- No estar contaminado por otras especies
- Células intactas, de tamaño homogéneo que no deben estar agrupadas.

Para el cultivo de *I. galbana*, se realizó una modificación a la metodología del LABBIP⁴⁹, que consistió en sustituir el medio de crecimiento para el cultivo de *I. galbana* usado en el cepario, por la formulación F/2 de Guillard⁵⁰ con reactivos analíticos (Tabla 1) esto con el fin de obtener cultivos más puros y libres de ciliados. Para el cultivo masivo se utilizó el medio comercial Kent Marine Pro-Culture® conformado por las soluciones A y B como se encontraba establecido en el laboratorio. En la Tabla 2 se especifican los detalles de manejo para cada fase.

Posterior a estas modificaciones, se seleccionaron tres lotes diferentes de microalgas en todo el periodo de estudio y se realizó un registro por triplicado de la densidad inicial y final en cada etapa de cultivo, muestreando un tubo o frasco de cada etapa seleccionado al azar, para conocer el incremento celular y su variación entre réplicas, de manera que sea posible establecer la densidad celular de la cual partir para obtener un cultivo madre óptimo para las pruebas de toxicidad.

⁴⁷OSPINA, G. H. *et al.* Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. 2 ed. Santa Marta, Colombia, Publicaciones Invermar, 2011. p. 45.

⁴⁸VELASCO, L.A., S. CARRERA Y J. BARROS. Producción de microalgas como alimento para pectínidos. En: Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Santa Marta, Editorial Unimagdalena, 2008. pp. 31-63

⁴⁹OSPINA-SALAZAR, G.H. *et al.* Op. cit., p. 45.

⁵⁰GUILLARD, R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, En: P.B. Smith Culture of Marine Invertebrates. New York, Plenum Press, 1975. 60 p.

Tabla 1. Formulación usada en el LABBIP para la preparación del medio Guillar F/2.

	INGREDIENTES	FÓRMULA	Cantidad (g)	Preparación
1. Nutrientes mayores				
1. Solución secundaria				
1.1.	Nitrato de sodio granulado y refinado	NaNO ₃	75,00	75g NaNO ₃ + 5g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O + llevar a 1L de agua destilada
1.2.	Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5,00	
1.3.	Silicato de sodio metasoluble*	Na ₂ SiO ₃ .9N ₂ O*	30,00	
* Los silicatos se emplean solo cuando se van a cultivar diatomeas				
2. Metales traza				
2.1. Soluciones primarias				
2.1.1.	Sulfato cúprico, cristales finos	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,98	0,98g CuSO ₄ .5H ₂ O + llevar a 100mL agua destilada
2.1.2.	Sulfato de zinc, cristales finos	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,20	2,20g ZnSO ₄ .7H ₂ O + llevar a 100mL agua destilada
2.1.3.	Cloruro de cobalto, cristales finos	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,00	1g CoCl ₂ .6H ₂ O + llevar a 100mL agua destilada
2.1.4.	Cloruro manganoso, cristales finos	MnCl ₂ .4H ₂ O	18,00	18g MnCl ₂ .4H ₂ O + llevar a 100mL agua destilada
2.1.5.	Molibdato de sodio, cristales finos	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,63	0,63g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O + llevar a 100mL agua destilada
2.2. Solución secundaria				
2.2.1	EDTA sódico	Na ₂ .EDTA	4,36	1mL de cada solución primaria (2.1.1. a 2.1.5.) + 4,35g Na ₂ .EDTA + 3,15g FeCl ₃ .6H ₂ O + llevar a 1L de agua destilada
2.2.2	Cloruro férrico	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15	
3. Vitaminas				
3.1. Soluciones primarias				
3.1.1.	Biotina cristalizada	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,01	0,01g C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S + 0,01g C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P + 2g C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS + llevar a 100mL con agua destilada
3.1.2.	Cianocobalamina	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	0,01	
3.1.3.	Tiamina clorhídrica	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS	2,00	
3.2. Solución secundaria				Adicionar 5mL de la solución primaria y completar a 1L con agua destilada
Preparación del medio de cultivo				
Para preparar 1L de agua de mar enriquecida se mezcla 1L de agua de mar microfiltrada con 2mL de las soluciones 1 y 2.2, esta solución se esteriliza en autoclave a 15psi por 15min, luego de enfriar se añaden 2mL de 3.2				

Fuente: LABBIP (Modificado de: GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates culture of marine invertebrates animals.; LAVENS, P y P. SORGELOOS. Manual of the production and use of live food for aquaculture. Food and agriculture organization on the United Nations.; VELASCO L.A., S. CARRERA y J. BARROS. Producción de microalgas como alimento para pectínidos. En: Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia.

Tabla 2. Descripción de las diferentes etapas del cultivo de *I. galbana* en el LABBIP para el desarrollo de pruebas de toxicidad.

Zona de cultivo	Cultivos	Tipo de recipiente	Volumen de inóculo	Volumen de medio preparado	Volumen de agua de mar añadido	Días de cultivo	Condiciones
Cepario	Cepa	Tubos de ensayo (15-20mL)	Dos gotas de un cultivo sano	10mL ⁽¹⁾	0	15-30	-Fotoperíodo 24h - Agua de mar auto clavada - Sin aeración - 20-24°C
	F1	Tubos de ensayo (15-20mL)	1mL	9mL ⁽¹⁾	0	7-21	
	F2	Tubos de ensayo (15-20mL)	1mL	9mL ⁽¹⁾	0	7	
	90mL	Frascos 200mL	10mL	80mL ⁽¹⁾	0	7	
	220mL	Frascos 500mL	20mL	200mL ⁽¹⁾	0	7	
Masivo ⁽²⁾	1L	Frascos 1L	70mL	25mL.L ⁻¹⁽³⁾	700mL	5	-Fotoperíodo 24h - Agua de mar filtrada (5 y 1µm) e irradiada con U.V. - Aeración constante - 25-29°C

1= Preparación de F/2 para cultivos del cepario (Tabla 1); 2= Preparación de los cultivos madre para pruebas de toxicidad; 3= Preparación del medio nutritivo para cultivos madre en recipientes de 1L: 7,5mL de cada medio (A y B) de Kent Marine Proculture®, en 700mL de agua de mar filtrada e irradiada con UV.

Fuente: Modificado de OSPINA-SALAZAR, G.H. *et al.* Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. 2 ed. Santa Marta, Colombia, Publicaciones Invemar, 2011. p. 45.

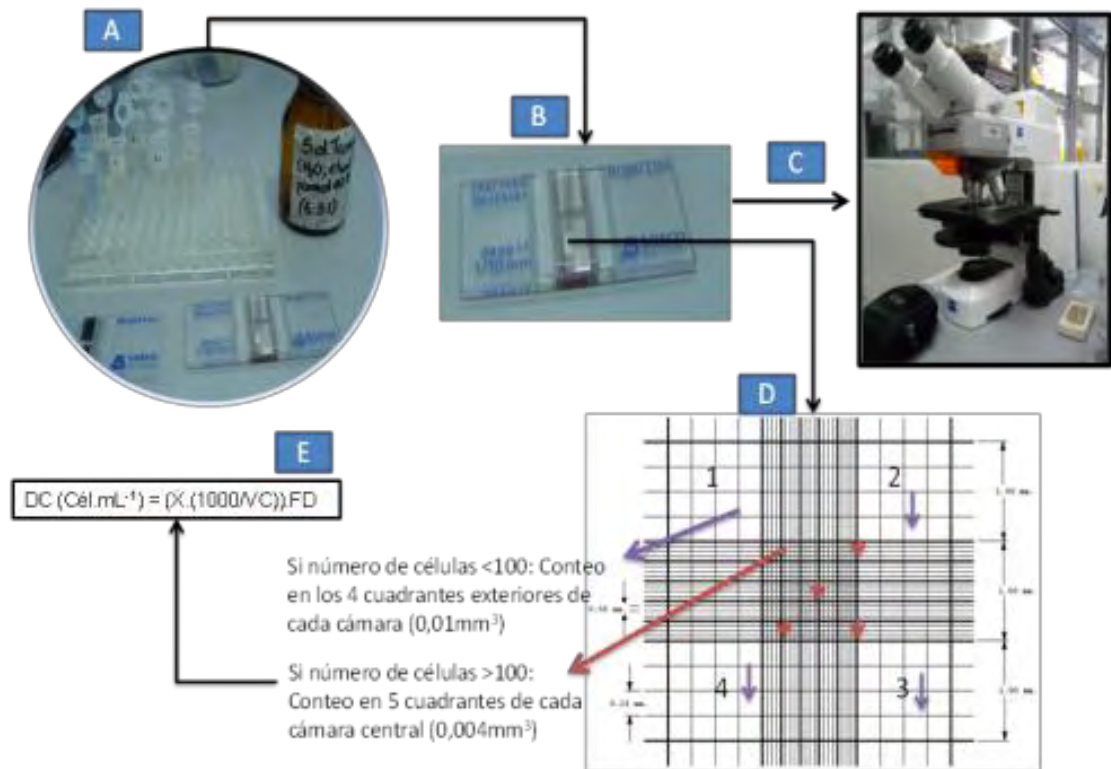
Para conocerla cantidad de células presentes en los recipientes de cultivo, tanto para el manejo de las algas como para los experimentos realizados, se determinó la densidad algal mediante conteos al microscopio, este procedimiento se llevó a cabo aplicando el método de recuento celular en placas de Neubauer reportado en manuales para cultivos de microalgas como FAO⁵¹:

- Se tomó una alícuota de 1mL del cultivo madre o de las unidades experimentales en tubos Eppendorf de 2mL, adicionando dos gotas de solución Transeau (formol, etanol y agua en una relación 6:3:1) para fijar la muestra (Figura 4A)
- Con un capilar diferente para cada una de las dos celdas que conforman la cámara de recuento Neubauer, se tomaron dos submuestras agitando el tubo Eppendorf previamente (Figura 4B)
- Las muestras se observan al microscopio en aumento 10X, para verificar que se encuentran uniformemente distribuidas y sin burbujas, si esto ocurre es necesario repetir el proceso, limpiando y secando nuevamente la placa
- Se realizaron los conteos al microscopio en aumento 40X (Figura 4C)

⁵¹ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Fisheries Technical Paper, 2006. p.184.

- Se definió el tipo de conteo, de acuerdo a la concentración celular como lo recomienda Castillo⁵², es decir: >100 células en 0,004mm³ y <100 células en 0,1mm³. Para el primer caso, el conteo se llevó a cabo en los cinco cuadrantes de la celda central de cada cámara, el valor final resultó del promedio de los conteos realizados en los 10 cuadrantes leídos (cinco en cada cámara) en un volumen de 0,004mm³. Para el segundo caso, el conteo se efectuó en los cuatro cuadrantes de los extremos de cada cámara y el valor final correspondió al promedio de los conteos realizados en los ocho cuadrantes leídos (cuatro en cada cámara) en un volumen de 0,1mm³(Figura 4D)

Figura 4. Metodología de recuento celular con placas Neubauer en microscopio.



- Cuando la variación entre los conteos de cada cámara fue mayor al 20%, se repitió el proceso.
- Finalmente se registraron los datos obtenidos de cada cámara, calculando el promedio y número de células en un mililitro de la muestra (Figura 4E). La fórmula utilizada para determinar la densidad celular (DC):

⁵²CASTILLO. Op. cit., p. 90

$$DC \text{ (cél. mL}^{-1}\text{)} = \left(\frac{X * 1000}{VC} \right) * FD$$

$$FD \text{ (mL)} = \frac{VM + VF + VD}{VM}$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de conteos de una muestra en las dos cámaras de Neubauer

VC= Volumen de la cámara leído (0,004 o 0,1mm³)

FD= Factor de dilución

VM= Volumen de la muestra (mL)

VF= Volumen del fijador (mL)

VD=Volumen de agua añadido para la dilución (mL)

4.3.2 **Determinación de la densidad inicial óptima para los ensayos de toxicidad y sus fases de crecimiento:** De acuerdo con la E.P.A.⁵³, la densidad final de células en los recipientes del tratamiento control para cada prueba de toxicidad deberá exceder 1x10⁶cél.mL⁻¹, para cumplir con este criterio se desarrolló un experimento utilizando un diseño completamente al azar con tres densidades iniciales de siembra (150.000, 300.000 y 500.000cél.mL⁻¹) y tres réplicas por tratamiento. Estas densidades se escogieron teniendo en cuenta el registro mensual que se llevó a cabo en el LABBIP para el cultivo de la especie antes de iniciar con los bioensayos (Anexo 3), donde las densidades iniciales para recipientes de 500mL se encontraron entre 100.000 a 550.000cél.mL⁻¹. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- La superficie del lugar de trabajo se limpió previamente con una mezcla de agua y alcohol en una relación 70:30
- Durante todo el procedimiento se mantuvo encendido un mechero para mantener las condiciones asépticas.
- De los cultivosde 1L se seleccionó el mejor para tomar de éste los inóculos a sembrarse en cada réplica por tratamiento. Para su escogencia los cultivos fueron observados *in vivo* al microscopio para asegurarse de que fuesen cultivos sanos de acuerdo con las recomendaciones de Velasco *et al.*⁵⁴ mencionadas anteriormente en este documento.

⁵³UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms.2 Ed.,Cincinnati, U.S.A. Klemm.USEPA.1994, 437 p.

⁵⁴VELASCO, L.A., S. CARRERA Y J. BARROS. Op. Cit., p. 31-63

- Se determinó la densidad celular del cultivo seleccionado como inóculo (cél.mL⁻¹) para calcular el volumen a añadir en cada unidad experimental, de acuerdo con la fórmula citada por A.S.T.M.⁵⁵:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2 \rightarrow V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1}$$

Donde:

V₁= Cantidad de inóculo a sembrar en cada frasco (mL)

C₁= Conteo promedio del cultivo de 1L seleccionado (cél.mL⁻¹)

V₂= Volumen final de cada unidad muestral, incluyendo el inóculo (150mL)

C₂= Densidad deseada en cada recipiente para el inicio de la prueba (150.000, 300.000 o 500.000cél.mL⁻¹)

Una vez conocida la cantidad de inóculo a añadir (V₁), ésta fue descontada del volumen total (150mL). Por ejemplo, si para obtener una densidad de 300.000cél.mL⁻¹ es necesario utilizar 4mL de inóculo, solo se añadirán 146mL de agua preparada con medio para que el volumen final sea de 150mL en cada unidad experimental (UE).

- Se preparó medio de cultivo utilizando agua autoclavada, añadiendo 2mL de cada una de las soluciones de Kent Marine Proculture® (A y B) por cada litro de agua, de acuerdo a lo establecido por Ospina *et al.*⁵⁶ y lo especificado en la Tabla 2
- Cada UE fue un recipiente de vidrio de 500mL. Haciendo uso del material de vidrio volumétrico, se adicionó en cada frasco la cantidad calculada de medio de cultivo previamente preparado.
- Al cultivo de 1L seleccionado como inóculo se le suministró aeración fuerte con el fin de que la muestra permanezca homogénea, tomando la cantidad respectiva de inóculo de acuerdo a las densidades seleccionadas que fueron sembradas en cada UE, sin suspender en ningún momento la aeración.
- De manera inmediata, haciendo uso de una micropipeta y agitando 10 veces cada UE, se tomó 1mL de muestra en un tubo Eppendorf para determinar la densidad inicial, cada muestra tomada fue fijada con dos gotas de solución Transeau.
- Cada UE fue cubierta con papel aluminio y ubicada al azar en los siete niveles seleccionados del área del cepario.

⁵⁵AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. 97 ed. Philadelphia (PA), ASTM, 1998. p.7.

⁵⁶OSPINA, G. H. *et al.* Op. cit., p. 47.

- Cada 24h se tomaron muestras en tubos Eppendorf de cada una de las réplicas, por un periodo de 13 días con el fin de realizar un conteo celular para determinar la densidad diaria del cultivo (cél.mL⁻¹).

Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de crecimiento para determinar sus fases propuestas por Stein⁵⁷, su duración y variabilidad entre réplicas, especialmente en la fase exponencial, ya que de acuerdo con Castillo⁵⁸ la preparación del inóculo que será utilizado en cada prueba debe encontrarse en dicha fase. Con estos criterios se seleccionó la densidad adecuada de inóculo a sembrar en todas las pruebas de toxicidad.

4.4 ENSAYOS DE TOXICIDAD

4.4.1 Materiales, equipos, reactivos y formatos

4.4.1.1 Materiales:

- Sistema de aeración (tubería de PVC con válvulas aireadoras)
- Sistema de iluminación (lámparas fluorescentes de luz blanca)
- Frascos de vidrio de 500mL de capacidad
- Frascos de vidrio de 250mL de capacidad
- Balones volumétricos de 1000mL
- Manguera de 10mm de diámetro
- Cinta de enmascarar
- Papel aluminio
- Probeta de 250mL
- Beakers de 250mL
- Beakers de 500mL
- Beakers de 1000mL
- Pipetas graduadas de 10mL
- Recipientes de vidrio de 4L de capacidad
- Cámara de conteo celular (Neubauer)
- Guantes de nitrilo
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon de 50mL
- Gradillas plásticas
- Guantes de protección
- Gafas protectoras
- Frasco lavador de 500-1.000mL
- Baldes plásticos de 10L
- Botellones plásticos de 20L con tapa
- Agua de mar filtrada (AMF) por 10µm

⁵⁷STEIN, R. Culture methods and growth measurements. Melbourne, Cambridge University press, 1973. 445 p.

⁵⁸CASTILLO Op. cit., p. 87

- Microalga *I. galbana*
- Papel secante
- Contador celular Cientific®

4.4.1.2 Equipos:

- Sistema de filtración y purificación de agua (filtros de 5 y 1µm y lámpara de luz ultravioleta)
- Sistema de enfriamiento del aire
- Microscopio
- Micropipeta de 1- 5mL
- Luxómetro Interspecific®
- Lámparas portátiles de luz blanca (30 W)
- Aireador portátil de acuario
- Conductímetro YSI® (modelo 30-10 FT)
- pH metro SARTORIUS®(modelo PT-15)
- Oxímetro WTW® (modelo 3151)
- Mezclador Ofite
- Agitador mecánico IKA RW11
- Balanza analítica SARTORIUS®(modelo AZ 214)
- Autoclave eléctrica a vapor ALL AMERICAN®(modelo 75x)
- Horno tostador BLACK & DEKER®(modelo CTO 650)
- Centrífuga UNIVERSAL®(modelo 320 R)

4.4.1.3 Reactivos:

- Medio de cultivo F/2 de Guillard Kent Marine Proculture®
- Solución Transeau (formol, etanol y agua en una relación 6:3:1)
- Sulfato de Cobre penta-hidratado

4.4.1.4 Formatos:

- Formato de registro de conteo celular por bioensayo (Anexo 1)
- Formato de registro de parámetros físico-químicos por bioensayo (Anexo 2)

4.4.2 **Preparación del material:** De acuerdo con Ospina *et al.*⁵⁹, los recipientes de cultivo deben ser de vidrio, preferiblemente lisos y de fondo plano para evitar la sedimentación de las microalgas. Antes de iniciar cualquier proceso, todo el material se lavó con detergente y suficiente agua dulce para posteriormente ser autoclavado u horneado.

⁵⁹OSPINA, G. H. *et al.* Op cit., p. 37.

4.4.3 **Preparación del medio de cultivo:** La preparación del medio fue necesaria cada vez que se realizaba un ensayo, el agua con medio fresco no debía permanecer más de dos días sin utilizarse, de lo contrario se debía preparar nuevamente teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se usó agua de mar filtrada (filtros de 5 y 1µm), irradiada con UV y autoclavada (15psi/30min)
- Generalmente para cada ensayo se utilizaron 12L de agua autoclavada, cuando la salinidad fue mayor de 35 UPS, ésta se ajustó adicionando la cantidad de agua destilada necesaria.
- Para facilitar la preparación del medio, el agua fue envasada en un botellón plástico de 20L con el fin de asegurar que el preparado fuera homogéneo.
- La preparación del medio de cultivo se realizó de acuerdo a lo establecido por Ospina *et al.*⁶⁰ y lo especificado en la Tabla 2
- Se tuvo en cuenta el volumen total de agua usado, tanto la autoclavada como destilada, para realizar el cálculo de la cantidad de medio que se debió añadir.
- Una vez realizada la mezcla, ésta fue equivalente a la solución primaria con la cual se prepararon todas las concentraciones a evaluar, con tóxico de referencia o lodo de exploración de hidrocarburos en base agua.

4.4.4 **Preparación de los cultivos madre:** Estos cultivos se usaron como un suministro constante de microalgas para el desarrollo de los bioensayos de toxicidad y se prepararon de manera continua en el laboratorio por cada prueba realizada. Para ello:

- La superficie del lugar de trabajo fue desinfectada y durante el proceso se mantuvo un mechero encendido para mantener condiciones asépticas.
- Los cultivos madre se mantuvieron en recipientes de 1L y para cada bioensayo se dispuso de un set de tres o cuatro frascos.
- Cada uno se preparó de acuerdo con las especificaciones de la Tabla 2 para cultivos de 1L, los cuales fueron ubicados en la zona del cultivo masivo con aeración fuerte e iluminación constante (Figura 5).
- Después de cinco días de haber sido sembrados, se utilizaron en los ensayos de toxicidad, encontrándose en su fase exponencial de crecimiento.

⁶⁰Ibid., p. 47.

- Para la escogencia del cultivo a usar, cada uno fue observado *in vivo* al microscopio, asegurando que fueran cultivos sanos y seleccionando el que mejor aspecto presentó.

Figura 5. Cultivos madre (área cultivo masivo).



- Al cultivo seleccionado se realizó cuatro conteos para determinar la densidad algal promedio inicial, cuando ésta fue $\geq 1 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ el cultivo fue apto para el desarrollo de las pruebas de toxicidad, en caso contrario, se examinó otro cultivo y se procedió nuevamente a su conteo hasta encontrar el que cumplió con la densidad indicada.
- Solo un cultivo madre fue seleccionado para cada ensayo de toxicidad.

4.4.5 **Pruebas de toxicidad y elaboración de la carta control con el tóxico de referencia:** Se seleccionó sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO₄.5H₂O) como tóxico de referencia, puesto que cumplió con la mayoría de criterios propuestos por Reyes, *et al.*⁶¹, se encuentra clasificado como un contaminante ambiental, hay disponibilidad de este producto en el mercado con pureza consistente, solubilidad y estabilidad en agua, facilitando para este estudio el acceso a la cantidad y presentación deseada. Además de ello presentó una facilidad de manejo en el laboratorio y su toxicidad no afecta al personal al manipularlo.

⁶¹REYES, M. HONDAL, O. HERNANDEZ, J. Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, Centro Nacional de Toxicología, 2003. p. 3.

4.4.5.1 Preparación de las concentraciones:

- Se preparó la solución del medio de cultivo como se describió anteriormente en el numeral 6.4.3.
- Se prepararon 2L de cada una de las concentraciones a evaluar en balones volumétricos
- Una vez pesada la cantidad necesaria de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ésta fue diluida en 10mL de medio de cultivo y transferida a un balón aforado, enjuagando repetidamente el recipiente. Cada solución fue aforada, agitando continuamente (Figura 6).

Figura 6. Preparación de las soluciones con sulfato de cobre penta-hidratado a diferentes concentraciones.



4.4.5.2 Procedimiento para el desarrollo de los bioensayos:

- **Pruebas preliminares:** De acuerdo con la EPA⁶², la duración de las pruebas preliminares, generalmente son la mitad de la duración de las definitivas y se debe tener en cuenta que la toxicidad de una sustancia (CI_{50}) en una prueba preliminar debe ser significativamente diferente de la toxicidad observada en la prueba definitiva que es por lo general de mayor duración. Teniendo en cuenta lo anterior, se inició el “*screening test*” en una escala descendente de concentraciones de sulfato de cobre penta-hidratado, donde se prepararon un mínimo de cinco concentraciones por ensayo y un control negativo (solución sin tóxico) para un total de seis tratamientos, cada uno con cinco réplicas que se evaluaron por un período de 48 o 72h, de la siguiente manera (Figura 7):

⁶²UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed Op. cit.,p. 188

Figura 7. Protocolo para el desarrollo de ensayos de toxicidad con *Isochrysis galbana*.



- Se desinfectó la zona de trabajo.
- Cada unidad experimental (UE) se conformó por un frasco de vidrio de fondo plano de 500mL de capacidad y 150mL de volumen total (solución de prueba + inóculo de microalgas).
- Se seleccionó el cultivo madre y se determinó la cantidad de inóculo a sembrar en cada UE y la cantidad de solución de prueba a añadir para un total de 150mL de volumen en cada frasco.
- Haciendo uso del material de vidrio volumétrico, se adicionó en cada UE el volumen exacto de cada concentración a evaluar.
- Con una micropipeta se tomó la cantidad respectiva de inóculo procedente del cultivo madre sin suspender en ningún momento la aeración y se sembró en cada UE.
- Luego de cada siembra y agitando 20 veces cada UE, se tomó 1mL de muestra en tubos Eppendorf para determinar la densidad celular inicial, cada muestra fue fijada con dos gotas de solución Transeau.
- La parte superior de los frascos fue cubierta con papel aluminio y fueron distribuidos al azar en las estanterías del cepario.

- Se midieron parámetros físico-químicos de oxígeno disuelto, temperatura, pH y salinidad de cada unidad experimental después de dos horas de haber realizado la siembra y al final de la prueba, teniendo en cuenta que este último registro se realizara a la misma hora que la medición inicial.
- Las muestras fueron agitadas tres veces al día manualmente.
- A las 0, 48h y/o 72h se tomaron alícuotas de 1mL de cada UE y se fijaron para realizar conteos en la cámara Neubauer. Las gotas de solución Transeau y las diluciones que se realizaron, se tuvieron en cuenta al momento de calcular la densidad celular de cada muestra.
- El tiempo de siembra de los inóculos en cada UE no superó 1h, ya que la concentración del cultivo madre puede variar ocasionando que la densidad inicial de los tratamientos a evaluar difieran. Este criterio se manejó en términos del Coeficiente de Variación (CV%), calculado a partir de⁶³:

$$CV = [(\sigma / \text{densidad celular}) \times 100]$$

Donde:

σ = Desviación estándar

Si el CV>15% entre las réplicas de un mismo tratamiento, la prueba debía repetirse

Si el CV>5% entre los valores de densidad promedio de cada tratamiento, la prueba debía repetirse.

- Para cada uno de los ensayos se determinó el porcentaje de inhibición (%I) en cada una de las concentraciones o tratamientos, teniendo en cuenta el cálculo propuesto por la A.S.T.M.⁶⁴:

$$\%I = \frac{C - X}{C} * 100$$

Donde:

C = Valor promedio del incremento de la densidad celular (cel.mL⁻¹) en el tratamiento control (final-inicial)

X = Incremento de la densidad celular (cél.mL⁻¹) en cada una de las unidades experimentales (final-inicial)

Las concentraciones se fueron ajustando en cada ensayo preliminar hasta obtener una curva dosis-respuesta escalonada del porcentaje de inhibición

⁶³CASTILLO. Op. cit., p. 129

⁶⁴AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS.Op. cit., p. 9.

(%) entre 0 y 100%, con cinco concentraciones definitivas y el control negativo.

- **Bioensayos definitivos:** De acuerdo con la EPA⁶⁵, las concentraciones definitivas se escogerán dependiendo de los resultados preliminares y los objetivos de la prueba. Una vez seleccionadas las concentraciones con las respuestas de inhibición esperadas, se realizaron tres bioensayos definitivos, con diferentes lotes de microalgas, usando el mismo tóxico de referencia, en las mismas concentraciones y en las mismas condiciones de prueba (duración del ensayo, tipo de agua, nutrientes, etc), con el fin de demostrar la habilidad para obtener consistencia y precisión de los resultados que permitan asegurar que los organismos evaluados presentaron una afectación similar en las concentraciones que se establecieron por un período de 72h.

Con los ensayos definitivos se elaboró la carta control estimando para cada ensayo la concentración de inhibición media (CI_{50-72h}) y la precisión se expresó en términos del coeficiente de variación (CV%) de los CI_{50-72h} calculados. Adicionalmente, con los datos de densidad algal obtenidos, se estimó la tasa específica de crecimiento de las microalgas (TEC) como modelo logarítmico de transformación de los datos para ser ingresados al programa estadístico StatGraphics® Centurion XV⁶⁶, implementando la siguiente fórmula⁶⁷:

$$TEC = \frac{\text{Log B} - \text{Log A}}{T}$$

Donde:

A: Densidad celular inicial (cél.mL⁻¹) a las 0h

B: Densidad celular final (cél.mL⁻¹) a las 72h

T: Tiempo transcurrido en días

Una vez determinada la TEC para cada bioensayo, se procedió a realizar el análisis estadístico de los datos para verificar la estandarización del protocolo implementado.

⁶⁵UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed, Op. cit.,p. 188

⁶⁶STATGRAPHICS Centurion XV. 2006 by StatPoint, Inc. Disponible en internet: . www.statgraphics.com

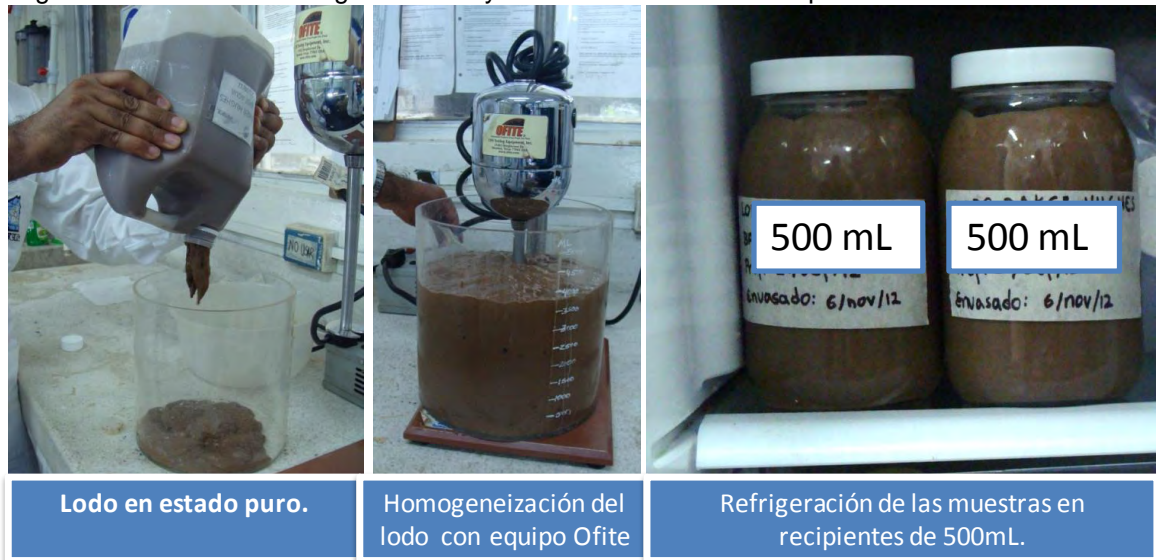
⁶⁷RODRIGUEZ, L., JUSCAMAITA, J., VARGAS, J. efecto del medio em-bokashi en el cultivo de la microalga marina Tetraselmis suecica K. En: Ecología aplicada. Diciembre, 2007.Vol. 6, no. 1 y 2. p. 112-116

4.4.6 **Pruebas de toxicidad con el lodo de exploración de hidrocarburos en base agua:** Se realizaron pruebas toxicológicas con un lodo de exploración de hidrocarburos en base agua, suministrado por el Instituto Colombiano del Petróleo (ICP), donde debido a que el preparado consistió en una masa oscura de una consistencia gelatinosa muy espesa, fue necesario realizar un proceso previo que consistió en la homogeneización de la muestra y la preparación de una fase suspendida particulada.

4.4.6.1 **Homogeneización del lodo:** Este proceso se realizó con toda la muestra de lodo, antes de ser trabajado en cada uno de los ensayos. Para ello:

- Se adicionó la muestra de lodo puro en un recipiente plástico amplio de fondo plano.
- Se homogenizó con un mezclador Ofite por 30 minutos iniciando a 40rpm, aumentado 10rpm cada cinco minutos hasta llegar a 80-90rpm
- Finalizado el proceso de mezcla, el lodo fue envasado nuevamente en recipientes de 500L y almacenado en el refrigerador para sólo usar la cantidad necesaria en cada bioensayo, sin necesidad de exponer toda la muestra a cambios constantes de temperatura que aceleren su degradación. (Figura 8)

Figura 8. Proceso de homogeneización y almacenamiento del lodo puro.



Lodo en estado puro.

Homogeneización del lodo con equipo Ofite

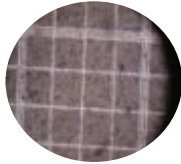

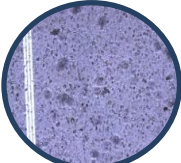
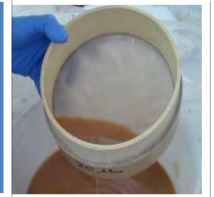
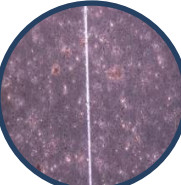

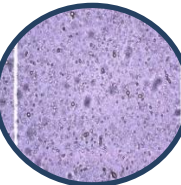

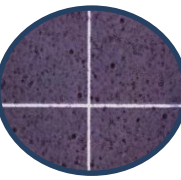

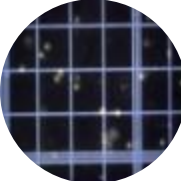
Refrigeración de las muestras en recipientes de 500mL.

4.4.6.2 **Preparación de la fase suspendida particulada (FSP):** Debido a la consistencia original del lodo de perforación en base agua, no fue posible realizar pruebas en su estado puro con las microalgas, siendo necesario trabajar con una dilución inicial que se toma como el 100% de muestra, denominada Fase Suspendida Particulada (FSP). Generalmente para cada bioensayo fue necesario preparar 4L de solución inicial, para obtener entre 3 a 3,5L de FSP. Una vez establecida la cantidad de FSP necesaria, su preparación de acuerdo con la EPA ⁶⁸ se tomaron 400mL de soluto (muestra de lodo puro) y 3600mL de solvente (agua de mar y agua destilada, ambas preparadas con medio de cultivo de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 2.

- Se tomaron en una bureta, 400mL de lodo, depositándolos en un recipiente de fondo plano y realizando repetidos enjuagues a la bureta, recuperando el enjuague en el mismo recipiente
- Se inició el proceso de mezcla con el molino Ofite en 40 rpm, midiendo constantemente la salinidad, dependiendo del valor registrado, se continuó adicionando volúmenes de 100 o 200mL de agua sea de mar o agua destilada, preparadas con medio, con el objetivo de lograr una salinidad de $35 \pm 0,5$.
- Una vez adicionados exactamente los 3600mL de solvente, se mezcló aumentando 10rpm gradualmente hasta 80-90rpm, por un periodo de 30 minutos.
- La muestra fue transferida a un recipiente de vidrio, donde se dejó decantar por 1h, el sobrenadante fue sifoneado suavemente con una manguera de 1/4" a otro recipiente.
- Considerando que el conteo de microalgas se dificultó por la gran cantidad de partículas que tuvo el lodo y que además, *Isochrysis galbana* en un ambiente natural por ser un productor primario se distribuye en la zona fótica de la columna de agua y no en el fondo, se realizó la centrifugación del sobrenadante a 3.000rpm y 10°C durante 20' en una Centrifuga UNIVERSAL[®] (modelo 320 R) en tubos Falcon de 50mL, con lo cual se lograron los mejores resultados de visibilidad de la muestra para realizar los conteos, después de haber descartado otros intentos (Tabla 3).

⁶⁸ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Oil and gas extraction point source category offshore subcategory. En: Federal register. December, 1996. Vol. 61, no. 242, pp. 2-46

Tabla 3. Ensayos de filtración del lodo, mezclado con *I. galbana* para la realización de los conteos algales en placas de Neubauer al microscopio en aumento 40x.

TAMAÑO DE PORO DE FILTRACIÓN	IMAGEN AL MICROSCOPIO (40X) EN CÁMARA NEUBAUER	OBSERVACIONES
Sin filtrar		<ul style="list-style-type: none"> - Gran cantidad de partículas en suspensión. - No se distinguen las algas del resto de partículas en suspensión.
40µm 		<ul style="list-style-type: none"> - Se retuvieron algunas partículas. - Aún se dificulta el conteo en la placa Neubauer, las algas no se distinguen.
20µm 		<ul style="list-style-type: none"> - Se retiene una pequeña porción de precipitado. - Aunque el conteo es difícil de realizar, disminuyó la cantidad de partículas en suspensión y se distinguen mejor las microalgas.
4µm 		<ul style="list-style-type: none"> - Se retiene una muy pequeña porción de precipitado. - Se observa igual que al filtrarla por 20µm
Lana de vidrio 		<ul style="list-style-type: none"> - Se retiene una mayor porción de precipitado, pero aún no se logran diferenciar claramente las microalgas.
Centrifuga 		<ul style="list-style-type: none"> - Se retiene una gran porción de precipitado y se logra diferenciar las microalgas del resto de residuos de la muestra.

- El líquido sobrenadante colectado después de la centrifugación representó la FSP y corresponde al 100% de concentración inicial del lodo
- La FSP fue utilizada inmediatamente después para preparar las soluciones a las diferentes concentraciones y dar inicio a los bioensayos con el lodo.
- Este proceso se repitió para cada uno de los bioensayos efectuados con este tipo de muestra.

4.4.6.3 Preparación de las concentraciones:

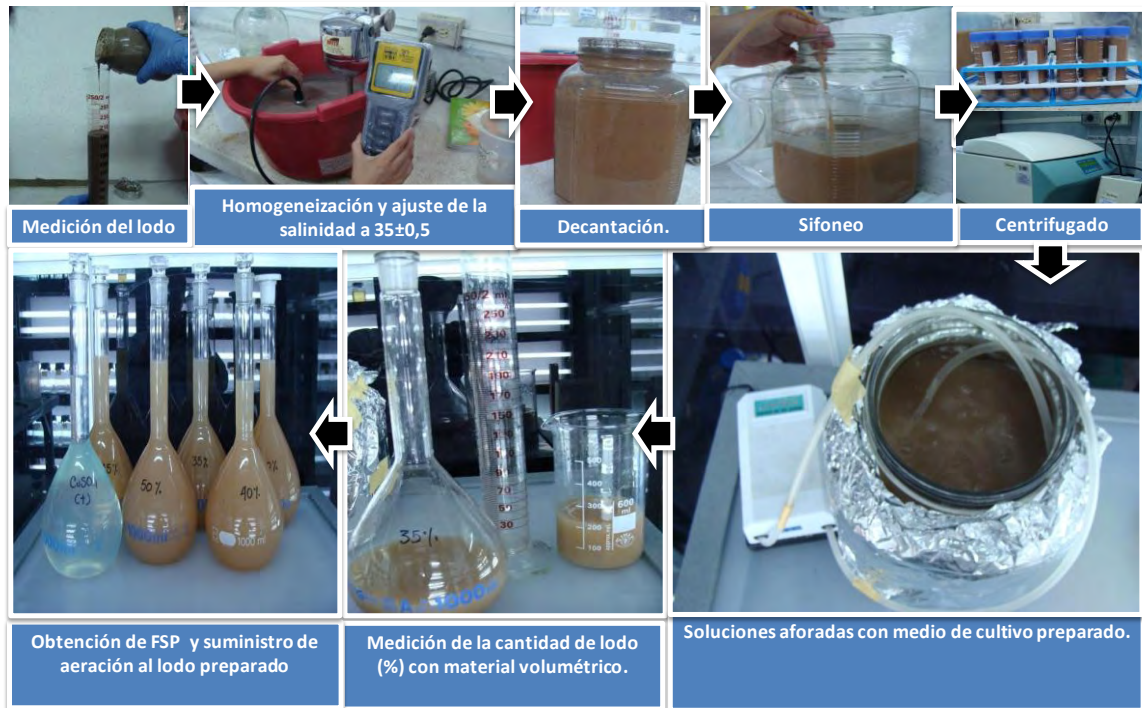
- Una vez obtenida la FSP, se suministró aeración fuerte para mantener la muestra siempre oxigenada y homogénea.
- Toda el agua a utilizar para las soluciones, se preparó con medio de cultivo, cuya elaboración se describió anteriormente (Sección 4.4.3) a una salinidad de $35 \pm 0,5$ UPS
- Generalmente se preparó 1L de las diferentes concentraciones a evaluar, para ello, se partió de la FSP previamente centrifugada, la cual representó el 100% de concentración del lodo. En una probeta se midió exactamente la cantidad de FSP necesaria para preparar la solución a la concentración deseada, transfiriéndola a un balón aforado de 1000mL, por ejemplo, para preparar una solución al 50% de lodo, se tomaron 500mL de FSP y se transfirieron al balón.
- La probeta fue enjuagada de cinco a seis veces, con el propósito de que no quedasen residuos de lodo que pudieran modificar su concentración real, evitando cualquier pérdida de material y transfiriendo los enjuagues al balón.
- Finalmente, el balón se aforó y se agitó continuamente. El procedimiento para la preparación de la FSP y las soluciones se resume en la Figura 9.

4.4.6.4 Procedimiento para el desarrollo de los bioensayos:

- **Bioensayos preliminares:** De la misma manera que con el tóxico de referencia, se prepararon soluciones seriadas a diferentes concentraciones (*screening test*) hasta obtener una curva dosis-respuesta escalonada del porcentaje de inhibición entre 0 y 100%, con cinco concentraciones definitivas de lodo y un control negativo a 48 o 72h, aplicando los mismos criterios y pasos del protocolo descrito en el numeral 4.4.5.2.

- **Bioensayos definitivos:** Una vez establecidas las concentraciones de inhibición, se realizaron tres bioensayos definitivos a 72h con diferentes lotes de microalgas, usando el mismo lodo, en las mismas concentraciones y en las mismas condiciones de prueba (duración del ensayo, tipo de agua, nutrientes, etc), para los cuales se utilizó además del control negativo (tratamiento sin agente tóxico), un control positivo (tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de respuesta conocida), cuyo efecto fue establecido en los bioensayos con tóxico de referencia previos. Este método de ensayo proporcionó un punto de estimación de la toxicidad del lodo de perforación en términos de $\text{CI}_{50-72\text{h}}$, estimando también el CV% entre los ensayos.

Figura 9. Preparación de la Fase Suspendida Particulada (FSP) y concentraciones de prueba con un lodo en base agua.



4.5 ANÁLISIS DE DATOS

- 4.5.1 **Intensidad lumínica:** Se realizó un análisis de varianza a una vía entre los siete niveles de las estanterías del cepario, que permitió conocer la existencia o no de diferencias significativas entre los valores de lux emitidos por las lámparas dispuestas en los niveles de la estantería a usarse en los bioensayos. Se utilizó un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

4.5.2 **Pruebas para la estandarización del protocolo:** En la estandarización de la técnica desarrollada en el laboratorio para llevar a cabo los análisis de toxicidad tanto para tóxico de referencia como para el lodo de exploración offshore de hidrocarburos con la microalga *I. galbana*, se aplicó un diseño en bloques completos al azar con submuestreo, conformado por tres bloques (número de ensayos) y siete tratamientos relacionados con diferentes concentraciones incluyendo el control negativo y para el caso específico de lodos, también el control positivo.

El modelo teórico para representar el diseño experimental utilizado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \eta_{k(ij)}$$

Se inició transformando los datos de densidad celular al modelo logarítmico de TEC y posteriormente al modelo Arcoseno (y), para ingresarlos al programa estadístico StatGraphics® Centurion XV⁶⁹, donde inicialmente, se realizó una depuración de los datos que se mostraron típicos, para continuar con la verificación de los supuestos estadísticos que aseguren la veracidad del análisis de varianza:

- Normalidad: se verificó con las pruebas de Chi cuadrado, Shapiro Wilk ó Asimetría⁷⁰.
- Homogeneidad e independencia: se verificó aplicando la prueba de Bartlet, Cochran ó Lavene.
- Independencia: Se verificó con la aplicación de la prueba de Durbin Watson.

Posterior a esta verificación de supuestos, utilizando modelos lineales generalizados del programa estadístico, se realizó un análisis de varianza para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre bioensayos, muestras y tratamientos. En los casos en los que se presentaron diferencias, se aplicó una prueba *post hoc*, dependiendo el caso, Tukey, Schieff o Duncan para conocer entre cuáles de estos tratamientos.

4.5.3 **Formulación de hipótesis:** En todos los casos, la regla de decisión es: Si $p \leq 0,05$ se rechaza H_0 y, consecuentemente se acepta la alterna.

⁶⁹STATGRAPHICS Centurion XV. 2006 by StatPoint, Inc. Disponible en internet: . www.statgraphics.com

⁷⁰IMUES, M. "Bioestadística: Aplicaciones en Producción y Salud Animal" Colombia, ed. Universidad De Nariño. ISBN: 958-9479-39-1, 2009. vol. 1.291 p.

4.5.3.1 Prueba de hipótesis para los tratamientos o concentraciones

Hipótesis nula $H_0: \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$. El efecto medio en los tratamientos es igual.

Hipótesis alterna $H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \neq \mu_6$, Existe por lo menos un tratamiento que presenta un efecto medio diferente.

4.5.3.2 Prueba de hipótesis para ensayos

Hipótesis nula $H_0: \mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$. El efecto medio entre los ensayos es igual.

Hipótesis alterna $H_1: \mu_j = \mu_{j'}, j \neq j'$. Existe por lo menos un ensayo que presenta un efecto medio diferente a las variables.

4.5.3.3 Prueba de Hipótesis para el análisis probit

$H_0: \beta_1 = 0$. No hay relación lineal de dependencia.

$H_1: \beta_1 \neq 0$. Hay relación lineal de dependencia

4.5.4 **Cálculo de la Concentración de Inhibición Media (CI_{50-72h}):** Para esto se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición por tratamiento (%I) y posteriormente se calculó la CI_{50-72h} tanto en los ensayos del tóxico de referencia como en el lodo de perforación offshore, siguiendo los lineamientos de la EPA⁷¹ y Castillo⁷². Los datos de porcentaje de inhibición fueron analizados con el programa Probit, versión 1.5⁷³; donde en los casos en que la prueba de chi-cuadrado no fue significativa, se utilizó una prueba ajustada de Spearman-Kärber⁷⁴, como se observa en la Figura 10.

⁷¹UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 EdOp. cit., p. 292

⁷²CASTILLO. Op. cit., p. 129

⁷³Aquatic Toxicology Laboratory. [En línea]. Disponible en internet: http://www.ias.unt.edu/~waller/aquatic_toxicology/laboratory/

⁷⁴Ibid.

4.5.5 **Elaboración de la carta control:** Los valores de CI_{50-72h} obtenidos con el tóxico de referencia se fueron integrando a manera de puntos en un gráfico que relacionó el número de ensayos, ubicados en el eje X o abscisa y el valor de las concentraciones de inhibición media (CI_{50}), en el eje Y u ordenada. Posteriormente, los valores fueron empleados para el cálculo del valor promedio y la desviación estándar de la población de datos. Con estos datos se calcularon los límites superior e inferior que definen el intervalo de variación aceptable o intervalos de confianza (95%) en el que deberán encontrarse los valores de CI_{50-72h} obtenidos para futuros ensayos con el tóxico de referencia. Los valores del límite superior e inferior se obtuvieron al adicionar o sustraer del promedio, respectivamente, dos desviaciones estándar de acuerdo con Castillo⁷⁵:

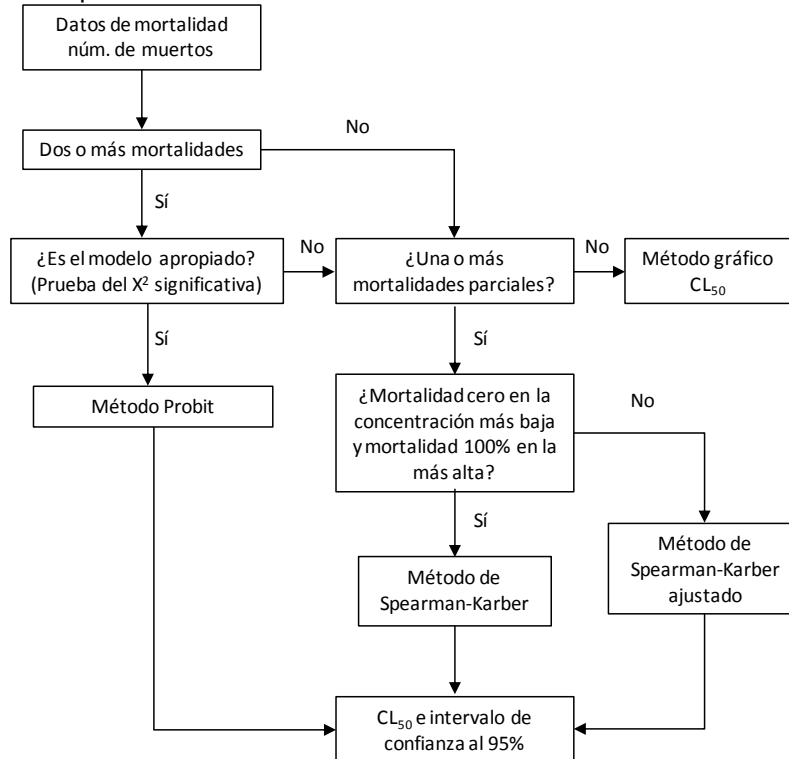
⁷⁵CASTILLO. Op. cit., p. 128

Concentración límite superior: promedio + 2σ
 Concentración límite inferior: promedio – 2σ

Donde:

σ: Desviación estándar de la población de datos.

Figura 10. Determinación de CL₅₀ para pruebas de toxicidad con múltiples concentraciones.



Fuente: CASTILLO. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México: IMTA, 2004.

4.5.6 **Fisicoquímicos:** Tanto para tóxico de referencia como para el lodo de exploración offshore, mediante un diseño en bloques completos al azar con submuestreo, se ingresaron los datos al programa estadístico StatGraphics® Centurion XV⁷⁶, donde inicialmente, se realizó una depuración de los datos que se mostraron atípicos, para continuar con la verificación de los supuestos estadísticos que aseguren la veracidad del análisis de varianza:

⁷⁶STATGRAPHICS Centurion XV.2006 by StatPoint.Op. cit.

- Normalidad: se verificó con las pruebas de Chi cuadrado, Shapiro Wilk ó Asimetría⁷⁷.
- Homogeneidad e independencia: se verificó aplicando la prueba de Bartlet⁷⁸Cochran ó Lavene
- Independencia: Se verificó con la aplicación de la prueba de Durbin Watson

Posterior a esta verificación, utilizando modelos lineales generalizados del programa estadístico, se realizó un análisis de varianza para determinar la existencia o no de diferencias significativas entre bioensayos, muestras y tratamientos. En los casos en los que se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, se aplicó una prueba *post hoc*, dependiendo el caso, Duncan, Schieff o Tukey⁷⁹ para conocer entre cuáles se presentaron dichas diferencias.

Para el caso de la salinidad, con el propósito de verificar si los valores de salinidad inicial fueron afectados por la evaporación al final de las pruebas, se llevó a cabo una prueba t-student.

⁷⁷ IMUES, M. Op. Cit., 291 p.

⁷⁸Ibid.,291 p.

⁷⁹Ibid.,291 p.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD.

5.1.1 **Verificación de efectividad del sistema de filtración de agua usada para los cultivos:** La EPA⁸⁰ afirma que los organismos patógenos y/o planctívoros en el agua de dilución y el efluente pueden afectar la supervivencia y el crecimiento del organismo de ensayo y confundir los resultados de las pruebas, es por ello que en el LABBIP el sistema de recirculación contó con filtros que retienen partículas mayores a 10µm y el área específica de microalgas, de 5 y 1µm, además de esterilización con luz ultravioleta (UV). De acuerdo con Jerlov⁸¹, los efectos de la irradiación UV son bacteriostáticos y desinfectan el agua. El análisis bacteriológico realizado por el laboratorio de calidad ambiental marina del INVEMAR, determinó que la efectividad de la lámpara UV es buena ya que las unidades formadoras de colonia (UFC) para pruebas de *Vibrio sp*, aerobios mesófilos, coliformes totales y *Escherichia coli* fueron <1 (Anexo 4), permitiendo afirmar que el agua utilizada se encuentra libre de organismos bacterianos que puedan afectar el desarrollo o resultados de los cultivos y que el sistema de filtración e irradiación funcionan de manera correcta. Con esto, se cumple además con las recomendaciones de Velasco *et al.*⁸², quien afirma que para los cultivos de microalgas es fundamental contar con un adecuado sistema de filtración y que el agua de mar debe estar libre de cualquier partícula, contaminante u organismo.

El procedimiento realizado al agua utilizada en los bioensayos, cumplió con los requerimientos planteados por ASTM⁸³, donde se afirma que el agua puede ser filtrada a través de filtros de membrana y a continuación, para las microalgas, ésta deberá pasar por un tratamiento en autoclave, tal como se realizó en los procedimientos para los ensayos en este estudio.

⁸⁰ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p. 55

⁸¹ ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Fisheries Technical Paper, 2006. p.184.

⁸² VELASCO, L.A., S. CARRERA Y J. BARROS. Op. Cit., p. 31-63

⁸³ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op.cit., p.7.

5.1.2 **Intensidad lumínica:** El análisis de varianza realizado en los siete niveles de las estanterías del área del cepario para el cultivo de microalgas indican que el cuarto nivel tiene una luminosidad significativamente mayor que el resto ($p \leq 0,05$), por lo cual debió ser descartado para la realización de los bioensayos (Anexo 5). La intensidad lumínica promedio para los seis niveles seleccionados fue de $1.444 \text{ lux} \pm 115,41$ (Tabla 4).

Tabla 4. Intensidad lumínica en las estanterías del cepario usadas para el desarrollo de los bioensayos, desviación estándar (D.E.) y coeficientes de variación.

NIVEL	IZQUIERDA	MEDIO	DERECHA	Promedio (lux)	D.E (lux)	CV (%)
1 ^b	1.420	1.520	1.340	1.427	90	6,31
2 ^b	1.497	1.530	1.397	1.475	69	4,68
3 ^b	1.452	1.566	1.347	1.455	110	7,56
4 ^a	1.589	1.694	1.590	1.624	60	3,69
5 ^b	1.328	1.444	1.306	1.359	74	5,45
6 ^b	1.493	1.483	1.425	1.467	37	2,52
7 ^b	1.300	1.364	1.235	1.300	65	5,00
Promedio	1.440	1.514	1.377	Promedio total		1.444
D.E.	83,7	72,3	67,4	D.E.		115,41

*Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

De acuerdo con Sipaúba, Rocha⁸⁴, Lavens y Sorgelos⁸⁵ la condición óptima para el crecimiento del fitoplancton dependerá de la intensidad de luz, siendo la iluminación un factor primordial porque el crecimiento algal está ligado directamente al proceso fotosintético. Con el propósito de cumplir con el requerimiento planteado por ASTM⁸⁶ que afirma que la influencia de luz no debe diferir en más de un 15%, lo cual asegura que los tratamientos de los diferentes bioensayos se encuentren en las mismas condiciones. En este sentido, tanto el valor promedio obtenido en el cepario y su D.E., como los CV% de cada nivel (Tabla 4), indican que el porcentaje de variación no fue mayor de 7,56%.

Lavens y Sorgelos⁸⁷ aseguran que la intensidad lumínica juega un papel importante, pero los requerimientos varían dependiendo de la profundidad y densidad del cultivo, así, el valor promedio de la intensidad lumínica en los niveles de las estanterías del cepario cumplió con los

⁸⁴SIPAÚBA TAVARES, L.; ODETE, ROCHA. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos, São Carlos, Brasil, RiMa. 2003. p.18.

⁸⁵LAVENS, P y P. SORGELOOS. Manual of the production and use of live food for aquaculture. Food and agriculture organization on the United Nations. No 361. Rome, Italy, FAO. Technical paper, 1996. 295 p.

⁸⁶AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., P. 8

⁸⁷LAVENS, P y P. SORGELOOS. Op. cit., 295 p.

requerimientos para microalgas en recipientes de 500mL, pues, estos mismos autores dan a conocer que 1.000lux son suficientes para frascos erlenmeyer del mismo volumen. Además, el promedio de luminosidad trabajado en los bioensayos es cercano al manejado por Velasco *et al.*⁸⁸ para cultivos de microalgas en condiciones de laboratorio, donde a 1.024lux obtuvieron buenos resultados de crecimiento para *I. galbana*.

5.1.3 **Mantenimiento del cultivo de microalgas:** En la Tabla 5 se especifican las densidades celulares iniciales y finales en cada etapa del cultivo en “*batch*”, bajo las condiciones de manejo establecidas, medios de cultivo usados y condiciones ambientales del LABBIP. Se observó un incremento celular a medida que se avanza a una nueva fase de cultivo, donde el coeficiente de variación (CV%) entre las réplicas fue menor al 15%, a excepción de la primera fase de cultivo (cepa) que fue del 17%. Teniendo en cuenta estos valores y considerando que para el desarrollo de los ensayos de toxicidad se necesitaban como cultivos madre volúmenes de 1L, fue posible establecer que para obtener un cultivo óptimo de este tipo con densidades $>1 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, los cultivos anteriores deberán iniciarse con tubos de ensayo a una densidad promedio de aproximadamente 29.958cél.mL⁻¹ (Tabla 5), densidad menor que la propuesta por Castillo⁸⁹ para bioensayos de toxicidad con la microalga *S. capricornutum*, donde afirma que el cultivo se puede iniciar a partir de otro cultivo líquido de algas que haya alcanzado la fase estacionaria y tenga una densidad celular entre 1 y 3×10^6 cél.mL⁻¹.

El procedimiento de traslado de una fase de cultivo a otra, cumplió con las recomendaciones de ASTM⁹⁰, donde se da a conocer que la transferencia de cultivos de un recipiente a otro debe ser realizada semanalmente para mantener un suministro continuo de células en o cerca de la fase de crecimiento exponencial y que el volumen transferido de células deberá ser suficiente para asegurar un buen crecimiento.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la EPA⁹¹ manifiesta que la calidad de los nutrientes utilizados en el cultivo de los organismos es un factor importante que influye en los datos de cada bioensayo, problemas con la idoneidad de los mismos se reflejarán en el crecimiento de los organismos, la preparación del F/2 tanto con nutriente comercial Kent Marine Proculture® utilizado en el LABBIP como el que se usó en este

⁸⁸VELASCO, L.A., S. CARRERA Y J. BARROS. Op. cit., p. 31.

⁸⁹ CASTILLO Op. cit., p. 83

⁹⁰AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., p. 14

⁹¹ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed, Op. cit., p.11

estudio a partir de la formulación recopilada por diferentes autores⁹² (Tabla 1), fueron adecuados para el cultivo de *I. galbana* pues permitieron el crecimiento y aseguraron el mantenimiento en todas las fases hasta obtener cultivos madre de 1L con una la densidad requerida y en buen estado para los ensayos de toxicidad.

Tabla 5. Monitoreo de la densidad inicial y final en las diferentes etapas del cultivo tipo *batch* de *I. galbana* en el LABBIP.

Zona de cultivo	Fase	Tipo de recipiente	Densidad inicial (cél.mL ⁻¹)	Densidad final (cél.mL ⁻¹)	Incremento (cél.mL ⁻¹)	D.E. (cél.mL ⁻¹)	CV (%)
CEPARIO	Cepa	Tubos de ensayo (15-20mL)	22.500	1.207.500	1.185.000	242.624	17
			28.875	1.402.500	1.373.625		
			38.500	1.705.000	1.666.500		
			Promedio	29.958	1.438.333		
	F1	Tubos de ensayo (15-20mL)	299.250	2.913.750	2.614.500	44.901	2
			280.875	2.913.750	2.632.875		
			292.688	2.992.500	2.699.813		
			Promedio	290.938	2.940.000		
	F2	Tubos de ensayo (15-20mL)	315.000	3.176.250	2.861.250	209.640	7
			350.438	3.123.750	2.773.313		
			318.938	3.491.250	3.172.313		
			Promedio	328.125	3.263.750		
	100mL	Frascos 200mL	161.438	3.832.500	3.671.063	376.398	11
			169.313	3.963.750	3.794.438		
			191.625	3.281.250	3.089.625		
Promedio			174.125	3.692.500	3.518.375		
250mL	Frascos 250mL	615.563	6.195.000	5.579.438	216.210	4	
		645.750	6.615.000	5.969.250			
		609.000	6.221.250	5.612.250			
		Promedio	623.438	6.343.750			5.720.313
MASIVO	1L	Frascos 1L	389.125	11.935.000	11.545.875	712.668	6
			379.500	11.825.000	11.445.500		
			350.625	10.615.000	10.264.375		
			Promedio	373.083	11.458.333		

5.1.4 **Determinación de la densidad inicial óptima para los ensayos de toxicidad y sus fases de crecimiento:** Los tres tratamientos evaluados (T1: 150.000cél.mL⁻¹; T2: 300.000cél.mL⁻¹, T3: 500.000cél.mL⁻¹) mostraron una densidad promedio final entre 2.660.000 y 4.847.500cél.mL⁻¹ (Tabla 6) y están dentro del requerimiento establecido por la EPA⁹³ al presentar a las 72h una densidad mayor a 1.000.000cél.mL⁻¹.

⁹²GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates culture of marine invertebrates animals. New York, U.S.A., Plenum press,1974. 85 p.

LAVENS, P y P. SORGELOOS. Op.cit.,295 p.

VELASCO L.A., S. CARRERA y J. BARROS. Op. Cit., pp. 31-63.

⁹³Ibíd., p.195

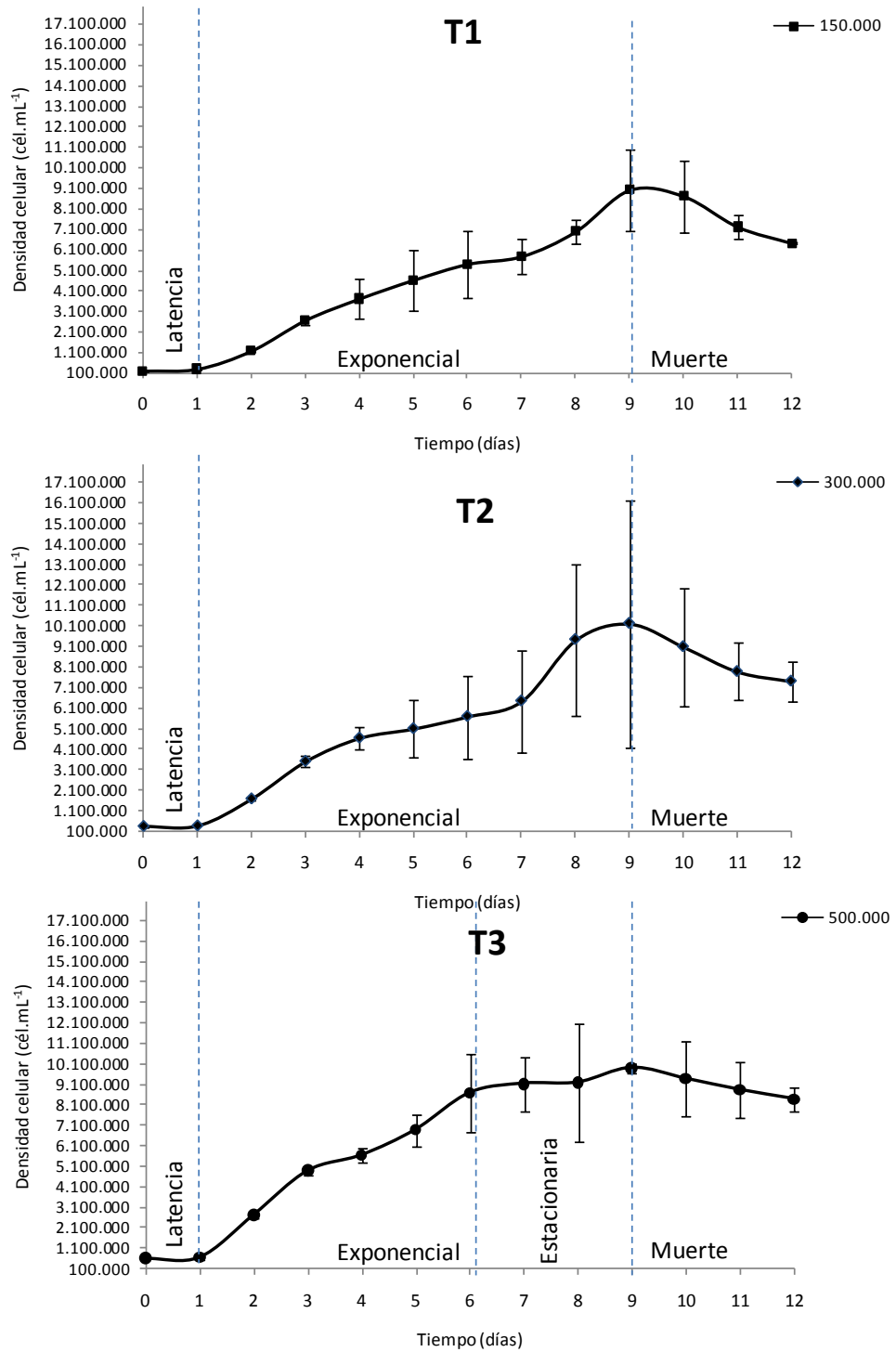
Tabla 6. Densidad celular final por tratamiento para la selección del inóculo inicial en bioensayos de toxicidad.

DENSIDAD CELULAR A 72h			
RÉPLICA	TRATAMIENTO 1 (150.000cél.mL⁻¹)	TRATAMIENTO 2 (300.000cél.mL⁻¹)	TRATAMIENTO 3 (500.000cél.mL⁻¹)
R1	2.441.250	3.675.000	5.040.000
R2	2.808.750	3.648.750	4.620.000
R3	2.730.000	3.176.250	4.882.500
PROMEDIO	2.660.000	3.500.000	4.847.500
D.E.	193.492	280.683	212.176
C.V.%	7,27	8,02	4,38

Para la selección del inóculo se consideraron las curvas de crecimiento de cada tratamiento en un periodo de 13 días con sus respectivas desviaciones estándar (D.E.), entre el primero y segundo día se inicia la fase de latencia en los tres tratamientos y aunque se presentó un incremento de la densidad celular, este no fue mayormente marcado. Posteriormente se presenta la fase exponencial hasta el noveno día en T1 y T2 mientras que en T3 se mantuvo hasta el sexto, según González⁹⁴, en esta etapa las células comienzan a asimilar los nutrientes del medio y el proceso de reproducción se encuentra activo. Para el T3 se observa una tercera fase durante tres días denominada estacionaria, donde no hubo incremento significativo de la población y la curva tendió a estabilizarse debido probablemente a que el incremento poblacional interfirió en la captación de luz y la disponibilidad de nutrientes disminuyó, mientras que en T1 y T2 dicha fase no logró diferenciarse claramente, sino que posterior a la fase exponencial se inició la de muerte. El comportamiento de la D.E. fue diferente en cada tratamiento, presentándose mayor variabilidad en el T2 a lo largo de todas las fases de crecimiento y las menores D.E en el T3 durante la fase exponencial (Figura 11).

⁹⁴ GONZÁLEZ DE INFANTE A. El plancton de las aguas continentales. Monografía 31 OEA. Washington DC.- USA. 1988; p.131.

Figura 11. Curvas y fases de crecimiento de *I. galbana* a diferentes densidades iniciales de siembra: 150.000cél.mL⁻¹ (T1), 300.000cél.mL⁻¹ (T2) y 500.000cél.mL⁻¹ (T3). Los valores están reportados como el promedio de tres réplicas ± D.E.



El tratamiento que mostró de manera más clara las fases de crecimiento fue T3, con una pendiente más marcada en la fase exponencial, bajas D.E. y un CV% entre las réplicas menor al 15% durante los primeros seis días, mientras que los tratamientos T1 y T2 tuvieron mayor variabilidad, alcanzando CV del 32% entre réplicas (Anexo 7). Con base en estas consideraciones, se determinó una densidad inicial de 500.000cél.mL⁻¹ (T3) como inóculo óptimo a usar en cada unidad experimental para los ensayos de toxicidad a realizar, ajustándose a las recomendaciones de ASTM⁹⁵ quien afirma que cada recipiente de ensayo debe ser inoculado en una densidad inicial de población que permita suficiente crecimiento, bajo las condiciones de ensayo, sin limitaciones en nutrientes.

Los inóculos para ensayos de toxicidad que se han usado en otras especies oscilan entre 10.000-50.000cél.mL⁻¹ (Tabla 7), siendo menores que el seleccionado en este estudio (500.000cél.mL⁻¹). De acuerdo con ASTM⁹⁶, las concentraciones más bajas pueden ser prácticas para algunos laboratorios y concentraciones más altas pueden ser deseables si hay indicios de que no se logrará el crecimiento exponencial dentro de cuatro días, por lo tanto, para descartar este aspecto y teniendo en cuenta los registros del LABBIP⁹⁷, se evaluaron inóculos superiores a los establecidos para otras especies de microalgas.

Tabla 7. Inóculos de microalgas utilizados para bioensayos de toxicidad en otros estudios.

Espece	Densidad celular utilizada como inóculo (cél.mL ⁻¹)
<i>Selenastrum capricornutum</i> y otras algas verdes	1-2 x 10 ⁴
<i>Navicula pelliculosa</i>	1-2 x10 ⁴
<i>Microcystis aeruginosa</i>	5 x10 ⁴
<i>Anabaenaflos-aquae</i>	1-2 x10 ⁴
Especies de agua salada	1-2 x10 ⁴

Fuente: AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae.

La densidad inicial escogida como inóculo para los ensayos de toxicidad en este trabajo (500.000cél.mL⁻¹) es alta desde el punto de vista ecotoxicológico, pues de acuerdo con Vasseur *et al.*⁹⁸, Stratton, Giles⁹⁹ y

⁹⁵AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., p. 7

⁹⁶Ibid., p.7

⁹⁷INVEVAR.Informes técnicos. Santa Marta, Colombia, Laboratorio de Bioprospección Marina, 2012.

⁹⁸VASSEUR, P. PANDARD, D. BURNEL. Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. Toxicol.Assess., 3. 1988, pp. 331–343

⁹⁹STRATTON, J. GILES. Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. Bull. Environ. Contam.Toxicol., 44.1990, pp. 420–427

Moreno *et al.*¹⁰⁰, las directrices estándar de inhibición del crecimiento de las algas también utilizan densidades demasiado altas, en su mayoría 10.000-1.000.000cél.mL⁻¹. De acuerdo con los autores, este parámetro, es muy importante pues en sus estudios observaron que la sensibilidad de las pruebas de toxicidad aumenta con una disminución en la densidad celular inicial y por otro lado, se refieren a la existencia de un fenómeno conocido como el efecto de la biomasa en donde la toxicidad del cobre disminuyó a medida que la concentración de células en suspensión aumentaba. En base a esto, afirman que las pruebas de toxicidad deben utilizar densidades celulares iniciales más bajas para desarrollar las pruebas con densidades que reflejen más fielmente las que se encuentran en los sistemas acuáticos (100-1.000cél.mL⁻¹);no obstante hasta la fecha el uso de estas bajas densidades celulares no se ha especificado en las pruebas estándar debido a la dificultad de recuento.

5.2 BIOENSAYOS DE TOXICIDAD

- 5.2.1 **Establecimiento de las condiciones generales y protocolo de los bioensayos:** Teniendo en cuenta que para *I. galbana* no existe un reporte detallado del protocolo a seguir para evaluar ensayos de toxicidad, se establecieron las condiciones generales, a partir de todos los bioensayos realizados, como resultado del proceso de estandarización de las metodologías aplicadas (Tabla 8), cuyo procedimiento detallado se indica en el diagrama de flujo del Anexo 8.

Cada prueba realizada fue de tipo estático sin renovación, de acuerdo con la EPA¹⁰¹, en estos ensayos los organismos se exponen a la misma solución durante un período de tiempo establecido, resultan sencillas, baratas y rentables, con poco uso de recursos (espacio, mano de obra, equipos). Esto permitió llevar a cabo una mayor cantidad de bioensayos en la misma cantidad de tiempo, considerando que el número de muestras que se debieron manipular para cada prueba estuvo entre 30 a 35 recipientes.

¹⁰⁰MORENO, I., LUBIÁN, L.M. and SOARES, A.M.V.M. Op. cit., p. 112-116.

¹⁰¹UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.6

Tabla 8. Condiciones generales establecidas para realizar experimentos de toxicidad a 72h con la microalga *Isochrysis galbana*.

Tipo de ensayo	Estático, sin renovación
Duración	72h
Iluminación	Artificial con lámparas de luz blanca de 30W
Intensidad lumínica	1.444±68,57lux
Fotoperiodo	Iluminación continua (24h luz, 0h oscuridad)
Temperatura	21-23,5°C
Oxígeno	≥5mg.L ⁻¹
Salinidad	35±0,5
Aeración	No, agitación manual tres veces al día
Recipientes de prueba	Frascos de vidrio de 500mL de fondo plano
Volumen total de cada unidad experimental	150mL
Edad del cultivo madre	Cuatro días (fase exponencial de crecimiento)
Densidad mínima requerida en el cultivo madre	≥1x10 ⁷ cél.mL ⁻¹
Concentración inicial de inóculo	500.000cél.mL ⁻¹
Concentraciones a evaluar	El CV%inicial promedio entre tratamientos debe ser ≤5% Mínimo cinco, más un control negativo y uno positivo
Control positivo	Cl _{50-72h} a partir de una solución de CuSO ₄ .5H ₂ O conocida.
Réplicas por concentración	Cinco
Factor de dilución	≥0,5
Efecto medido	Inhibición del crecimiento celular (%I), calculado a partir de la densidad celular (cél.mL ⁻¹)
Periodicidad de las mediciones	0 y 72 h
Criterio de aceptación de la prueba	La densidad celular en el control negativo al finalizar la prueba (72h) debe ser ≥3x10 ⁶ cél.mL ⁻¹
Coeficiente de variación en los conteos	≤15% entre réplicas de un mismo tratamiento.
Resultado final	Cl _{50-72h}

De acuerdo con ASTM¹⁰², una prueba de 72 o 96h permite evaluar varias generaciones de microalgas en un corto periodo de tiempo como es el caso de *I. galbana*, cuyo ciclo de vida es cercano a las 30 horas según Kaplan *et al.*¹⁰³, por tanto, se denominan pruebas crónicas a corto plazo. Para el programa NPDES¹⁰⁴ esto implica algunas ventajas ya que proporcionan una estimación más directa de las concentraciones seguras

¹⁰² AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., p. 8

¹⁰³ KAPLAN, D., COHEN, Z. y ABELIOVICH, A. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *En*: Biomass 9, July, 1985. No. 1, p. 37 - 48.

¹⁰⁴ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.3

de efluentes en aguas receptoras que la proporcionada por ensayos de toxicidad aguda, a un menor esfuerzo si se compara con los bioensayos crónicos que se hacen con animales en los que se evalúa la toxicidad en un ciclo de vida completo más largo. Por otra parte la EPA¹⁰⁵ afirma que las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se pueden degradar o volatilizar rápidamente y la inhibición en el crecimiento de las microalgas puede ser detectable sólo durante los primeros uno o dos días en el ensayo, por lo tanto se consideró trabajar en un periodo no mayor a 72h.

Se utilizó iluminación artificial con tubos fluorescentes de luz blanca de 30W, considerando el criterio de Lavens y Sorgelos¹⁰⁶ quienes afirman que los tubos fluorescentes emiten un espectro de luz entre el rojo y el azul, siendo esta la porción más activa del espectro utilizado para la fotosíntesis.

Los recipientes empleados cumplieron con el requerimiento establecido por Velasco *et al.*¹⁰⁷, quienes afirman que para el cultivo de *I. galbana*, estos deben ser de materiales no tóxicos, preferiblemente lisos y de fondo plano para evitar la sedimentación de las microalgas. Rojièková *et al.*¹⁰⁸, compararon los cultivos utilizando tubos de polietileno de 15mL y erlenmeyers en vidrio de borosilicato de 50 ó 100mL, utilizando 12 sustancias químicas y ocho muestras ambientales, encontrando que la técnica con tubos era comparable a la técnica con erlenmeyers ($p < 0.05$) y que las dos presentaban ventajas y desventajas. En la técnica con tubos, el área superficial y la cantidad de volumen total del bioensayo permite la adherencia de algunos químicos en las paredes del tubo de polietileno, de esta forma se obtenían valores superiores de CE_{50} comparado con los erlenmeyers, estableciendo que el ensayo con tubos es conveniente cuando se van a evaluar muestras que contienen sustancias volátiles y que la agitación en el ensayo con recipientes de fondo plano como los erlenmeyers es homogénea y garantiza el intercambio de gases (CO_2 y O_2), el cual es un punto crítico de control durante el bioensayo; además en estos últimos las microalgas pueden interactuar más con la muestra gracias al volumen que se maneja, siendo más parecidos a los utilizados en este estudio, aunque de un volumen mayor.

Los bioensayos llevados a cabo cumplen con los criterios de calidad establecidos por entidades encargadas de la estandarización de pruebas

¹⁰⁵ Ibid, p.191

¹⁰⁶ LAVENS, P y P. SORGELOOS. Op. cit., 295 p.

¹⁰⁷ VELASCO L.A., S. CARRERA y J. BARROS. Op. Cit., pp. 31-63.

¹⁰⁸ ROJIÈKOVÁ, R., DVOOÁKOVA, D. and MARSALEK, B. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the Standard fish assay. *En: environmental toxicology Water Quality*. 1998. No. 13, p. 235 - 241.

de toxicidad a nivel internacional como la OCDE, EPA, ASTM, quienes consideran inaceptable una prueba si se presentan una o más de las siguientes situaciones: todos los recipientes de ensayo y tapas no fueron idénticos, los tratamientos no fueron asignados al azar, un medio de crecimiento requerido o de control no fue incluido en cada uno de los bioensayos, trabajar con menos de tres réplicas por tratamiento, si los organismos de prueba no se cultivaron previamente en las instalaciones por lo menos durante las últimas dos semanas antes de la prueba¹⁰⁹. Estos aspectos muestran, teniendo en cuenta las condiciones de la Tabla 8, que los bioensayos se ajustaron a los criterios de calidad establecidos internacionalmente.

Para que una prueba tenga validez según la EPA¹¹⁰, la densidad celular al final de cada ensayo en el tratamiento control debe ser igual o superior a $200.000\text{cél.mL}^{-1}$ sin EDTA y mayor a $1 \times 10^6\text{cél.mL}^{-1}$ con EDTA, sin más del 20% de CV entre réplicas, de la misma manera que se estableció en este estudio, obteniendo al finalizar cada prueba definitiva una densidad $\geq 3 \times 10^6\text{cél.mL}^{-1}$ en los tratamientos control, con CV% entre réplicas menores al 15%.

Este estudio se fundamenta en que cuando una población microalgal se encuentra en condiciones propicias para su desarrollo, es capaz de aumentar su tamaño poblacional, por lo que en dichas condiciones es posible detectar si los productos problema o muestras a analizar, producen inhibición en su crecimiento y esta respuesta se puede evaluar como un indicador del estrés al cual están sujetas las poblaciones¹¹¹.

De acuerdo con la Organización para la Cooperación Económica (O.E.C.D.)¹¹², en las últimas dos décadas se han desarrollado protocolos internacionales estandarizados que cubren las exigencias científicas y prácticas para realizar ensayos de toxicidad con diferentes tipos de organismos marinos como peces, erizos, misidáceos y microalgas. En cuanto a este último grupo, existen algunos protocolos utilizados rutinariamente por agencias de protección ambiental en países como Estados Unidos, Canadá, Francia y Alemania, que son requeridos legalmente por la Comunidad Europea; sin embargo, debido a que las especies propuestas en los protocolos internacionales no son las mismas que se cultivan en Colombia, es importante evaluar el efecto de los

¹⁰⁹Ibid., p.34

¹¹⁰UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.192

¹¹¹MARTÍNEZ, J. Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas. [En línea]. Disponible en internet: <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap6.pdf>>

¹¹²ORGANIZATION FOR ECONOMIC DEVELOPMENT. Alga growth inhibition test: Test Guideline. En: Guidelines for Testing of Chemicals. June, 1984. No. 201, p. 2-14

contaminantes sobre otras especies como la microalga *I. galbana*. Ello, teniendo en cuenta que la E.P.A.¹¹³ sugiere que algunas especies pueden ser más sensibles que las especies recomendadas en sus manuales.

5.2.2 **Determinación de la Concentración de Inhibición media (CI_{50-72h}) del sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia y elaboración de la carta control.**

5.2.2.1 **Bioensayos preliminares (Screening test):** Previa la realización de los bioensayos preliminares y definitivos, se llevaron a cabo 10 bioensayos que presentaron fallas de manejo, conteo celular, cambios de temperatura, por lo que no se tuvieron en cuenta en la búsqueda de rangos, pero fueron útiles para ir estandarizando las técnicas de manejo y experticia de la investigadora. En la Tabla 9 se presentan los cinco bioensayos preliminares realizados posteriormente y sus ajustes para llegar a las concentraciones definitivas a evaluar, cumpliendo con los criterios de la EPA¹¹⁴, la cual afirma que previo a la realización de los ensayos definitivos, es necesario realizar experimentos preliminares para determinar la concentración del contaminante capaz de causar un efecto sub-letal a los organismos. Todos los bioensayos presentaron un control negativo con porcentajes de inhibición de 0%, los cuatro primeros se realizaron en un menor tiempo (48h), siguiendo los lineamientos de la EPA¹¹⁵, que da a conocer que la duración de las pruebas preliminares podrían llevarse a cabo en un periodo de tiempo generalmente menor que las definitivas y cuando se encuentren resultados satisfactorios proceder a realizar la prueba final, por lo cual, el quinto bioensayo, se realizó ya en el periodo establecido para las pruebas definitivas (72h).

La búsqueda de rangos inicial se realizó entre los 6,25 a 100mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O (Bioensayo 1) y de acuerdo con los resultados obtenidos las concentraciones se fueron modificando hasta obtener una respuesta escalonada en los porcentajes de inhibición entre 0-100% con cinco concentraciones definitivas: 30, 50, 70, 80, 90 y 100mg.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O (Tabla 9). Se destaca además que la precisión y manejo de los protocolos fue mejorando con el transcurrir de los bioensayos como se observa en los CV%, los cuales a excepción del bioensayo 1 y de la concentración de 45mg.L⁻¹ en el bioensayo 3 se encontraron entre 1 y 11%, lo que permite resaltar que la variabilidad de los bioensayos fue pequeña, pues según

¹¹³UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed,Op. cit., p. 21

¹¹⁴Ibid., p.188

¹¹⁵Ibid., p. 188.

Robles¹¹⁶; un valor de CV% entre 0 y 20% es bueno y corrobora la reproducibilidad de la técnica.

Tabla 9. Búsqueda de rangos o *screening test* realizados con *I. galbana*, utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia a diferentes concentraciones.

DURACIÓN	ENSAYO	TRATAMIENTO	%I ^{1*}	CV% ^{2*}	OBSERVACIONES
48 h	Bioensayo 1	Control	0	-	- %I negativos en tratamientos <50mg.L ⁻¹ indicando un mayor crecimiento con respecto al control. - T-50mg.L ⁻¹ con 16%I y T-100mg.L ⁻¹ con inhibición total, implicando necesidad de búsqueda de respuesta inhibitoria en el intervalo de 50 a 100% para un próximo bioensayo. - CV% hasta 50mg.L ⁻¹ altos (>15%). - Bioensayo no viable.
		6,25	-18	29,4	
		12,5	-24	37,4	
		25	-14	23,9	
		50	16	74,6	
		100	100	1,7	
48 h	Bioensayo 2	Control	0	-	- T-50mg.L ⁻¹ presenta un %I >50%, lo que implica evaluar concentraciones menores que generen %I más cercanos a cero en un próximo bioensayo. - T- 80mg.L ⁻¹ con un %I cercano a 100% - CV% <15% en todas las concentraciones, indicando un mejor resultado de los conteos entre réplicas. - Bioensayo no viable.
		50	53	11,0	
		60	69	4,9	
		70	90	4,2	
		80	99	1,1	
		90	118	1,4	
		100	119	1,0	
48 h	Bioensayo 3	Control	0	-	- En T-45 mg.L ⁻¹ , el CV% >15%, implicando la evaluación de las mismas concentraciones en un próximo bioensayo con el propósito de confirmar las respuestas inhibitorias obtenidas. - Bioensayo no viable
		45	32	26,2	
		55	46	13,6	
		65	53	7,2	
		75	73	6,1	
		85	82	5,7	
48 h	Bioensayo 4	Control	0	-	- CV% en todas las concentraciones evaluadas <15%, sin embargo, el %I más bajo fue de 38%, considerando adicionar concentraciones por debajo de 45 mg.L ⁻¹ en un próximo bioensayo para obtener %I más cercanos a 0. -Teniendo en cuenta que en el bioensayo 3, el %I para T-85 mg.L ⁻¹ fue de 82 con CV% de 5,7% y en el bioensayo 4 el %I de 100 con CV% de 5,95%, se consideró plantear concentraciones alrededor de 80 mg.L ⁻¹ y superiores a 85mg.L ⁻¹ buscando obtener %I más cercanos a 100% - Bioensayo no viable
		45	38	9,24	
		55	56	7,46	
		65	65	1,15	
		75	87	8,78	
		85	100	5,95	

¹¹⁶ROBLES, J.R. Metodología para el diseño de bioensayos en toxicología acuática. Tesis de posgrado en Estadística. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 1998.

DURACIÓN	ENSAYO	TRATAMIENTO	%I ^{1*}	CV% ^{2*}	OBSERVACIONES
72 h	Bioensayo 5	Control	0	-	- Teniendo en cuenta las respuestas de Inhibición y las consideraciones de los bioensayos 1 al 4, se plantearon concentraciones para evaluarse ya en el periodo de tiempo en que se llevarán a cabo los bioensayos definitivos (72h). - Se registraron los %I deseados cercanos a 0 y 100% inhibición, estableciendo estas concentraciones como definitivas para las pruebas, siendo necesaria la confirmación de estos resultados con dos bioensayos posteriores, evaluando las mismas concentraciones en las mismas condiciones. - Bioensayo viable.
		30	17	20,5	
		50	32	10,7	
		70	54	6,4	
		80	85	4,6	
		90	100	2,7	
		120	100	1,2	

*Los valores son expresados como el promedio de cinco réplicas.

1. %I: Porcentaje de inhibición; 2. CV%: Coeficiente de variación.

En todos los bioensayos preliminares realizados con el tóxico de referencia, el oxígeno inicial estuvo por encima de los 5mg.L⁻¹, reflejándose un aumento en todos los tratamientos al final de los experimentos y cumpliendo con los parámetros establecidos por la EPA¹¹⁷ como requisito para dar inicio a los mismos. Los valores de pH iniciales oscilaron entre 7,37-8,86, con tendencia a aumentar entre 8,25-y 9,37 a excepción de las concentraciones de 90 y 100mg.L⁻¹ en el bioensayo 2, donde disminuyó levemente. La temperatura se encuentra dentro del rango establecido en la metodología (21-23,5°C), a excepción de la final en el bioensayo 1 que registró los valores más altos (23,83 a 24,17°C) por fallas en el aire acondicionado. La salinidad no alcanzó variaciones mayores a 0,37 entre el inicio y el final de los experimentos, encontrándose entre 34,70 a 35,60 UPS (Tabla 10).

5.2.2.2 **Bioensayos definitivos:** Se llevaron a cabo tres bioensayos definitivos con el propósito de confirmar los resultados y demostrar la estandarización de la técnica mediante análisis estadístico. Las pruebas de normalidad indicaron el rechazo de la hipótesis nula ($p \leq 0,05$), por lo cual se concluye que no provienen de una población con distribución normal, sin embargo, considerando el Teorema Central del Límite que afirma que cuando n es grande, como en el caso de estos ensayos, las distribuciones de probabilidad, cualesquiera que sean se aproximan a la normal¹¹⁸.

¹¹⁷ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p. 188

¹¹⁸ IMUES, M. Op. Cit., 291 p.

Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos iniciales y finales, en las pruebas de *screening test* utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.

Bioensayo	Tratamiento	Oxígeno (mg.L ⁻¹)		pH		Temperatura (°C)		Salinidad (UPS)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	Control	5,90	11,80	8,70	9,35	22,60	24,00	34,70	35,07
	CuSO ₄ -100	6,47	9,45	8,28	8,38	22,40	23,83	34,90	35,03
	CuSO ₄ -50	6,27	11,14	8,68	9,24	22,27	23,90	34,90	35,17
	CuSO ₄ -25	6,13	11,41	8,86	9,34	22,30	23,80	35,00	35,23
	CuSO ₄ -12,5	6,02	11,53	8,83	9,31	22,37	23,83	34,90	35,10
	CuSO ₄ -6,25	5,90	13,01	8,83	9,37	22,40	24,17	35,00	35,10
2	Control	6,16	11,26	8,78	9,35	22,57	22,10	35,60	35,50
	CuSO ₄ -100	6,21	7,98	8,39	8,25	22,83	22,17	35,50	35,57
	CuSO ₄ -90	5,72	9,32	8,46	8,34	22,47	22,10	35,60	35,50
	CuSO ₄ -80	5,75	10,94	8,65	8,88	22,30	21,70	35,50	35,60
	CuSO ₄ -70	5,87	11,17	8,76	9,07	22,20	22,33	35,50	35,57
	CuSO ₄ -60	5,55	11,13	8,85	9,19	22,50	22,37	35,60	35,60
3	Control	6,91	13,26	7,79	9,13	22,63	22,18	35,3	35,04
	CuSO ₄ -45	6,62	13,03	8,06	9,13	22,03	22,42	35,1	34,98
	CuSO ₄ -55	6,26	13,41	8,05	9,01	21,71	22,26	35,1	34,98
	CuSO ₄ -65	6,05	13,08	8,07	8,93	22,16	22,48	35,1	35,05
	CuSO ₄ -75	6,74	12,59	8,10	8,80	22,16	22,78	35,3	35,13
	CuSO ₄ -85	7,10	12,10	8,08	8,74	22,19	22,36	35,3	35,04
4	Control	8,12	12,05	7,72	9,08	21,67	22,94	35,30	35,18
	CuSO ₄ -45	8,32	12,50	7,66	9,08	21,90	21,90	35,30	35,18
	CuSO ₄ -55	8,07	13,07	7,67	8,96	22,04	21,94	35,20	35,22
	CuSO ₄ -65	8,01	13,44	7,67	8,76	21,99	22,66	35,30	35,20
	CuSO ₄ -75	7,79	13,07	7,55	8,62	21,83	22,38	35,20	35,20
	CuSO ₄ -85	7,7	11,93	7,37	8,26	22,13	22,10	35,30	35,18

En cuanto al supuesto de homogeneidad de varianzas, con la prueba de Bartlett se observó que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las varianzas de la Tasa Específica de Crecimiento (TEC) de los tratamientos. El supuesto de independencia verificado mediante la prueba de Durbin-Watson, indicó una auto-correlación serial ($p \leq 0,05$), a pesar de la transformación de la variable mediante el modelo logarítmico TEC y posterior ajuste con el modelo Arcoseno (Y); sin embargo, esto se da en series de tiempo cortas, donde el efecto serial no se observa durante un ciclo completo, (solo se evaluó la toxicidad a 72h). De todas maneras se puede asegurar la independencia por la aplicación del modelo de

transformación TEC que ha demostrado su eficiencia en estos casos¹¹⁹(Anexo 9)

No existen diferencias significativas entre las TEC de los tres bioensayos definitivos ($p > 0,05$), demostrando la correcta estandarización del protocolo, así mismo no hay diferencias significativas entre las réplicas de un mismo tratamiento ($p > 0,05$), certificando su correcta manipulación durante los ensayos y conteos (Anexo 10). La TEC se ve reducida de manera significativa ($p \leq 0,05$), a medida que aumenta la concentración de sulfato de cobre penta-hidratado, presentando una TEC negativa en concentraciones mayores de 90mg.L^{-1} , lo cual indica una reducción de la población menor a la densidad inicial de siembra ($500.000 \text{cél.mL}^{-1}$) (Tabla 11 y Anexo 11).

Tabla 11. Tasa específica de crecimiento (TEC) de los bioensayos definitivos, a diferentes concentraciones de sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia. Los valores están expresados como el promedio de tres bioensayos \pm D.E.

Tratamientos	TEC	D.E.
Control	0,2608 ^a	0,0084
30	0,2363 ^b	0,0144
50	0,2129 ^c	0,0085
CuSO4 (mg.L⁻¹) 70	0,1692 ^d	0,0130
80	0,0849 ^e	0,0158
90	-0,0023 ^f	0,0117
120	-0,1690 ^g	0,0124

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

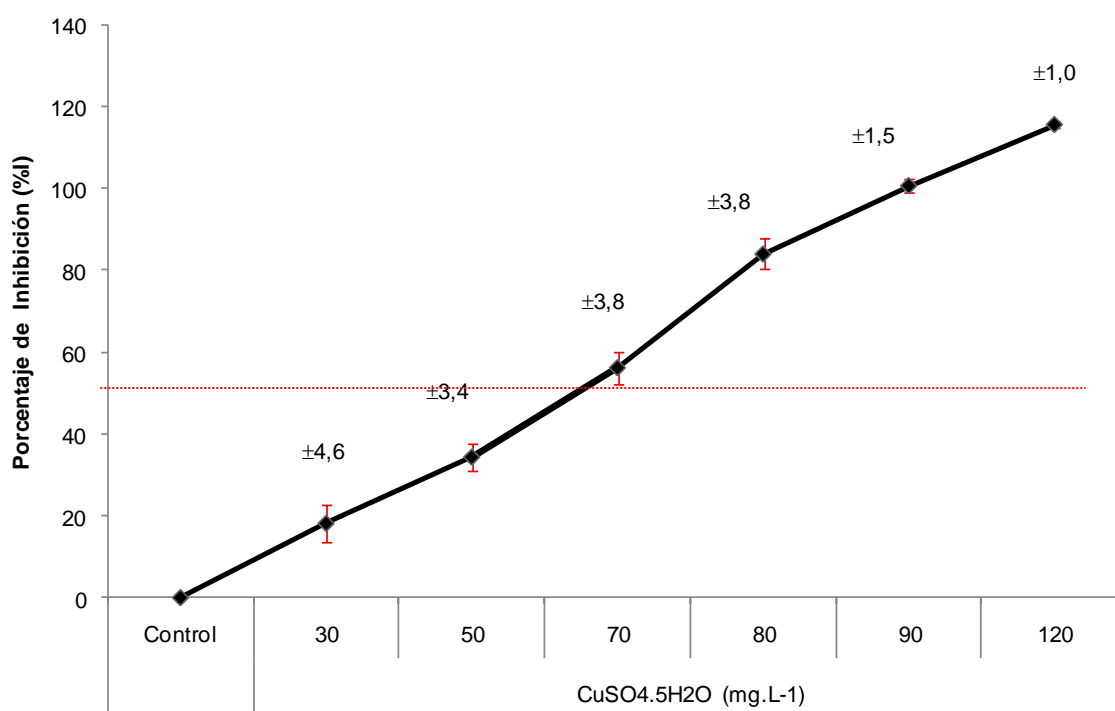
Figura 12 En la Figura 12, se observa una relación directamente proporcional entre los porcentajes de inhibición promedio de los ensayos definitivos y las concentraciones evaluadas, pues a mayor concentración de tóxico mayor porcentaje de inhibición; adicionalmente se evidencia que la concentración de sulfato de cobre penta-hidratado que inhibe el crecimiento en un 50% está alrededor de los 70mg.L^{-1} y que a partir de 90mg.L^{-1} la inhibición es total, lo cual coincide con los criterios que establece Martínez¹²⁰ quien afirma que en el bioensayo definitivo, la concentración mayor deberá inhibir completamente el crecimiento.

¹¹⁹Ibid., 291 p.

¹²⁰MARTÍNEZ, J. Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas.[En línea]. Disponible en internet: <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap6.pdf>>

En los controles negativos se observó siempre el buen estado de las microalgas, cumpliendo con los criterios establecidos por Velasco *et al.*¹²¹, la calidad del agua utilizada para las diluciones y en general las condiciones y protocolos establecidos para el desarrollo de cada bioensayo (Figura 12)

Figura 12. Porcentaje de inhibición (%) del crecimiento poblacional de *Isochrysis galbana* a diferentes concentraciones, usando sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) como tóxico de referencia. Los valores están expresados como el promedio de tres ensayos \pm D.E. La línea roja indica el 50% del %I.



En la Tabla 12, se especifican los valores promedio de los parámetros físico-químicos medidos en los tres bioensayos definitivos, con los cuales se aplicó análisis estadístico como parte del proceso de estandarización de la metodología, estableciendo que no existen diferencias significativas entre bioensayos ($p > 0,05$) tanto en los valores iniciales como en los finales registrados, demostrando que la respuesta de las microalgas en cada uno de estos fue similar.

Los valores de oxígeno inicial fueron altos ($10,41-11,84 \text{ mg.L}^{-1}$), coincidiendo con uno de los requisitos que establece la EPA¹²² para

¹²¹ VELASCO L.A., S. CARRERA y J. BARROS. Op. cit., p. 31-63

¹²² UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.188

asegurar el crecimiento de las microalgas, el cual deberá ser $>5\text{mg.L}^{-1}$, no obstante, el tratamiento control y $\text{CuSO}_4\text{-30}$ presentaron las concentraciones más altas que fueron significativamente mayores del resto de tratamientos ($p\leq 0,05$). A medida que aumentó el nivel de tóxico entre 50 a $120\text{mg.L}^{-1}\text{-CuSO}_4$, el oxígeno disminuyó de manera significativa ($p\leq 0,05$), sin embargo, se mantuvo siempre dentro del rango ideal para iniciar con los bioensayos (Tabla 12, Anexo 12).

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos iniciales y finales promedio de las pruebas definitivas, utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.

Tratamiento	Oxígeno (mg.L^{-1})		pH		Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		Salinidad	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Control	11,84 ^a	15,55 ^a	7,48 ^a	9,09 ^a	21,57 ^a	22,17 ^a	35,21 ^a	35,21 ^a
$\text{CuSO}_4\text{-30}$	11,77 ^a	14,03 ^b	7,49 ^a	9,10 ^a	21,50 ^a	22,18 ^a	35,21 ^a	35,23 ^a
$\text{CuSO}_4\text{-50}$	11,48 ^b	13,77 ^b	7,32 ^b	9,04 ^a	21,51 ^a	22,03 ^a	35,23 ^a	35,23 ^a
$\text{CuSO}_4\text{-70}$	11,12 ^c	14,02 ^b	7,19 ^c	8,86 ^b	21,49 ^a	22,32 ^a	35,23 ^a	35,05 ^a
$\text{CuSO}_4\text{-80}$	10,79 ^d	13,65 ^b	7,13 ^d	8,68 ^c	21,45 ^a	22,26 ^a	35,27 ^a	35,27 ^a
$\text{CuSO}_4\text{-90}$	10,57 ^e	12,74 ^c	7,10 ^d	8,56 ^d	21,68 ^a	22,39 ^a	35,23 ^a	35,24 ^a
$\text{CuSO}_4\text{-120}$	10,41 ^f	10,64 ^d	6,99 ^e	8,10 ^e	21,42 ^a	22,19 ^a	35,27 ^a	35,27 ^a

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p\leq 0,05$).

Por otra parte, todas las concentraciones finales fueron más altas que las iniciales ($10,64\text{-}15,55\text{mg.L}^{-1}$), siendo significativamente mayor en el tratamiento control ($p\leq 0,05$), seguido por las concentraciones entre 30 a $80\text{mg.L}^{-1}\text{-CuSO}_4$ que no presentaron diferencias y disminuyendo de manera significativa ($p\leq 0,05$) a 90 y $120\text{mg.L}^{-1}\text{-CuSO}_4$ (Tabla 12 y Anexo 13), observándose una relación inversa entre el oxígeno con respecto al porcentaje de inhibición y la cantidad de tóxico, donde a medida que la concentración de tóxico aumentó, también lo hizo el porcentaje de inhibición, pero el nivel de oxígeno disminuyó. Lo cual se debe, de acuerdo con UAM¹²³ a que el oxígeno se acumula durante el proceso de fotosíntesis y es mayor donde hay mayor productividad, por ende, en las concentraciones más bajas de tóxico, donde la densidad celular de las microalgas fue mayor se encontró un nivel de oxígeno superior.

Los valores de pH partieron de 6,99-7,49, coincidiendo con Torrenta y Tacon¹²⁴ quienes afirman que la mayoría de especies de microalgas cultivadas se mantienen en un rango entre 7-9. Al final de los bioensayos el pH aumentó en todos los tratamientos entre 8,10-9,10, considerándose aún cercano al rango establecido por los mismos autores. El pH inicial en

¹²³UAM. Técnicas polarográficas: determinación de fotosíntesis y respiración en suspensiones celulares de cianobacterias. [En línea]. Disponible en Internet: <http://www.uam.es/docencia/LAVanFis/FR/GuionFR.pdf>

¹²⁴ TORRENTA, L. Y A. TACON. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. Brasil, FAO, 1989. pp.12-90

los tratamientos control y CuSO_4 -30 es significativamente más alto que en el resto ($p \leq 0,05$) y a medida que aumenta la concentración de tóxico el pH disminuye de manera significativa a excepción de los tratamientos CuSO_4 -80 y CuSO_4 -90 en donde no hubo diferencias para este parámetro (Tabla 12 y Anexo 14). El mismo comportamiento se observa en los pH finales, para el tratamiento control, CuSO_4 -30 y CuSO_4 -50 que fueron similares, pero comienzan a ser significativamente menores ($p \leq 0,05$) a partir de CuSO_4 -70 (Tabla 12 y Anexo 15).

La relación directamente proporcional que se encontró entre la densidad celular de las concentraciones y el pH también ha sido reportada para otras microalgas como *Chlorella sorokiniana*¹²⁵, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella autotrophica*, *Cylindrotheca sp.* y *Cocchochlorisela bens*¹²⁶. Esta relación puede ser explicada por dos sucesos: 1) La actividad fotosintética hace disminuir la concentración de CO_2 en el medio lo que hace que el sistema tampón $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ se altere y se incremente el pH. 2) La absorción del nitrógeno necesario para el crecimiento de las microalgas resulta en un incremento del pH del medio.¹²⁷

La temperatura inicial para los tres bioensayos osciló entre 21,42 a 21,57°C y la final aumentó entre 22,03-22,39°C, encontrándose dentro del rango establecido en la metodología (21-23,5°C), sin presentarse diferencias significativas de bioensayos ($p > 0,05$) entre los valores iniciales o finales, ni entre tratamientos (Tabla 12, Anexo 16 y Anexo 17), asegurando las mismas condiciones de temperatura para todas las unidades experimentales y coincidiendo con los criterios que establece ASTM¹²⁸, que afirma que la diferencia entre la mayor y menor medida de temperatura no deberá exceder los 4°C para eliminar los factores que podrían afectar los resultados dentro de los recipientes de ensayo y por lo tanto, los resultados de la prueba. En este sentido, la temperatura en todos los recipientes de ensayo debe ser lo más similar posible a menos que el propósito de la prueba sea estudiar su efecto.

La salinidad presentó variaciones muy pequeñas que van de 35,21 a 35,27 UPS (Tabla 12), sin presentarse diferencias significativas entre los valores iniciales y finales ($p > 0,05$) (Tabla 12 y Anexo 18), por lo cual se podría establecer que este parámetro no se vio afectado por la evaporación y además se encontró en el rango establecido por Ospina et

¹²⁵ MORONTA, R. Y E. MORALES. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. En: Rev.Fac. Agron. Enero, 2006. Vol. 23.no.1. p. 27-41.

¹²⁶ ARMSTRONG, J.E. Y J.A. CALDER. Inhibition of light-induced pH increase and O_2 evolution of marine microalgae by water-soluble components of crude and refined oils. En: Appl. Environ. Microbiol. Mayo, 1978. Vol. 35. p. 858-862.

¹²⁷ LOURENÇO, S.O., et. al. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. Comparison of two culture media. En: Aquaculture. Agosto, 1996. Vol. 148. p. 153-168.

¹²⁸ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., p. 7

al.¹²⁹, para el cultivo de *I. galbana* (34-37 UPS). Al no existir diferencias significativas de los valores de salinidad entre concentraciones y entre valores finales e iniciales, puede afirmarse que está no influenció en gran medida la respuesta obtenida en el crecimiento celular de *I. galbana*, considerando además que no existieron valores extremos de salinidad, pues estos afectan negativamente las tasas de fotosíntesis, respiración y crecimiento de las microalgas marinas¹³⁰. Los valores de salinidad de los bioensayos son cercanos a los valores utilizados por Renaud y Parry¹³¹ en el cultivo de *I. galbana*, donde a 35 UPS obtienen buenos crecimientos las microalgas.

5.2.2.3 **Cálculo del CI_{50-72h} para la obtención de una carta control en el LABBIP con el tóxico de referencia:** Al calcular los valores de CI_{50-72h} para cada uno de los ensayos definitivos, se observó que la concentración promedio de tóxico a la cual se inhibe el 50% de la población de *I. galbana* fue de $58,15\text{mg.L}^{-1}$ con un CV% muy bajo entre bioensayos (<2%) (Tabla 13), los cuales tienden a aumentar un poco más al tener en cuenta dos desviaciones estándar como lo establece Castillo¹³² para la presentación de los resultados (Figura 13)

Tabla 13. Carta control de *I.galbana* utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.

ENSAYOS	CI_{50-72h} (mg.L^{-1})	Límite inferior (mg.L^{-1})	Límite superior (mg.L^{-1})
1(Anexo 19)	59,46	55,13	64,14
2(Anexo 20)	57,41	53,4	62,14
3 (Anexo 21)	57,59	53,22	62,76
Promedio	58,15	53,92	63,01
D.E.	1,14	1,05	1,02
CV%	1,95	1,96	1,62

La EPA¹³³ determina que es responsabilidad de un laboratorio demostrar su capacidad para obtener resultados consistentes y precisos con sustancias tóxicas de referencia, antes de realizar las pruebas de toxicidad con una muestra problema o efluente para fines de cumplimiento de criterios de calidad. La precisión intra-laboratorio, expresado como

¹²⁹OSPINA, G.H. *et al.* Op. Cit., .p. 43.

¹³⁰ LOBBAN, C.S., P.J. HARRISON Y M.J. DUNCAN. Op. cit., 200 p.

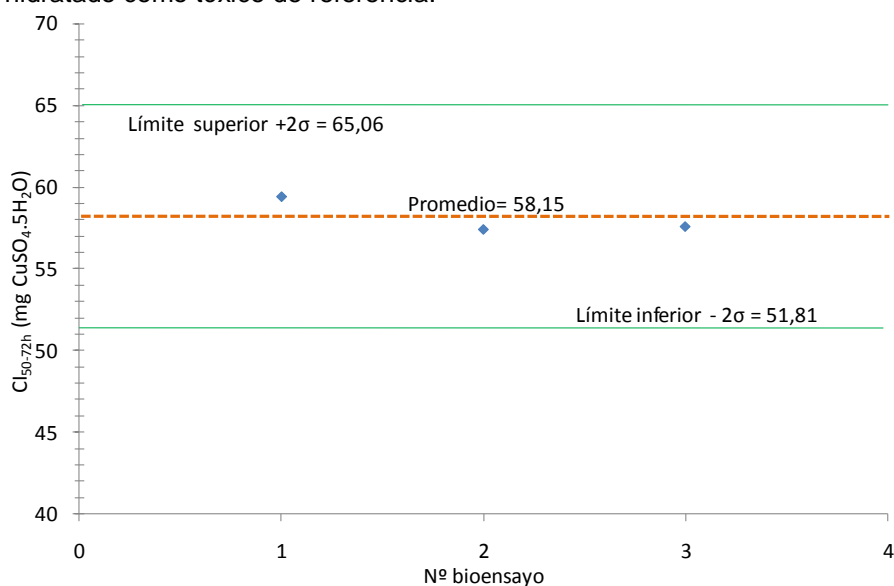
¹³¹RENAUD, S.M. Y D.L. PARRY. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *En*: J. Applied Phycology. 1994. Vol. 6. P. 347-356.

¹³² CASTILLO. Op. Cit., p. 58

¹³³UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed,Op. cit., p.14

porcentaje de coeficiente de variación (CV%), de cada tipo de prueba a utilizar, debe ser determinada mediante la realización de varios bioensayos, con diferentes lotes de organismos de prueba, utilizando el mismo tóxico de referencia, en las mismas concentraciones, con las mismas condiciones de prueba es decir, duración del ensayo, tipo de agua de dilución, edad de los organismos de prueba, nutrientes y el análisis de datos con los mismo métodos. Teniendo en cuenta lo anterior, el efecto de *I. galbana* a al tóxico de referencia, expresado a través de los valores de Cl_{50} encontrados, evidencian la estabilidad de su respuesta biológica, pues el CV es <2%. Este resultado es mucho menor al encontrado por Robles¹³⁴ quien presentó un CV del 22% en el alga dulceacuícola en *S. capricornutum*.

Figura 13. Carta control para *I. galbana* utilizando sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia.



Debido a su alta capacidad de contaminación en el medio marino, los metales son un grupo frecuentemente evaluado en la literatura, los efectos tóxicos en algas han sido un tema estudiado por muchos investigadores durante las últimas décadas¹³⁵. De acuerdo con Barón *et al.*¹³⁶, varios metales son esenciales para los organismos vivos a muy bajas concentraciones, el cobre pertenece a la categoría de "metales esenciales" y participa en actividades de crecimiento, metabolismo y

¹³⁴ ROBLES, J.R. Op.cit., p. 35

¹³⁵ BARÓN, M., ARELLANO, J. and LÓPEZ, G. Op. cit., p7

¹³⁵ THOMAS, W.H. and SEIBERT, D.L.R. Op. cit., p.24.

¹³⁵ SUNDA, W.G. and LEWIS, J.A.M. Op. cit., p.874.

¹³⁶ BARÓN, M., ARELLANO, J. and LÓPEZ, G. Op. cit., 12 p.

enzimas. El sulfato de cobre penta-hidratado es utilizado en la preparación del medio nutritivo Guillard F/2 para el cultivo de microalgas en laboratorio, como lo expresan Guillard¹³⁷, Lavens y Sorgeloos¹³⁸ y Velasco *et al.*¹³⁹, lo que explicaría en este estudio que a concentraciones entre 6,25 y 25mg.L⁻¹, se presentasen crecimientos superiores que en el tratamiento control, como ocurrió en el primer bioensayo realizado en las pruebas de búsqueda de rangos (Tabla 9).

En contraste, la mayoría de los metales en altas concentraciones son tóxicos y tienen una influencia directa y negativa en diversos procesos fisiológicos y bioquímicos. El cobre se ha convertido en un contaminante generalizado debido a su uso en la agricultura como algicida y fungicida, siendo uno de los metales más tóxicos para algunas microalgas; la Pontificia Universidad Javeriana¹⁴⁰ ha determinado en estudios sobre sus efectos ecológicos, específicamente en lo referente a toxicidad ambiental, que el sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) es un material muy tóxico para la vida acuática, indicando valores de CI_{50-72h} en microalgas como *S. capricornutum* <1mg.L⁻¹. En Costa Rica el Instituto regional de estudios en sustancias tóxicas¹⁴¹ reporta valores de CI₅₀ (96-120h) para CuSO₄.5H₂O en dos especies de microalgas de agua dulce *S. capricornutum* (0,044-0,048mg.L⁻¹) y *Pseudokirchneriella subcapitata* (12,3mg.L⁻¹), valores mucho más bajos que el obtenido en este estudio para *I. galbana* (CI_{50-72h}=58,15mg.L⁻¹CuSO₄.5H₂O), sin embargo es importante tener en cuenta que estos resultados no son comparables, ya que la duración de los ensayos y las especies no son las mismas. No se han encontrado reportes para ensayos de toxicidad con sulfato de cobre con la microalga trabajada, solo existe un estudio de Rudolph *et al.*¹⁴², con dicromato de potasio, reportando un CI_{50-96h} de 40mg.L⁻¹.

¹³⁷ GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates culture of marine invertebrates animals. Op. cit., 85 p.

¹³⁸ LAVENS, P y P. SORGELOOS. Op. Cit., 295 p.

¹³⁹ VELASCO L.A., S. CARRERA y J. BARROS. Op. Cit., p. 31-63

¹⁴⁰ PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA CALI. Sulfato de Cobre penta hidratado (CuSO₄.5H₂O). Ficha de datos de seguridad. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en internet: [http://portales.puj.edu.co/doc-quimica/FDS-LabQca-DianaHermith/CuSO4%20\(5H2O\).pdf](http://portales.puj.edu.co/doc-quimica/FDS-LabQca-DianaHermith/CuSO4%20(5H2O).pdf)

¹⁴¹ INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS EN SUSTANCIAS TÓXICAS (IRET). Heredia, Costa Rica. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en: <http://www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/501-sulfato-de-cobre-pentahidratado>

¹⁴² RUDOLPH ANNY, *et al.* Calidad ecotoxicológica de los sedimentos en fiordos del sur de Chile. Rev. biol.mar. oceanogr. [en línea]. 2011 Abr [citado 2014 Feb 5] ; 46(1): 79-84. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572011000100012&Ing=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572011000100012>.

El Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia¹⁴³ determinó el efecto tóxico CL_{50-72h} del sulfato de cobre penta-hidratado en la microalga de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata* como ligeramente tóxico entre los 10-100mg.L⁻¹-CuSO₄.5H₂O, al comparar este rango con los resultados obtenidos en este estudio ($CL_{50-72h} = 58,15\text{mg.L}^{-1}\text{-CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), se observa que *I. galbana* presenta una sensibilidad ligeramente tóxica al sulfato de cobre penta-hidratado.

Por último, se determinó como control positivo la concentración de 70mg.L⁻¹-CuSO₄.5H₂O para usarlo en los bioensayos posteriores con lodo, cumpliendo con lo establecido en el manual de Castillo¹⁴⁴ en el cual se recomienda seleccionar una concentración de tóxico de referencia cuyo efecto esté bien establecido y sea cercano al CL_{50} .

5.2.3 **Determinación de la concentración de inhibición media (CI_{50-72h}) de un lodo de exploración de hidrocarburos en base agua.**

5.2.3.1 **Bioensayos preliminares:** Teniendo en cuenta la misma metodología llevada a cabo para el tóxico de referencia, partiendo de un 100% de la muestra de lodo (1.000.000mg.L⁻¹)¹⁴⁵, se realizaron tres bioensayos preliminares o “*screening test*”. La búsqueda de rangos inició con concentraciones logarítmicas seriadas entre 100 a 1.000.000mg.L⁻¹-Lodo (Bioensayo 1), a partir del segundo ensayo el rango de concentraciones se mantuvo entre los 250.000 a 650.000mg.L⁻¹, para determinar finalmente en el tercer ensayo una respuesta escalonada entre 0 y 100% con cinco concentraciones con las cuales se trabajaron los ensayos definitivos: 350.000, 400.000, 450.000, 500.000 y 600.000mg.L⁻¹-Lodo (Tabla 14).

143 MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Autoridad nacional de licencias ambientales-anla. Resolución N° 0221. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en: http://www.anla.gov.co/documentos/Gaceta/res_0221_120412.PDF

¹⁴⁴Ibid., p. 133

¹⁴⁵GLENN H. BROWN Y EUGENE M. SALLEE. Química cuantitativa. Barcelona, editorial REVERTÉ S.A., 1977. 761 p.

Tabla 14. Búsqueda de rangos o “screening test” realizados con *I. galbana*, utilizando un lodo de exploración offshore en base agua a diferentes concentraciones.

DURACIÓN	ENSAYO	TRATAMIENTO	% ¹	CV% ²	OBSERVACIONES
48h	Bioensayo 1	Control (-)	0	-	- Concentraciones $\leq 10.000 \text{mg.L}^{-1}$ presentan %I negativos que indican densidades celulares mayores que en tratamiento control. - A partir de 100.000mg.L^{-1} se registran los primeros %I. - Se debe ampliar el rango entre las dos últimas concentraciones para obtener %I entre 0 y 100% - Bioensayo no viable
		100	-20	9,9	
		1000	-13	28,5	
		10.000	-6	21,6	
		100.000	17	12,6	
		1.000.000	100	1,9	
48 h	Bioensayo 2	Control (-)	0		-%I adecuados, sin embargo el CV% para concentraciones $\leq 400.000 \text{mg.L}^{-1}$ fue $>15\%$, considerando evaluar nuevamente las concentraciones en un próximo bioensayo, trabajando sólo hasta 600.000mg.L^{-1} y partiendo de 350.000mg.L^{-1} . - Bioensayo no viable
		250.000	4	90,8	
		350.000	33	39,1	
		400.000	51	19,3	
		450.000	78	4,8	
		500.000	97	3,9	
		650.000	108	3,0	
72 h	Bioensayo 3	Control (-)	0		- Se plantearon concentraciones para evaluar a 72h, tiempo en el cual se desarrollaron los ensayos definitivos. - %I entre 0 y 100% con CV más bajos respecto a los bioensayos previos y $<15\%$. - Control positivo con respuesta dentro de los rangos de la carta control para tóxico de referencia cercanos al 50%. - Bioensayo viable.
		Control (+)	57	3,6	
		350.000	13	15,0	
		400.000	27	4,3	
		450.000	58	3,8	
		500.000	76	1,6	
		600.000	102	0,5	

*Los valores son expresados como el promedio de cinco réplicas.

1. %I: Porcentaje de inhibición; 2. CV%: Coeficiente de variación.

En los bioensayos el oxígeno inicial fue $>7 \text{mg.L}^{-1}$ cumpliendo con el requisito que establece la EPA¹⁴⁶, los valores finales no siempre fueron mayores que los iniciales, pues en concentraciones superiores a 400.000mg.L^{-1} -Lodo fue $<5 \text{mg.L}^{-1}$. Los valores de pH iniciales oscilaron entre 7,59-8,58 con tendencia a aumentar en la mayoría de los tratamientos entre 7,74 y 9,21, cercano al rango óptimo establecido por Torrenta y Tacon¹⁴⁷. La temperatura no se encontró dentro del rango establecido en la metodología ($21-23,5^\circ\text{C}$) para el primer ensayo alcanzando un valor máximo de $25,60^\circ\text{C}$ por problemas con el aire acondicionado, regulándose nuevamente a partir del segundo. La salinidad varió entre 34,40 a 36,84UPS (Tabla 15).

¹⁴⁶ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.188

¹⁴⁷ TORRENTA, L. Y A. TACON. Op. Cit., 12-90 pp.

Tabla 15. Parámetros fisicoquímicos iniciales y finales, en las pruebas de *screening test* utilizando lodo de exploración *offshore* en base agua.

Ensayo	Tratamiento (mg.L ⁻¹)	Oxígeno (mg.L ⁻¹)		pH		Temperatura (°C)		Salinidad (UPS)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	Control	8,82	16,6	7,76	9,13	24,52	23,86	36,30	36,34
	Lodo-100	9,01	17,26	7,73	9,13	24,44	23,8	36,20	36,24
	Lodo-1.000	8,95	17,83	7,73	9,11	24,32	23,38	36,40	36,28
	Lodo-10.000	8,80	16,15	7,77	9,21	24,90	24,36	36,80	36,40
	Lodo-100.000	8,46	14,81	7,96	8,77	25,60	23,80	38,20	36,82
	Lodo-1.000.000	7,93	1,39	8,58	8,30	24,56	24,34	36,70	36,84
2	Control	9,21	15,98	7,59	8,94	23,52	22,70	34,60	34,50
	Lodo- 250.000	9,17	14,31	7,93	8,69	23,08	22,38	34,60	34,50
	Lodo- 350.000	9,12	9,97	8,01	8,37	22,96	22,34	34,60	34,60
	Lodo- 400.000	9,24	4,19	8,03	8,06	22,82	21,94	34,40	34,40
	Lodo- 450.000	9,27	9,09	8,08	8,07	23,18	22,12	34,50	34,60
	Lodo- 500.000	9,60	1,20	8,12	7,77	22,96	22,52	34,60	34,60
	Lodo- 650.000	9,49	0,99	8,25	7,74	22,82	21,94	34,60	34,60

5.2.3.1 **Bioensayos definitivos:** Con el fin de soportar los resultados obtenidos en el análisis de varianza, al igual que como se realizó con el toxico de referencia, se establecieron los supuestos estadísticos, donde la prueba de normalidad indicó que las muestras no provienen de una distribución normal ($p \leq 0,05$), sin embargo el Teorema Central del Límite asegura cuando n es grande, que las distribuciones de probabilidad, cualesquiera que sean se aproximan a la Normal¹⁴⁸.

En cuanto a la homogeneidad de varianzas, la prueba de Bartlett indicó que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$). El supuesto de independencia, verificado mediante la prueba de Durbin-Watson, muestra una auto correlación serial ($p \leq 0,05$), a pesar de la transformación de la variable mediante el modelo logarítmico TEC y posterior ajuste mediante el modelo Arcoseno (Y); sin embargo, esto se da debido a que la prueba no se realizó en una serie de tiempo, es decir solo se evaluó el porcentaje de inhibición al tiempo de setenta y dos horas de exposición. (Anexo 22).

No existen diferencias significativas entre las TEC de los tres bioensayos definitivos, ni entre réplicas de un mismo tratamiento ($p > 0,05$), demostrando la correcta estandarización del protocolo y la manipulación de las muestras durante el cultivo y los conteos (Anexo 23). Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al comparar el efecto de las diferentes concentraciones de lodo sobre la TEC, a excepción del tratamiento 450.000mg.L⁻¹-Lodo que fue similar al control positivo (Tabla 16 y Anexo 24).

¹⁴⁸IMUES, M. Op. Cit., 291 p.

En la Figura 14, se observa el porcentaje de inhibición promedio (%I) de los tres bioensayos definitivos, presentándose una relación directamente proporcional es decir, a medida que aumenta la concentración de lodo el %I también lo hace. A concentraciones de 350.000mg.L⁻¹-Lodo la inhibición en el crecimiento de la microalga es <20%, mientras que en 600.000mg.L⁻¹-Lodo se generó una completa inhibición en el crecimiento. De la misma manera el control positivo con 70mg.L⁻¹-CuSO₄.5H₂O fue cercano al 50% como era de esperarse y la concentración de lodo cercana también a este %I fue de 450.000mg.L⁻¹-Lodo.

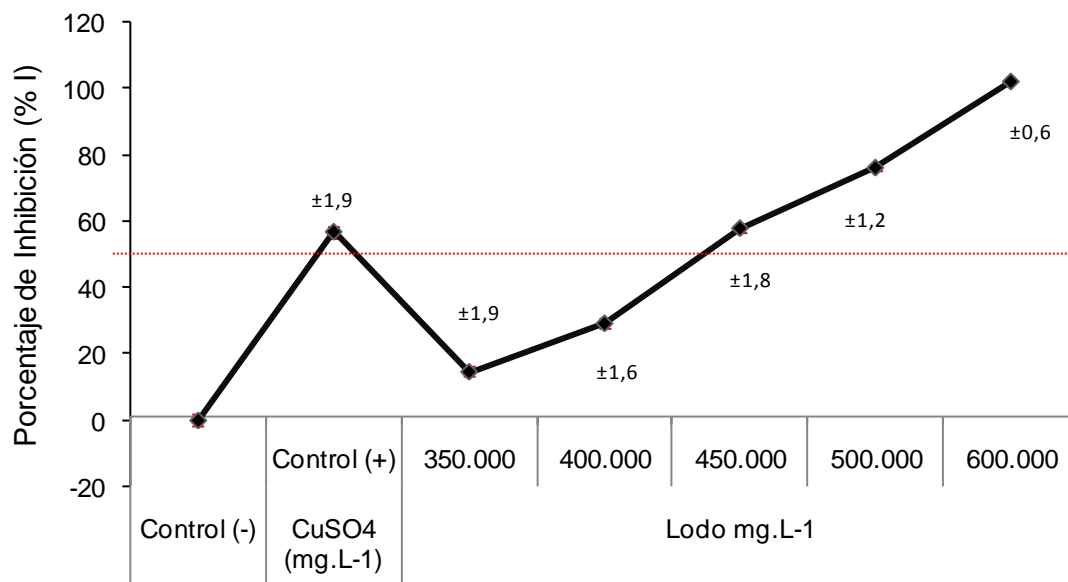
Tabla 16. Tasa específica de crecimiento (TEC) en los bioensayos definitivos a diferentes concentraciones de un lodo de exploración *offshore* en base agua. Los valores están expresados como el promedio de tres bioensayos ± D.E.

Tratamientos		TEC	D.E.
Controles	Control (-) ¹	0,26 ^a	0,0028
	Control (+)	0,17 ^d	0,0078
Lodo (mg.L ⁻¹)	350.000	0,24 ^b	0,0026
	400.000	0,22 ^c	0,0024
	450.000	0,17 ^d	0,0046
	500.000	0,12 ^e	0,0021
	600.000	-0,01 ^f	0,0048

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (p≤0,05).

1: Control negativo (sólo medio de cultivo), 2:Control positivo (70mg.L⁻¹-CuSO₄.5H₂O).

Figura 14. Porcentaje de inhibición (%) del crecimiento poblacional de *Isochrysis galbana* a diferentes concentraciones de un lodo en base agua. Los valores están expresados como el promedio de tres ensayos \pm D.E. La línea roja indica el 50% del %I.



En los controles negativos la densidad fue mayor de $1.000.000 \text{ cel. mL}^{-1}$ y al igual que en las pruebas para el tóxico, se observaron sanos de acuerdo con los parámetros de Velasco *et al.*¹⁴⁹, debido a la calidad de agua utilizada para las diluciones y en general en las condiciones en el procesamiento de cada bioensayo.

Gómez y Ramírez¹⁵⁰, plantean que la respuesta de una microalga a un efluente puede generarse por la penetración de los componentes tóxicos, trayendo como consecuencia la inhibición del metabolismo y acumulación de tóxicos a nivel de la membrana celular que interfieren en los procesos de intercambio entre la célula y el medio exterior; así como modificaciones de las propiedades físicas y la precipitación de minerales indispensables para la vida de los microorganismos y del plancton en general. Podría existir un efecto de sinergia entre todos los componentes tóxicos del efluente que pueden ser muy dañinos o que pueden neutralizarse mutuamente, por tanto, existen considerables dificultades al discernir o identificar las causas de determinada respuesta asociada a una variedad de sustancias con efecto tóxico o que, sencillamente, causan estrés. Este es el caso del lodo en base agua evaluado, el cual es una mezcla de

¹⁴⁹ VELASCO, L.A. CARRERA y J. BARROS. Op. Cit., p. 31-63

¹⁵⁰ GÓMEZ, L Y RAMÍREZ, Z. Microalgas como biomonitores de contaminación. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Laboratorio de Ecotoxicología Marina, Universidad de Oriente. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en: <http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq/article/viewFile/2059/1606> p47.

variados compuestos, sin embargo se observó una relación directamente proporcional en la respuesta de inhibición a medida que se aumentó su concentración en las muestras. Las interacciones que ocurren entre distintos agentes químicos en los medios terrestres y acuáticos son complejas y no han sido bien estudiadas; de hecho, este estudio no tiene precedentes en el país y sobre el ensayo de mezclas o lodos en microalgas no se ha encontrado literatura que reporte análisis similares.

Castillo¹⁵¹ afirma que generalmente los bioensayos se llevan a cabo con la muestra original, sin embargo en algunos casos una excesiva cantidad de material particulado, lodos o sedimentos interfieren con el comportamiento de los organismos utilizados en las pruebas, por ejemplo limitar la entrada de luz a los cultivos de microalgas; para evitar que ese tipo de efectos se vea reflejado en los resultados de las pruebas hay que tratar de eliminar dichas interferencias. No obstante, la aplicación de métodos de filtración, sedimentación o centrifugación entre otros, pueden involucrar riesgos de pérdida de componentes asociados con partículas tal como lo indica la EPA¹⁵² estableciendo que los efectos adversos de las altas concentraciones de sólidos en suspensión y/o disueltos, el color y extremos de pH pueden enmascarar la presencia de sustancias tóxicas; en este sentido, cuando los ensayos se realizan en presencia de material particulado, se recomienda dejar sedimentar la muestra de treinta minutos a dos horas, o efectuar una filtración gruesa (>50mm).

Adicionalmente, la EPA¹⁵³ menciona que existen métodos parciales de filtración como el uso de fibra de vidrio o la centrifugación, dando a conocer que esta segunda alternativa es preferible a la filtración, por lo cual en este estudio se decidió utilizar la centrifugación, pues además de permitir la visibilidad de las microalgas para los conteos y evitar la interferencia de luz, se debe tener en cuenta que el incremento en la concentración de sólidos será mayor en el nivel inferior de la columna de manera temporal y atenuado por un factor de dilución generado por las propias corrientes a nivel de toda la columna de agua; los sólidos suspendidos podrían influenciar la presencia principalmente de especies de peces demersales existentes en el fondo del mar, sin embargo, este efecto será temporal, además se debe considerar que la descarga de los lodos de perforación debe ocurrir por debajo de la superficie del agua a una profundidad de por lo menos tres metros¹⁵⁴.

¹⁵¹ CASTILLO. Op. Cit., p.27

¹⁵²UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms.3 Ed,Op. cit., p.48

¹⁵³Ibid., p. 16

¹⁵⁴MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS DEL PERÚ. Guía Ambiental para la Disposición de Desechos de Perforación en la Actividad Petrolera. [En línea]. Disponible en internet:<<http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/institucional/regionales/Publicaciones/GUIA%20HIDR%20OCARBUIROS%20X.pdf>>

En todos los bioensayos el oxígeno inicial fue superior a $6,5\text{mg.L}^{-1}$, dentro del criterio permitido por la EPA¹⁵⁵ para el inicio de las pruebas ($\text{OD}>5\text{mg.L}^{-1}$), el control negativo y positivo presentaron una concentración significativamente más alta que el resto de tratamientos ($p\leq 0,05$) (Anexo 25). En ambos controles y los tratamientos $\leq 450.000\text{mg.L}^{-1}$ -Lodo los valores finales de oxígeno se incrementaron, siendo significativamente mayor ($p\leq 0,05$) en el control negativo, seguido por el control positivo y 350.000mg.L^{-1} -Lodo, disminuyendo de manera significativa hasta 600.000mg.L^{-1} -Lodo, observándose una relación inversa entre la concentración de oxígeno con respecto a la del lodo y al porcentaje de inhibición, en donde a medida que aumenta la concentración de lodo y el porcentaje de inhibición, el nivel de oxígeno es menor, presentando el mismo comportamiento que se observó con el tóxico de referencia, pero a diferencia de éste alcanzando concentraciones finales a partir de los 500.000mg.L^{-1} -Lodo que no son viables para las microalgas, como lo afirma Torrenta y Tacon¹⁵⁶ (Tabla 17 y Anexo 26).

Los valores de pH partieron de 7,43-7,93 y al final de los bioensayos aumentaron en todos los tratamientos entre 7,73-9,22, hallándose dentro del rango permitido para crecimiento de *I. galbana* de acuerdo con Torrenta y Tacon¹⁵⁷. Se observó que el pH inicial de los tratamientos control fue significativamente menor al resto de concentraciones ($p\leq 0,05$) (Tabla 17 y Anexo 27). Se presentaron diferencias significativas entre todos los pH finales ($p\leq 0,05$), siendo mayor en el control negativo seguido por los tratamientos 35.000mg.L^{-1} -Lodo y el control positivo. A partir de 400.000mg.L^{-1} -Lodo continua disminuyendo de manera gradual a medida que aumenta la concentración de lodo (Tabla 17 y Anexo 28). La relación inversamente proporcional que se encontró entre el %, la concentración de lodo con respecto al pH final se debe a una mayor actividad fotosintética, discutida anteriormente en el comportamiento del pH para el tóxico de referencia¹⁵⁸, aspecto que también ha sido reportado para otras microalgas como *Chlorella sorokiniana*¹⁵⁹, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella autotrophica*, *Cylindrotheca sp.* y *Coccolithisella bens*¹⁶⁰.

¹⁵⁵ UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.188.

¹⁵⁶ TORRENTA, L. Y A. TACON. Op. Cit., 12-90 pp.

¹⁵⁷ Ibid., p. 86

¹⁵⁸ LOURENÇO, S.O., et al. Op. cit., p 153-168.

SKODA, B. Contributions to the biochemical taxonomy of the genus *Chlorella* Beijerinck s. l. – pigment composition. En: Algological Studies. 1997.

¹⁵⁹ MORONTA Y MORALES. Op.cit., p. 27

¹⁶⁰ ARMSTRONG, J.E. Y J.A. CALDER. Op. cit., pp. 868-872

Tabla 17. Valores promedio de parámetros fisicoquímicos iniciales y finales, en las pruebas definitivas utilizando un lodo de exploración *offshore* en base agua.

Tratamiento (mg.L ⁻¹)	Oxígeno (mg.L ⁻¹)		pH		Temperatura (°C)		Salinidad (UPS)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Control (-)	11,52 ^a	13,81 ^a	7,70 ^b	9,22 ^a	23,33 ^a	22,62 ^a	35,20 ^a	35,20 ^a
Control (+) ¹	11,09 ^a	11,49 ^b	7,43 ^c	8,64 ^c	23,45 ^a	22,76 ^a	35,13 ^a	35,13 ^a
Lodo-350.000	8,52 ^b	11,33 ^b	7,91 ^a	8,69 ^b	23,34 ^a	22,71 ^a	35,20 ^a	35,20 ^a
Lodo-400.000	7,72 ^c	9,58 ^c	7,91 ^a	8,41 ^d	23,30 ^a	22,80 ^a	35,27 ^a	35,27 ^a
Lodo-450.000	7,41 ^{cd}	8,74 ^d	7,90 ^a	8,22 ^e	23,35 ^a	22,55 ^a	35,30 ^a	35,30 ^a
Lodo-500.000	6,98 ^{de}	1,50 ^e	7,91 ^a	7,86 ^f	23,38 ^a	22,48 ^a	35,36 ^a	35,37 ^a
Lodo-600.000	6,59 ^e	1,51 ^e	7,93 ^a	7,73 ^g	23,34 ^a	22,78 ^a	35,37 ^a	35,37 ^a

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

1: Solución de sulfato de cobre pentahidratado ($70\text{mg.L}^{-1}\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Teniendo en cuenta que los valores de pH inicial se encontraron dentro del rango normal de cultivo de la especie¹⁶¹, no fue necesario realizar su ajuste, tal como lo indica Castillo¹⁶², quien afirma que por lo general, el ajuste de pH se realiza en el intervalo entre seis y nueve (el cual es generalmente tolerable para la biota acuática), pues las muestras con valores de pH extremos que excedan los límites de tolerancia de los organismos de prueba, deben ser neutralizadas teniendo en cuenta que el agente neutralizante no debe reaccionar con los componentes de la muestra, lo cual podría conducir a la precipitación o a la formación de complejos, tampoco debe influir sobre el organismo de ensayo provocando estimulación o inhibición.

La temperatura inicial para los tres bioensayos osciló entre 23,30-23,45 y la final aumentó entre 22,48-22,80°C, sin presentarse diferencias significativas entre tratamientos al inicio y final del experimento ($p > 0,05$) (Tabla 17, Anexo 29 y Anexo 30), encontrándose dentro del rango establecido en la metodología (21–23,5°C), asegurando las mismas condiciones para todas las muestras y cumpliendo además con el criterio de calidad establecido por ASTM¹⁶³ que afirma que una prueba es aceptable si la diferencia entre el mayor valor de temperatura y el menor valor no supera los 4°C.

La temperatura influye en la tasa de crecimiento, en la medida en que sea más constante asegura que dicha tasa se presente de manera similar a lo largo de los ensayos. En un estudio con *I. galbana*, Kaplan *et al.*¹⁶⁴

¹⁶¹ TORRENTA, L. Y A. TACON. Op. Cit., 12-90 pp.

¹⁶² CASTILLO Op. cit., p. 27

¹⁶³ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., p.9

¹⁶⁴ KAPLAN, D., COHEN, Z. & ABELIOVICH, A. Op.cit., p. 37 - 48.

observaron que la temperatura óptima para lograr el mayor crecimiento fue a 27°C, temperaturas superiores a 32°C o inferiores a 19°C la reducen. Así mismo, Velasco *et al.*¹⁶⁵, encontraron en un estudio con la misma especie que la temperatura afecta la densidad algal, siendo mayor a altas temperaturas (28°C) y esta variable a su vez, interactúa con la luminosidad.

La salinidad osciló entre 35,13 a 35,37 UPS (Tabla 17), sin presentarse diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexo 31), para el lodo este parámetro no se vio afectado por la evaporación y por ende su variabilidad no fue un factor influyente en gran medida en las respuestas de inhibición obtenidas. El estudio realizado por Velasco *et al.*¹⁶⁶ demostró que salinidades entre 27 y 35 UPS en cultivos de *I.galbana*, no presentan efecto sobre el crecimiento algal, lo que asegura condiciones similares en esta investigación.

Es importante tener en cuenta que medios hipertónicos de salinidad afectan negativamente las tasas de fotosíntesis, respiración, crecimiento y producen la deshidratación de las microalgas, mientras que bajas salinidades ocasionan el hinchamiento de las células e incluso su lisis¹⁶⁷. La ausencia de diferencias significativas en los rangos de salinidad que se presentaron en este estudio coinciden con los resultados obtenidos bajo rangos de salinidades más amplios, entre 10 y 35 UPS¹⁶⁸, donde no se presentaron diferencias significativas sobre el crecimiento celular de la misma especie, puesto que aparentemente *I. galbana* presenta un mecanismo efectivo de regulación osmótica de sus líquidos internos gracias al bombeo de iones hacia su interior¹⁶⁹.

¹⁶⁵VELASCO, L.A., BARROS-GÓMEZ, J., OSPINA-SALAZAR, G.H. Y C.A. TRUJILLO. Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *Isochrysis galbana* (clon T-ISO). En: Rev. Intrópica. Mayo, 2009. Vol. 4. p.93-99

¹⁶⁶Ibid., p.1

¹⁶⁶ KAPLAN, D., COHEN, Z. & ABELIOVICH, A. Op.cit., p. 37 - 48.

¹⁶⁶VELASCO, L.A., BARROS-GÓMEZ, J., OSPINA-SALAZAR, G.H. Y C.A. TRUJILLO. Op. Cit., p.1

¹⁶⁷LOBBAN, C.S., P.J. HARRISON Y M.J. DUNCAN. Op. cit., 200 p.

¹⁶⁸RENAUD, S.M. Y D.L. PARRY. 1994. Op. cit., p. 347-356.

¹⁶⁹LOBBAN, C.S., P.J. HARRISON Y M.J. DUNCAN. Op. cit., 200 p.

5.2.4 **Cálculo del CI_{50-72h} con el lodo en base agua:** La concentración de inhibición media (CI_{50}) obtenida para el lodo en base agua de exploración offshore es de 432.900mg.L^{-1} con límites inferior y superior en un 95% de confianza entre 423.000 y 442.800mg.L^{-1} . El CV% fue muy bajo ($<1,5\%$) y permite constatar una buena calidad de los resultados obtenidos, pues los tres bioensayos presentan respuestas muy cercanas (Tabla 18), teniendo en cuenta además que ASTM¹⁷⁰ plantea que la sensibilidad de las especies de algas a menudo difieren sustancialmente y las diferentes cepas de cultivo de las microalgas pueden diferir también en la sensibilidad a través del tiempo; sin embargo con la realización de estos bioensayos repetidas veces, sin presentarse diferencias significativas y el bajo CV%, se descarta esta posibilidad.

Tabla 18. Valores de CI_{50-72h} en *I. galbana* con un lodo de exploración offshore en base agua.

BIOENSAYOS	CI_{50-72h} (mg.L^{-1})	Límite inferior (mg.L^{-1})	Límite superior (mg.L^{-1})
1 (Anexo 32)	435.000	425.300	444.700
2 (Anexo 33)	436.000	426.000	446.000
3 (Anexo 34)	427.800	417.600	437.800
Promedio	432.900	423.000	442.800
D.E.	0,45	0,47	0,44
CV%	1,03	1,10	1,00

Aunque *I. galbana* fue elegida debido a que en el LABBIP la cepa ha sido mantenida por más de seis años de manera estable, es importante considerar como lo menciona la ASTM¹⁷¹ que la selección de una especie por su disponibilidad o facilidad de cultivo no necesariamente la cataloga como la más sensible. Los resultados obtenidos demuestran esta afirmación, pues la concentración que inhibe el 50% de la población de *I. galbana* es de 432.900mg.L^{-1} resultando no tóxico de acuerdo con la tabla de clasificación establecida por el Departamento de Industria y Recursos en Australia (DoIR)¹⁷² para lodos de perforación (Anexo 35), sin embargo esta es una clasificación general basada en pruebas de toxicidad de diferentes especies marinas que puede variar no solo por la localización de la actividad de exploración, sino por el tipo de lodo evaluado, la naturaleza y sensibilidad del medio receptor y la resistencia de cada especie. Esta clasificación también se reportó en un estudio en Australia occidental, realizado por Cobby¹⁷³, con la misma especie a 96h para un fluido de

¹⁷⁰ AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Op. cit., p. 6

¹⁷¹ *Ibid.*, p.6

¹⁷² DOIR. Op. cit., p.67

¹⁷³ COBBY, G.L. Op. cit., p. 12

perforación sintético, indicando que la CE_{50} fue de $242,42\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo no tóxico de acuerdo con las normativas establecidas en la zona mencionada, a una concentración mucho menor que la obtenida en este estudio.

Es posible que los valores de CI_{50-72h} determinados en este estudio sean sobrestimados ya que como se mencionó en la metodología, las muestras fueron centrifugadas para poder medir el proceso mediante los conteos; es muy probable que al no realizar ningún tipo de sedimentación, la alta concentración de sólidos suspendidos aumente mucho más la turbidez impidiendo la entrada de luz, la cual es vital para el proceso fotosintético y la concentración de inhibición media resultante sea mucho menor que la reportada en el presente documento, aunque para esto sería necesario aplicar otro tipo de metodología para medir la densidad celular. La EPA¹⁷⁴, sostiene que la aplicación de métodos de filtración, sedimentación o centrifugación, pueden involucrar riesgos de pérdida de componentes asociados con partículas, estableciendo que los efectos adversos de las altas concentraciones de sólidos en suspensión y/o disueltos, el color y extremos de pH pueden enmascarar la presencia de sustancias tóxicas.

Varios protocolos para las pruebas de toxicidad con microalgas de agua dulce ya están establecidos, sin embargo son pocos los que se pueden describir como "estándar" para especies marinas. A pesar de que las directrices han sido publicadas y algunas especies se han recomendado como cepas de prueba¹⁷⁵, la mayoría de autores como Moreno-Garrido *et al.*¹⁷⁶, Stauber y Davies¹⁷⁷ y Franklin *et al.*¹⁷⁸ concluyen que la concentración de tóxico que afecta el crecimiento de las microalgas es variable y depende de las especies utilizadas, la densidad celular y la composición del medio de cultivo, lo que provoca grandes diferencias en los resultados y no permite la comparación fiable de los datos obtenidos en diferentes trabajos. En este sentido Luoma y Rainbow¹⁷⁹, establecieron que el efecto de la toxicidad no es sólo una función de la exposición a los contaminantes, sino también del cultivo biológico interno.

¹⁷⁴UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3 Ed, Op. cit., p.48

¹⁷⁵WALSH, G.E. Op. cit., p. 979- 987.

¹⁷⁶MORENO, I., LUBIÁN, L.M. and SOARES, A.M.V.M. Op. cit., pp. 112-116.

¹⁷⁷STAUBER, J.L. y DAVIES, C.M. Op.cit., p. 255-301.

¹⁷⁸FRANKLIN, N.M., et al.. Op. cit., p. 742-751

¹⁷⁹LUOMA, S.N. and RAINBOW, P.S. Op. cit., pp. 1921-1927.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

- Comprobado el adecuado funcionamiento del sistema de filtración del LABBIP y establecidas las condiciones lumínicas promedio de 1.444lux, temperatura entre 21 y 23,5°C y medio de cultivo Guillar F/2 preparado con reactivos analíticos o comerciales, el mantenimiento de *I. galbana* para pruebas de toxicidad deberá iniciarse con tubos de ensayo de 15-20mL de capacidad, a una densidad celular promedio de 29.958cél.mL⁻¹ y finalizar en recipientes de 1L que deberán tener una densidad celular > 1x10⁷cél.mL⁻¹ para asegurar al iniciar los bioensayos de toxicidad, un inóculo óptimo de 500.000cél.mL⁻¹ por réplica y lograr así, el cumplimiento de los criterios de calidad establecidos por las entidades que regulan estos procesos.
- La concentración de CuSO₄.5H₂O a la cual se inhibe el 50% de la población de *Isochrysis galbana* es de 58,15mg.L⁻¹ con un CV de 1,95%.
- La concentración de un lodo de exploración en base agua a la cual se inhibe el 50% de la población de *Isochrysis galbana* es de 432.900mg.L⁻¹ con un CV% de 1,03%.
- Para todos los bioensayos, los valores de oxígeno, pH y salinidad iniciales estuvieron dentro de los rangos permisibles para asegurar el crecimiento de *I. galbana* en condiciones de cultivo y el cumplimiento de los criterios de calidad establecidos por las entidades correspondientes.
- El oxígeno disuelto, a concentraciones $\geq 30\text{mg.L}^{-1}$ en bioensayos definitivos con tóxico de referencia, disminuyó de manera significativa al final de la prueba, alcanzando valores entre 10 a 14mg.L⁻¹. Por su parte, el pH aumentó en todos los tratamientos respecto a su valor inicial, sin embargo, estos dos parámetros se mantuvieron dentro de los rangos de cultivo permisibles.
- El oxígeno disuelto a concentraciones $\geq 350.000\text{mg.L}^{-1}$ en los bioensayos definitivos con lodo disminuyó de manera significativa a las 72h, presentando a partir de 500.000mg.L⁻¹ niveles nocivos para la supervivencia de la especie ($\leq 1,50\text{mg.L}^{-1}$), así mismo, a dichas concentraciones el pH disminuyó con respecto a sus valores iniciales.
- Para el desarrollo de los bioensayos la temperatura deberá mantenerse entre 21 a 23,5°C, variaciones mayores a 2,5°C originan CV% mayores al 15%. entre réplicas.

- La salinidad en los bioensayos para tóxico de referencia y lodo oscilaron entre 35,13 a 35,37 UPS, sin presentarse diferencias significativas entre los valores iniciales y finales, este parámetro no se vio afectado por la evaporación y no fue un factor influyente en gran medida en las respuestas de inhibición de crecimiento de las microalgas.
- Los bioensayos de toxicidad realizados cumplieron con los criterios de calidad establecidos por las entidades (ASTM, EPA, OCDE) que regulan estos procesos.

6.2 RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con la misma especie, evaluando la respuesta a diferentes temperaturas, salinidades, medio de cultivo y densidades celulares de inóculo $<500.000\text{cél.mL}^{-1}$, con el propósito de obtener una información más detallada de la toxicidad del lodo y de los posibles factores que pueden influir en la respuesta.
- Realizar bioensayos bajo los mismos estándares establecidos, pero en periodos de tiempo más largos, 96-120h, con el fin de observar si el efecto del lodo es mayor o menor con el transcurrir del tiempo.
- Utilizar metodologías de recuento más eficientes, que permitan evaluar una mayor cantidad de muestras en menor tiempo, pues con la metodología de conteo por placa Neubauer es limitante el número de muestras a contar en el tiempo adecuado.
- Continuar con la realización de bioensayos con *I. galbana* respecto al tóxico de referencia, de manera que se pueda obtener una mayor cantidad de datos para la carta control a través del tiempo, de manera que sea posible establecer si las condiciones se mantienen o cambian, lo que permitirá posteriormente determinar su uso en la toma de decisiones para futuras muestras a evaluar.
- Desarrollar pruebas con especies de microalgas nativas aplicando el protocolo para pruebas de toxicidad establecido a partir de este estudio, con el fin de conocer su sensibilidad y establecer un pool de especies con potencial para el desarrollo de ensayos de toxicidad.
- Fortalecer los estudios de impacto ambiental de los lodos de exploración de hidrocarburos en las operaciones petroleras, en conjunto con las entidades de control ambiental del país, de manera que se contribuya a minimizar los riesgos para el ambiente acuático y permita establecer posibles medidas de disminución de riesgos.

7. BIBLIOGRAFÍA

ALAYO, M. IANNACONE, J. y ARRASCUE, A. La microalga marina *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, como bioensayo alternativo para la evaluación del cromo. En: Ecología Aplicada. 2000. Vol. 4, no. 2, p. 69-75.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae. 97 ed. Philadelphia (PA), ASTM, 1998. p.7.

AQUATIC TOXICOLOGY LABORATORY. [En línea] Disponible en internet: http://www.ias.unt.edu/~waller/aquatic_toxicology/laboratory/

ARMSTRONG, J.E. Y J.A. CALDER. Inhibition of light-induced pH increase and O₂ evolution of marine microalgae by water-soluble components of crude and refined oils. En: Appl. Environ. Microbiol. Mayo, 1978. Vol. 35. p. 858-862.

BARÓN, M., ARELLANO, J. and LÓPEZ, G. Copper and photosystem II: a controversial relationship. *Physiol. Plant.* [online]. Vol.94. no,1. April 2006 [cited 3 september 2012]. Available from internet: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00799.x/abstract>

BRAND, L.E., SUNDA, W.G and GUILLARD R.R.L. Limitation of marine phytoplankton reproductive rates by zinc, manganese and iron. En: *Limnology and Oceanography* .1983. No.28, p. 42-43

BROWN, M., S. JEFFREY, J. VOLKMAN Y G. DUNSTAN. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, Australia, Elsevier, 1997. pp. 315-331.

CANTERFORD, G.S. and CANTERFORD, D.R. Toxicity of heavy metals to the marine diatom. En: *Ditylum Bright wellie* (West) Grunow: correlation between toxicity and metal speciation. 1980. Vol. 60, p. 227.

Carta Petrolera. [En línea]. Ed.109.Colombia.Julio – agosto 2010- [Citado 27 Julio 2012]. Disponible en internet: http://www.ecopetrol.com.co/especiales/carta_petrolera108/rev_exploracion.htm

CASTILLO. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México, IMTA, 2004.

COBBY, G.L. Changes to the Environmental Management of Produced Formation Water Offshore Australia. Australian Petroleum Production and

Exploration Limited [online]. 2002 [Cited 14, September, 2012]. Available from internet: <http://dmp.wa.gov.au/documents/EnvMgmtFormationWaterGuideline.pdf>

DOIR.PetroleumGuidelines.Drilling Fluids Managements.Australia, Department of Industry and Resources.EnvironmentDivision.Government of Western Australia. 2006. 56 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Air Pollution Control Cost Manual. Office of Air Quality Planning and Standard [online]. Vol. 2, 2002.[Cited 23 July 2012].Section 4 Chapter 2. Available in internet: <http://www.epa.gov/ttn/catc/dir1/cs4-2ch2.pdf>

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.Oil and gas extraction point source category offshore subcategory. En: Federal register. december, 1996.Vol. 61, no. 242, pp. 2-46

FRANKLIN, N.M., STAUBER, J.L, APTE, S.C. and LIM, R.P. Effect of initial cell density of the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays.En: Environmental Toxicology Chemical. 2002. No. 21, p. 742-751

GLENN H. BROWN Y EUGENE M. SALLEE. Química cuantitativa. Barcelona, editorial REVERTÉ S.A., 1977. 761 p.

GÓMEZ, L Y RAMIREZ, Z. Microalgas como biomonitores de contaminación. Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Laboratorio de EcotoxicologíaMarina,Universidad de Oriente. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en:<http://ojs.uo.edu.cu/index.php/cq/article/viewFile/2059/1606> p47

GONZÁLEZ DE INFANTE A. El plancton de las aguas continentales. Monografía 31 OEA. Washington DC.- USA. 1988; p.131.

GOOGLE EARTH. 2012- [Citado Septiembre 20 de 2012]. Disponible en internet: [https://maps.google.com/maps?ie=UTF8&cid=17006282922475028742&q=Institut o+de+Investigaciones+Marinas+y+Costeras+%22Jose+Benito+Vives+de+Andreis %22&iwloc=A&gl=CO&hl=es](https://maps.google.com/maps?ie=UTF8&cid=17006282922475028742&q=Institut+o+de+Investigaciones+Marinas+y+Costeras+%22Jose+Benito+Vives+de+Andreis+%22&iwloc=A&gl=CO&hl=es)

GORBI, G.; CORRADI, M.G.; INVIDIA, M. and BASSI, M. Light intensity influences chromium bioaccumulation and toxicity in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). En: Ecotoxicology and Environmental Safety .2001. No. 48, p. 36-42.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates culture of marine invertebrates animals. New York, U.S.A., Plenum press,1974. 85 p.

GUILLARD, R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, En: P.B. Smith Culture of Marine Invertebrates. New York, Plenum Press, 1975. 60 p.

HELM M.M., N. BOURNE Y A. LOVATELLI. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual Práctico. Roma, FAO Documento Técnico de Pesca 471, 2006. 184 p.

IMUES, M. "Bioestadística: Aplicaciones en Producción y Salud Animal" Colombia, ed. Universidad De Nariño ISBN: 958-9479-39-1, 2009. vol. 1. 301 p.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTUDIOS EN SUSTANCIAS TÓXICAS (IRET). Heredia, Costa Rica. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en: <http://www.ftm.una.ac.cr/plaguicidasdecentroamerica/index.php/base-de-datos/ingredientes-activos/501-sulfato-de-cobre-pentahidratado>

INVEVAR. Informes técnicos. Santa Marta, Colombia, Laboratorio de Bioprospección Marina, 2012.

JIANGNING, C., HONGXIA Y., YING, L., WEI, J., JIE, J., JUNFENG, Z. and ZICHUN, H. Ecotoxicological evaluation of 4-aminobiphenyl using a test battery. En: Ecotoxicology Environmental Safety. Mayo, 2004. Vol. 58, p. 104-109

KAPLAN, D., COHEN, Z. & ABELIOVICH, A. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. En: Biomass 9. July, 1985. No. 1, p. 37 - 48.

LANDIS, W.G. and YU, M.H. Introduction to environmental toxicology. Impacts of chemicals upon ecological systems. 2 ed. Boca Ratón, Lewis Publishers, 1995, pp. 48-51.

LAVENS, P y P. SORGELOOS. Manual of the production and use of live food for aquaculture. Food and agriculture organization on the United Nations. No 361. Rome, Italy, FAO. Technical paper, 1996. 295 p.

LEWIS, M.A. Freshwater primary producers. En: Handbook of Ecotoxicology. U.K., Blackwell Scientific Publ., 1993, p. 28-51.

LOBBAN, C.S., P.J. HARRISON Y M.J. DUNCAN. The physiological ecology of seaweeds. New York, Cambridge University Press, 1985. 200 p.

LOURENÇO, S.O., U.M. LANFER-MÁRQUEZ, J. MANCINI-FILHO, E. BARBARINO y E. AIDAR. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. Comparison of two culture media. En: Aquaculture. Agosto, 1996. Vol. 148. p. 153-168.

LOZANO-DUQUE, Y.; VIDAL, L.; NAVAS, R. Listado de diatomeas (bacillariophyta) registradas para el mar caribe colombiano. En: Bol .Invest .Mar .Cost.2010.Vol. 39. No.1.p. 83-116

MACFIE, S.M. and TARMOHAMED, Y. Effects of cadmium, cobalt and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. En: Environmental Contamination Toxicology.1994. No .5,pp. 454–458.

MARÍN, N., F. MORALES, C. LODEIROS Y E. TAMIGNEAUX. 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. En: J. Applied Phycology. 1998. Vol.10. p. 405-411.

MARTÍNEZ, J. Ensayo de toxicidad crónica con microalgas clorofíceas. [En línea]. Disponible en internet: <<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap6.pdf>>

MINISTERIO DE ENERGÍA Y MINAS DEL PERÚ. Guía Ambiental para la Disposición de Desechos de Perforación en la Actividad Petrolera. [En línea]. Disponible en internet: <http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/institucional/regionales/Publicaciones/GUIA%20HIDROCARBUROS%20X.pdf>

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE. Autoridad nacional de licencias ambientales-ANLA. Resolución N° 0221. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en: http://www.anla.gov.co/documentos/Gaceta/res_0221_120412.PDF.

MORENO, I., LUBIÁN, L.M. and SOARES, A.M.V.M. Influence of cellular density in determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. En: Ecotoxicology Environmental safety.2000.No. 47, p. 112-116.

MORETTI, A., PEDINI FERNANDEZ-CRIADO, M., CITTOLIN, G. y GUIDASTRI, R. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Rome, FAO,1999.194 p.

MORONTA, R. Y E. MORALES. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. En: Rev.Fac. Agron. Enero, 2006.Vol. 23.no.1. p. 27-41.

NYHOLM, N. and KÄLLQVIST, T. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. En: Environmental Toxicology Chemical. Agosto,1989.No.8, p. 689-703.

OKAY, O.S., DONKIN, P., PETERS, L.D. and LIVINGSTONE, D.R. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene

and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. En: Environmental Pollution. 2000. No. 110. p. 103.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Fisheries Technical Paper, 2006. p. 184.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC DEVELOPMENT. Alga growth inhibition test: Test Guideline. En: Guidelines for Testing of Chemicals. June, 1984. No. 201, p. 2-14

OSPINA, G. H., SANTOS-ACEVEDO, M., LÓPEZ-NAVARRO, J., GÓMEZ-LÓPEZ, D., ÁLVAREZ-BARRERA, J., GÓMEZ-LEÓN, J. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. 2 ed. Santa Marta, Colombia, Publicaciones Invemar, 2011. p. 45.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Fisheries Technical Paper, 2006. p. 184.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC DEVELOPMENT. Alga growth inhibition test: Test Guideline. En: Guidelines for Testing of Chemicals. June, 1984. No. 201, p. 2-14

PANIAGUA, M., BUCKLE, J., GRANADOS L.F., LOYA y C., DANIEL H. Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. Informe OC-89-01. México, CICESE, 1989.

PARKE, M. Estudios sobre flagelados marinos. Revista de la Asociación de Biología Marina del Reino Unido. Vol. 28. Reino Unido, 1949. pp. 255-288.

PETERSON, R. Influence of Cu and Zn on the growth of a freshwater alga, *Scenedesmus quadricauda*: the significance of chemical speciation. En: Environmental Science Technology. 1982. vol. 16, no. 8, p. 442-447.

Petroleum Guidelines Drilling Fluids Management. [online]. Australia. Government of western Australia, Department of Mines and Petroleum. 2002- [Cited 20 September, 2012]. Available from internet: <http://www.dmp.wa.gov.au/documents/ENV-PEB-188.pdf>

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA CALI. Sulfato de Cobre penta hidratado (CuSO₄.5H₂O). Ficha de datos de seguridad. [en línea]. [citado 3 septiembre 2012]. Disponible en internet: [http://portales.puj.edu.co/doc-quimica/FDS-LabQca-DianaHermith/CuSO₄%20\(5H₂O\).pdf](http://portales.puj.edu.co/doc-quimica/FDS-LabQca-DianaHermith/CuSO4%20(5H2O).pdf)

RACHLIN, J.W. and GROSSO, A. The growth of the green alga *Chlorella vulgaris* to combined divalent cation exposure. En: Environmental Contamination Toxicology. 1993. No. 24, p. 16-20.

RENAUD, S.M. Y D.L. PARRY. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. En: J. Applied Phycology. 1994. Vol. 6. P. 347-356.

REYES, M. HONDAL, O. HERNANDEZ, J. Sulfato de Cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, Centro Nacional de Toxicología, 2003. p. 3.

ROBLES, J.R. Metodología para el diseño de bioensayos en toxicología acuática. Tesis de posgrado en Estadística. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 1998.

RODRIGUEZ, L., JUSCAMAITA, J., VARGAS, J. efecto del medio em-bokashi en el cultivo de la microalga marina *Tetraselmis suecica* K. En: Ecología aplicada. Diciembre, 2007. Vol. 6, no. 1 y 2. p. 112-116

ROJIÈKOVÁ, R., DVOOÁKOVA, D. and MARSALEK, B. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the Standard fish assay. En: environmental toxicology Water Quality. 1998. No. 13, p. 235 - 241.

RUDOLPH ANNY, MEDINA PAULINA, AHUMADA RAMÓN, NOVOA VANESSA. Calidad ecotoxicológica de los sedimentos en fiordos del sur de Chile. Rev. biol.mar. oceanogr. [en línea]. 2011 Abr [citado 2014 Feb 5]; 46(1): 79-84. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572011000100012&lng=es.

SHAW, IC. Y CHADWICK, J. Principios de toxicología ambiental. 8 ed. Londres, Taylor and Francis, 1998. pp. 47-65.

SIPAÚBA TAVARES, Lúcia Helena; ODETE, Rocha. Produção de Plâncton (Fitoplânctonezooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos, São Carlos, Brasil, RiMa. 2003. p.18.

SKODA, B. Contributions to the biochemical taxonomy of the genus *Chlorella* Beijerinck s. l. – pigment composition. En: Algological Studies. 1997. Vol. 87. P. 109-136.

SOLUCIONES SUBMARINAS. [en línea]. España, Schlumberger, 2007-[Citado 3 Agosto 2012]. Disponible en internet: http://www.slb.com/media/services/resources/oilfieldreview/spanish00/win00/p2_19.pdf

STATGRAPHICS Centurion XV. 2006 by StatPoint, Inc. Disponible en internet: www.statgraphics.com

STAUBER, J.L. AND DAVIES, C.M. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. En: Environmental Reviews. 2000. No. 8, p. 255-301.

STEIN, R. Culture methods and growth measurements. Melbourne, Cambridge University press, 1973. 445 p.

STRATTON, J. GILES. Importance of bioassay volume in toxicity tests using algae and aquatic invertebrates. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44. 1990, pp. 420–427

SUNDA, W.G. and LEWIS, J.A.M. Effects of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. En: Limnology Oceanography. 1978. No. 23, p. 874.

THOMAS, W.H. and SEIBERT, D.L.R. Effects of copper on the dominance and the diversity of algae: controlled ecosystem pollution experiment. En: Bulletin of Marine Science. 1977. Vol. 27, no. 1, p. 24.

TORRENTA, L. Y A. TACON. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura, una diagnosis. Brasil, FAO, 1989. pp. 12-90

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organisms. 3 Ed. Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S., Environmental Protection Agency, Cincinnati, 1994. p. 21

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. 2 Ed., Cincinnati, U.S.A. Klemm. USEPA. 1994, 437 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method guidance and recommendations for whole effluent toxicity (WET) testing. 2 ed. Washington, Usepa Editions, 2000. 60 p.

UAM. ESPAÑA. Técnicas polarográficas: determinación de fotosíntesis y respiración en suspensiones celulares de cianobacterias. [En línea]. Disponible en internet: <<http://www.uam.es/docencia/lavanfis/fr/guionfr.pdf>>

VADAS, R.L. Food web patterns in ecosystems: a reply to Fretwell and Oksanen.vol 56.Oikos, 1989. pp. 339–343.

VASSEUR, P. PANDARD, D. BURNEL. Influence of some experimental factors on metal toxicity to *Selenastrumcapricornotum*. Toxicol. Assess., 3. 1988, pp. 331–343

VELASCO, L.A, BARROS-GÓMEZ, J., OSPINA-SALAZAR, G.H. Y TRUJILLO, C.A.Efecto de la intensidad lumínica, temperatura y salinidad sobre el crecimiento de la microalga *sochrysis galbana* (clon T-ISO). En: Rev. Intrópica. Mayo, 2009. Vol. 4. p.93-99

VELASCO, L.A., S. CARRERA Y J. BARROS. Producción de microalgas como alimento para pectínidos.En: Biología y cultivo de los pectínidos de interés comercial de Colombia. Santa Marta, Editorial Unimagdalena,2008. pp. 31-63

WALSH, G.E. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae.En: Environmental Toxicology Chemical. 1988. Vol. 7, p. 979- 987.


Wikipedia. Partes por millón. [en línea]. -[Citado 3 Agosto 2013].Disponible en internet: http://es.wikipedia.org/wiki/Partes_por_mill%C3%B3n

ZAMORA. Colombia, tercer país latinoamericano en la producción de petróleo. [En línea]. Medellín (Colombia). Radio Múnera.2012 ZAMORA, A. Dirección agencia nacional de Hidrocarburos.2011-[Citado 4 agosto de 2012]. Disponible en internet: http://www.radiomunera.com/contenidos/contenidos/colombia_tercer_pais_latinoamericano_en_la_produccion_de_petroleo.php.

ZANUZZI, A.; PIEROTTO, M. y PROSPERI, C. Laboratorio de Hidrobiología.2 ed. Fac. CEFyN. Universidad Nacional de Córdoba, Colombia, 2005. p.219

8. ANEXOS

Anexo 1. Formato para los conteos de microalgas con cámara Neubauer, durante el desarrollo de los ensayos de toxicidad.

		FT-LABBIP-Versión: 01											
PÁGINA 1 DE 1		CONTEO DE MICROALGAS											
BIOENSAYO #:										Tipo de muestra:			
Fecha de inicio:					Fecha de finalización:								
DÍA	TRATAMIENTO	CONTEOS										OBSERVACIONES	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

Anexo 3. Registro de la densidad algal (cél.mL⁻¹) para la fase de cultivo usado en los experimentos de toxicidad en recipientes de 500mL en el LABBBIP año 2012.

Fecha	Densidad inicial (cél.mL⁻¹)	Densidad Final (cél.mL⁻¹)
3-ag-12	149.875	3.190.000
16-ag-12	181.500	4.042.500
13-sep-12	101.750	1.540.000
20-sep-12	182.875	3.602.500
20-sep-12	105.875	3.382.500
18-oct-12	148.500	2.035.000
01-nov-12	141.625	2.447.500
01-nov-12	140.250	2.145.000
11-abr-12	316.875	4.650.000
23-ag-12	309.375	5.225.000
06-sep-12	314.875	1.760.000
04-oct-12	319.000	2.860.000
04-oct-12	339.625	3.410.000
11-oct-12	390.500	2.145.000
25-oct-12	301.125	1.897.500
08-nov-12	308.000	2.585.000
08-nov-12	323.125	2.392.500
18-abr-12	588.750	5.400.000
06-jun-12	556.875	1.156.875
14-jun-12	541.875	2.962.500
04-ene-12	581.438	6.457.500
17-ene-12	547.313	5.381.250
24-ene-12	589.313	7.035.000

Anexo 4. Resultados del análisis microbiológico de agua del sistema de filtración y U.V.

 <p>COLOMBIA 50% MAR Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "San Martín Yribe De Asúa" - INVEMAR Instituto Marítimo de Colombia - INVEMAR</p>		FT - LABCAM - 13 Versión 04		
PAGINA 1 DE 1	INFORME DE RESULTADOS - IR-033-2012			
Programa CALIDAD AMBIENTAL MARINA Laboratorio de Calidad Ambiental Cerro Punta Betín - A.A. 1016 Tel. 4380808 Ext. 245 - Santa Marta, COLOMBIA http://invemar.org.co jbetancourt@invemar.org.co				
SOLICITANTE DEL ANALISIS	VAR			
DIRECCION DEL SOLICITANTE	Cerro Punta Betín - A.A. 1016			
Tipo de Muestreo	Muestreo realizado por	Análisis Subcontratados		
Puntual	Personal LABCAM	No		
DESCRIPCION DE LAS MUESTRAS				
ESTACION / LOCALIDAD	TIPO DE MUESTRA	FECHA DE RECOLECCION	FECHA DE RECEPCION LABCAM	ENTREGADA POR
UV microalgas flujo min.	Agua Marina	11-04-12	11-04-12	P. Bautista
UV microalgas flujo med.	Agua Marina	11-04-12	11-04-12	P. Bautista
UV microalgas flujo máx.	Agua Marina	11-04-12	11-04-12	P. Bautista
METODOLOGÍA				
ENSAYOS		TECNICAS ANALITICAS		
Vibrio sp. (UFC/100ml)		Filtración por membrana. Agar TCBS		
Aerobios mesófilos - AME (UFC/100ml)		Filtración por membrana. Agar Nutritivo		
Coliformes totales - CTT (UFC/ 100mL) SM 9222		Filtración por membrana. Agar chromocult		
Escherichia coli - ECO (UFC/ 100 mL) SM 9222		Filtración por membrana. Agar chromocult		
METODOLOGÍA				
ENSAYOS	PRECISION Desv. Est.	LIMITE DE DETECCION	Analista (s)	
Coliformes totales - CTT (UFC/ 100mL)	C +/- 2 / C *	<1 UFC	P. Bautista	
Escherichia coli - E. coli (UFC/ 100mL)	C +/- 2 / C *	<1 UFC	P. Bautista	
RESULTADOS DE ANÁLISIS				
ESTACIÓN/LOCALIDAD	Vbrio sp (UFC/100 ml)	AME (UFC/100 ml)	CTT (UFC/100 ml)	ECO (UFC/100 ml)
UV microalgas flujo min.	<1	<1	<1	<1
UV microalgas flujo med.	<1	<1	<1	<1
UV microalgas flujo máx.	<1	<1	<1	<1
Fecha de iniciación de los ensayos	11-04-2012	Fecha de terminación de los ensayos	12-04-2012	

Anexo 5. Supuestos estadísticos y análisis de varianza para intensidad lumínica (lux) y comparaciones múltiples por nivel.

Supuestos estadísticos.

Supuestos estadísticos	Prueba	Valor P para CuSO₄·5H₂O
Normalidad	Chi-cuadrado	0,92853
	Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,984255
	Valor-Z para asimetría	0,856999
Varianza	Bartlet	0,864211
Independencia	R-cuadrado	69,1308
	Estadístico Durbin-Watson	0,8725

Análisis de Varianza para intensidad lumínica (lux).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4,25894E-8	6	7,09823E-9	5,23	0,0051
Residuo	1,90176E-8	14	1,3584E-9		
Total (Corr.)	6,1607E-8	20			

Comparaciones múltiples para intensidad lumínica. Método: 95% HSD de Tukey.

Nivel	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
7	3	1,57003	0,0000212791	X
5	3	1,57006	0,0000212791	X
1	3	1,57009	0,0000212791	X
3	3	1,57011	0,0000212791	X
4	3	1,57011	0,0000212791	X
2	3	1,57012	0,0000212791	X
6	3	1,57018	0,0000212791	X

Anexo 6. Análisis de Varianza de la Tasa Específica de Crecimiento (TEC) a tres densidades iniciales de siembra.

Supuestos estadísticos.

Supuestos estadísticos	Prueba	Valor P para CuSO₄.5H₂O
Normalidad	Valor-Z para asimetría	0,295939
Varianza	Bartlet	0,230666
Independencia	R-cuadrado	91,2381
	Estadístico Durbin-Watson	0,4191

Análisis de varianza para TEC por tratamiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamiento	0,00682272	2	0,00341136	31,24	0,0007
Residuo	0,000655209	6	0,000109201		
Total (corregido)	0,00747793	8			

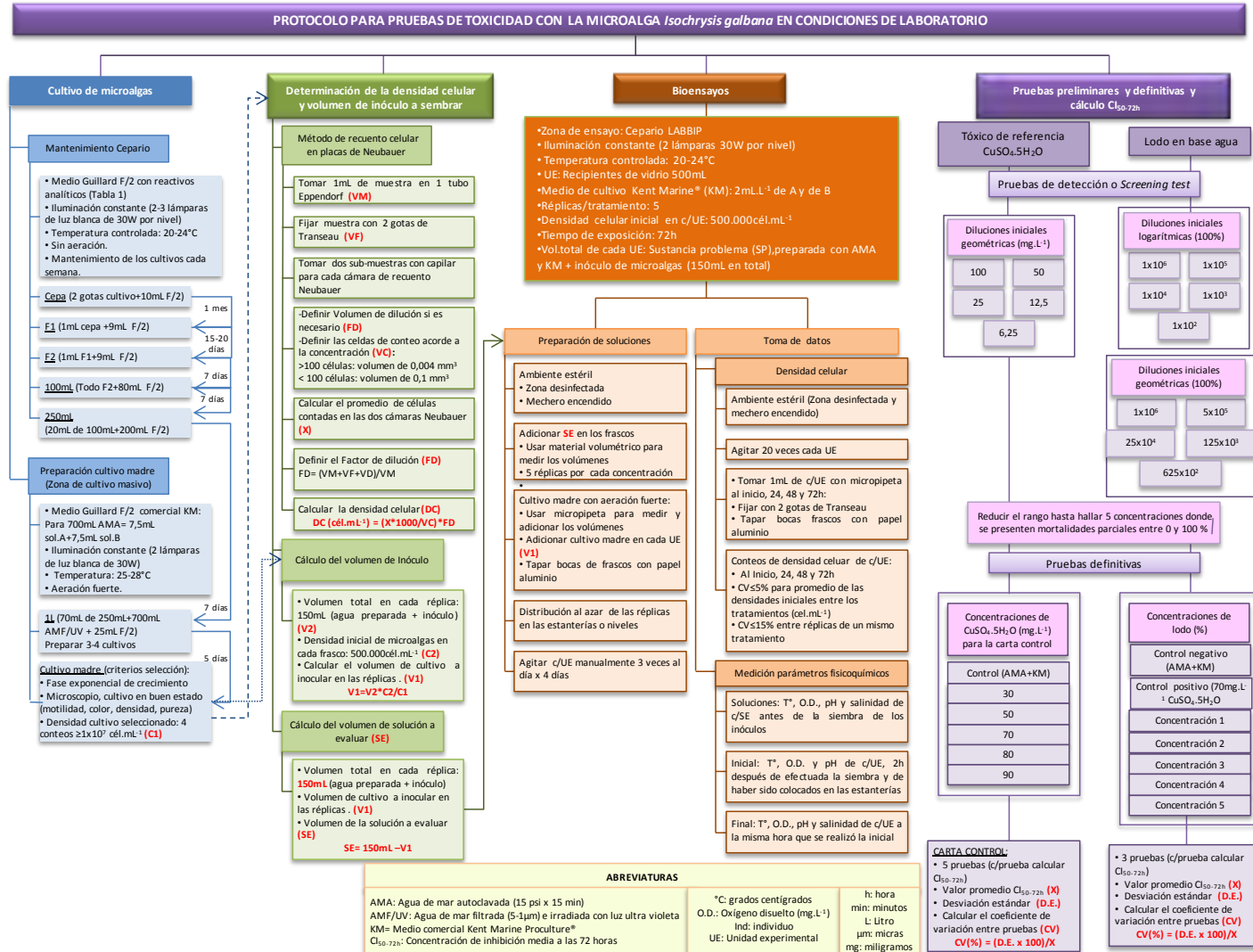
Comparaciones múltiples para TEC por tratamiento. Método: 95% HSD de Tukey.

Tratamiento	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
T2	3	0,233353	0,00603328	X
T3	3	0,233353	0,00603328	X
T1	3	0,29176	0,00603328	X

Anexo 7. Densidad celular diaria y CV% a tres densidades iniciales de siembra: T1 (150.000cel.mL⁻¹), T2 (300.000cel.mL⁻¹)y T3(500.000cel.mL⁻¹).

Día	Réplica	Densidad (cél.mL ⁻¹)	CV%	Densidad (cél.mL ⁻¹)	CV%	Densidad (cél.mL ⁻¹)	CV%
1	1	195.563		343.875		574.875	
	2	166.688	8,0	329.438	3,79	569.625	2,33
	3	181.125		318.938		549.938	
2	1	290.063		360.938		669.375	
	2	253.313	6,8	376.688	6,55	557.813	9,42
	3	274.313		330.750		645.750	
3	1	1.155.000		1.601.250		2.756.250	
	2	1.155.000	1,3	1.758.750	4,80	2.782.500	4,80
	3	1.181.250		1.653.750		2.546.250	
4	1	2.441.250		3.675.000		5.040.000	
	2	2.808.750	7,3	3.648.750	8,02	4.620.000	4,38
	3	2.730.000		3.176.250		4.882.500	
5	1	2.625.000		4.173.750		5.932.500	
	2	4.410.000	25,7	5.276.250	12,33	5.276.250	5,86
	3	4.095.000		4.462.500		5.643.750	
6	1	2.940.000		4.147.500		7.743.750	
	2	5.171.250	32,1	6.693.750	27,38	6.510.000	11,24
	3	5.748.750		4.436.250		6.326.250	
7	1	3.937.500		4.147.500		9.555.000	
	2	5.118.750	30,0	7.980.000	35,59	6.457.500	22,10
	3	7.140.000		4.935.000		9.948.750	
8	1	4.777.500		4.068.750		10.631.250	
	2	6.378.750	15,1	9.082.500	39,10	8.190.000	14,58
	3	6.168.750		6.168.750		8.505.000	
9	1	6.300.000		5.171.250		12.442.500	
	2	7.323.750	8,6	11.497.500	39,13	7.192.500	31,22
	3	7.350.000		11.628.750		7.848.750	
10	1	6.720.000		5.486.250		9.870.000	
	2	10.368.750	22,2	17.036.250	59,20	9.660.000	2,26
	3	9.975.000		8.137.500		10.106.250	
11	1	6.772.500		5.853.750		10.815.000	
	2	10.185.000	20,1	11.287.500	31,47	7.297.500	19,57
	3	9.161.250		10.106.250		9.922.500	
12	1	6.693.750		6.562.500		9.581.250	
	2	7.061.250	8,4	9.345.000	17,75	7.218.750	15,58
	3	7.875.000		7.717.500		9.607.500	
13	1	6.378.750		6.352.500		8.032.500	
	2	6.405.000	0,6	8.242.500	13,00	8.032.500	6,71
	3	6.457.500		7.612.500		9.003.750	

Anexo 8. Protocolo para la realización de bioensayos de toxicidad con la microalga *I. galbana*.



Anexo 9. Supuestos estadísticos para bioensayos con tóxico de referencia.

Supuestos estadísticos	Prueba	Valor P para CuSO ₄ .5H ₂ O
Normalidad	Chi-cuadrado	0
	Estadístico W de Shapiro-Wilk	0
	Valor-Z para asimetría	0,00324144
Varianza	Bartlet	0,739691
Independencia	R-cuadrado	99,9129
	Estadístico Durbin-Watson	0

Anexo 10. Análisis de varianza de los bioensayos definitivos son sulfato de cobre penta-hidratado como tóxico de referencia, utilizando modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,00124866	2	0,000624331	3,00	0,0879
Tratamientos (CuSO ₄)	2,8503	6	0,47505	2281,32	0,0000
Muestra o réplica (Bioensayo*CuSO ₄)	0,0155902	83	0,000187834	0,90	0,6355
Residuo	0,00249881	12	0,000208235		
Total (corregido)	2,86967	103			

Anexo 11. Comparaciones Múltiples para TEC por CuSO₄. Con método: 95% Scheffe

CuSO ₄	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
120	14	-0,250603	0,00385935	X
90	15	-0,00665887	0,0037259	X
80	15	0,0849729	0,0037259	X
70	15	0,169992	0,0037259	X
50	15	0,214565	0,0037259	X
30	15	0,238552	0,0037259	X
0	15	0,263836	0,0037259	X

Anexo 12. Análisis de Varianza para valores de Oxígeno iniciales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.

Análisis de varianza para el modelo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	33,0272	87	0,379623	13,59	0,0000
Residuo	0,335257	12	0,0279381		
Total (Corr.)	33,3625	99			

Suma de Cuadrados Tipo III. Análisis de varianza para Bioensayos, tratamientos y muestras mediante modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,173219	2	0,0866095	3,10	0,0822
Tratamientos CuSO4	27,9743	6	4,66238	166,88	0,0000
Muestra (Bioensayo*CuSO4)	4,83246	79	0,0611704	2,19	0,0663
Residuo	0,335257	12	0,0279381		
Total (corregido)	33,3625	99			

Comparaciones Múltiples para Oxígeno por CuSO4. Método: 95% LSDSchieffe.

CuSO₄	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
120	13	10,4117	0,0463937	X
90	15	10,5727	0,0431572	X
80	15	10,79	0,0431572	X
70	15	11,1227	0,0431572	X
50	15	11,4813	0,0431572	X
30	13	11,8031	0,0465046	X
0	14	11,8463	0,0447036	X

Anexo 13. Análisis de Varianza para valores de Oxígeno finales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	236,028	85	2,7768	3,92	0,0059
Residuo	8,49998	12	0,708331		
Total (Corr.)	244,528	97			

Suma de Cuadrados Tipo III, Análisis de varianza para Bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	1,17713	2	0,588566	0,83	0,4592
Tratamientos CuSO4	190,317	6	31,7195	44,78	0,0000
Muestra (Bioensayo*CuSO4)	44,9697	77	0,584022	0,82	0,7101
Residuo	8,49998	12	0,708331		
Total (corregido)	244,528	97			

Comparaciones Múltiples para Oxígeno por CuSO4 Método: 95% Duncan.

CuSO₄	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
120	14	10,6516	0,225103	X
90	15	12,7353	0,217306	X
80	14	13,6599	0,2251	X
50	14	13,7913	0,2251	X
30	13	14,0001	0,233602	X
70	15	14,0227	0,217306	X
0	13	15,6343	0,234183	X

Anexo 14. Análisis de Varianza para valores de pH iniciales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.

Análisis de varianza para el modelo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3,26079	87	0,0374803	26,75	0,0000
Residuo	0,0168119	12	0,00140099		
Total (Corr.)	3,2776	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,0098548	2	0,0049274	3,52	0,0628
Tratamientos CuSO4	3,1058	6	0,517633	369,48	0,0000
Muestra (Bioensayo*CuSO4)	0,14	79	0,00177215	1,26	0,3414
Residuo	0,0168119	12	0,00140099		
Total (corregido)	3,2776	99			

Comparaciones Múltiples para pH por CuSO4, Método: 95% Duncan.

CuSO₄	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
120	10	7,00069	0,0118481	X
90	15	7,11333	0,00966433	X
80	15	7,13333	0,00966433	X
70	15	7,2	0,00966433	X
50	15	7,34	0,00966433	X
0	15	7,5	0,00966433	X
30	15	7,5	0,00966433	X

Anexo 15. Análisis de Varianza para valores de pH finales y prueba de Duncan para tóxico de referencia.

Análisis de varianza para el modelo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11,1728	81	0,137936	20,34	0,0000
Residuo	0,0813731	12	0,00678109		
Total (Corr.)	11,2541	93			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,0380482	2	0,0190241	2,81	0,1001
CuSO4	10,9138	6	1,81897	268,24	0,0000
Muestra (Bioensayo*CuSO4)	0,252667	73	0,00346119	0,51	0,9593
Residuo	0,0813731	12	0,00678109		
Total (corregido)	11,2541	93			

Comparaciones Múltiples para pH por CuSO4.Método: 95% Duncan.

CuSO4	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
120	14	8,09938	0,0220253	X
90	13	8,55053	0,0229194	X
80	14	8,6708	0,0220253	X
70	14	8,85918	0,0220263	X
50	13	9,03998	0,0228569	X
0	13	9,08899	0,0229194	X
30	13	9,10921	0,0228569	X

Anexo 16. Análisis de Varianza para valores de temperatura inicial para tóxico de referencia.

Análisis de varianza para el modelo

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,0000839092	87	9,64473E-7	5,08	0,0017
Residuo	0,00000227837	12	1,89865E-7		
Total (Corr.)	0,0000861876	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	5,3834E-7	2	2,6917E-7	1,42	0,2801
CuSO4	0,00000284053	6	4,73422E-7	2,49	0,0839
Muestra (Bioensayo*CuSO4)	0,0000805577	79	0,00000101972	5,37	0,0013
Residuo	0,00000227837	12	1,89865E-7		
Total (corregido)	0,0000861876	99			

Anexo 17. Análisis de Varianza para valores de temperatura finales para tóxico de referencia.

Análisis de varianza para el modelo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,000199545	87	0,00000229362	2,40	0,0464
Residuo	0,0000114464	12	9,53863E-7		
Total (Corr.)	0,000210991	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,00000341245	2	0,00000170623	1,79	0,2090
CuSO4	0,0000122668	6	0,00000204447	2,14	0,1230
Muestra (Bioensayo*CuSO4)	0,000183676	79	0,00000232502	2,44	0,0445
Residuo	0,0000114464	12	9,53863E-7		
Total (corregido)	0,000210991	99			

Anexo 18. Prueba de Hipótesis para Salinidad inicial-Salinidad final.

Hipótesis Nula: media = 0,0

Alternativa: no igual

Media Muestral	0,0221154
Mediana muestral	0
Desviación Estándar de la Muestra	0,295913
Estadístico t	0,762162
Valor-P	0,447705

*No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Anexo 19. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 1 con tóxico de referencia.

1 BIOENSAYO (Tóxico de referencia CuSO4)													
TRATAMIENTOS	RÉPLICA	Cél/mL- Día 0	Cél/mL-Día 3 (72h)	TEC-TOTAL	D.E	C.V %	E.EST	Incremento total	%Inhibición (del incremento)	%I PROMEDIO	D.E	E. EST.	C.V.%
Control	1	599.500	3.437.500	0,25281784	0,00730479	2,88663767	0,00365239	2.838.000		0			
	2	596.750	3.217.500	0,24390871				2.620.750					
	3	585.750	3.575.000	0,26185458				2.989.250					
	4	572.000	3.410.000	0,25845278				2.838.000					
	5	594.000	3.300.000	0,24824250				2.706.000					
PROMEDIO							2.798.400						
CUSO4-30	1	693000	2.915.000	0,20796844	0,01911457	8,31417132	0,00955729	2.222.000	20,60	17,27	3,54	1,768816741	20,48887781
	2	633875	2.832.500	0,21672210				2.198.625	21,43				
	3	603625	3.025.000	0,23331939				2.421.375	13,47				
	4	477125	2.832.500	0,25784592				2.355.375	15,83				
	5	591250	2.970.000	0,23366177				2.378.750	15,00				
CUSO4-50	1	613.250	2.475.000	0,20197922	0,01935182	9,11520648	0,00967591	1.861.750	33,47	32,39	3,47	1,736410455	10,7219131
	2	574.750	2.502.500	0,21296504				1.927.750	31,11				
	3	655.875	2.392.500	0,18734362				1.736.625	37,94				
	4	470.250	2.447.500	0,23879797				1.977.250	29,34				
	5	545.875	2.502.500	0,22042696				1.956.625	30,08				
CUSO4-70	1	512.875	1.952.500	0,19352650	0,01565101	9,12858211	0,00782550	1.439.625	48,56	54,37	3,50	1,74875831	6,432446978
	2	578.875	1.815.000	0,16543061				1.236.125	55,83				
	3	526.625	1.815.000	0,17912505				1.288.375	53,96				
	4	664.125	1.897.500	0,15197732				1.233.375	55,93				
	5	545.875	1.732.500	0,16719335				1.186.625	57,60				
CUSO4-80	1	588.500	1.006.500	0,07768910	0,01387965	18,51909787	0,00693983	418.000	85,06	85,37	3,91	1,953349031	4,576327787
	2	614.625	1.045.000	0,07683536				430.375	84,62				
	3	603.625	962.500	0,06754451				358.875	87,18				
	4	554.125	825.000	0,05761540				270.875	90,32				
	5	613.250	1.182.500	0,09505453				569.250	79,66				
CuSO4-90	1	591.250	449.625	-0,03964023	0,02104541	-153,86593468	0,01052271	-141.625	105,06	101,76	2,71	1,353048718	2,659318928
	2	587.125	467.500	-0,03298299				-119.625	104,27				
	3	573.375	558.250	-0,00387001				-15.125	100,54				
	4	532.125	547.250	0,00405737				15.125	99,46				
	5	533.500	548.625	0,00404706				15.125	99,46				
CUSO4-120	1	556.875	115.500	-0,22772525	0,01041210	-4,33743182	0,00601143	-441.375	115,77	116,02	1,40	0,809365114	1,208312944
	2	595.375	88.000										
	3	554.125	97.625	-0,25134890				-456.500	116,31				
	4	606.375	111.375	-0,24531786				-495.000	117,69				
	5	497.750	97.625	-0,23581674				-400.125	114,30				

Anexo 20. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 2 con tóxico de referencia.

2 BIOENSAYO (Tóxico de referencia CuSO4)												
TRATAMIENTOS	RÉPLICA	Cél/mL-Día 0	Cél/mL-Día 3 (72h)	TEC-TOTAL	D.E	C.V. %	E. EST.	Incremento	%Inhibición (del incremento)	%I PROMEDIO	D.E.	ERROR. EST
Control	1	554.125	3.327.500	0,25950344	0,00977821	3,74607068	0,00488911	2.773.375		0		0,00
	2	598.125	3.410.000	0,25198747				2.811.875				
	3	574.750	3.272.500	0,25180023				2.697.750				
	4	530.750	3.520.000	0,27388422				2.989.250				
	5	548.625	3.492.500	0,26795361				2.943.875				
PROMEDIO							2.843.225					
CUSO4-30	1	577500	2.970.000	0,23706815	0,01015063	4,32523825	0,00507531	2.392.500	15,85	17,92	2,64	1,317925532
	2	581625	2.860.000	0,23057432				2.278.375	19,87			
	3	624250	2.860.000	0,22033583				2.235.750	21,37			
	4	565125	2.915.000	0,23749801				2.349.875	17,35			
	5	530750	2.942.500	0,24794216				2.411.750	15,18			
CUSO4-50	1	523.875	2.447.500	0,22316501	0,01161779	5,55631243	0,00580890	1.923.625	32,34	34,70	2,68	1,341886179
	2	606.375	2.337.500	0,19533678				1.731.125	39,11			
	3	539.000	2.447.500	0,21904465				1.908.500	32,88			
	4	602.250	2.475.000	0,20459946				1.872.750	34,13			
	5	600.875	2.447.500	0,20331286				1.846.625	35,05			
CUSO4-70	1	585.750	1.457.500	0,13196542	0,01691679	10,44449124	0,00845840	871.750	69,34	59,04	5,85	2,92616457
	2	565.125	1.815.000	0,16891070				1.249.875	56,04			
	3	567.875	1.815.000	0,16820796				1.247.125	56,14			
	4	544.500	1.732.500	0,16755845				1.188.000	58,22			
	5	548.625	1.815.000	0,17320035				1.266.375	55,46			
CUSO4-80	1	554.125	1.045.000	0,09183618	0,01665273	19,74941867	0,00832637	490.875	82,74	84,34	3,51	1,753812824
	2	598.125	962.500	0,06886959				364.375	87,18			
	3	574.750	935.000	0,07044421				360.250	87,33			
	4	530.750	1.127.500	0,10907552				596.750	79,01			
	5	548.625	962.500	0,08137505				413.875	85,44			
CuSO4-90	1	577.500	558.250	-0,00490775	0,00829680	-193,10714630	0,00414840	-19.250	100,68	100,62	1,16	0,581182672
	2	581.625	558.250	-0,00593811				-23.375	100,82			
	3	624.250	559.625	-0,01582048				-64.625	102,27			
	4	565.125	556.875	-0,00212893				-8.250	100,29			
	5	530.750	558.250	0,00731291				27.500	99,03			
CUSO4-120	1	554.125	114.125	-0,22874232	0,01764416	-7,15561637	0,00882208	-440.000	115,48	116,07	1,03	0,513055348
	2	585.750	93.500	-0,26563356				-492.250	117,31			
	3	574.750	94.875	-0,26077573				-479.875	116,88			
	4	530.750	110.000	-0,22783244				-420.750	114,80			
	5	548.625	97.625	-0,24990485				-451.000	115,86			

Anexo 21. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 3 con tóxico de referencia.

3 BIOENSAYO (Tóxico de referencia CuSO4)												
TRATAMIENTOS	RÉPLICA	Cél/mL-Día 0	Cél/mL-Día 3 (72h)	TEC-TOTAL	D.E	C.V %	E. ESTANDAR	Incremento	%Inhibición (del incremento)	%I PROMEDIO	D.E	E.ESTANDAR
Control	1	511.500	3.327.500	0,27109081	0,00815655	3,04079759	0,00407827	2.816.000		0		
	2	540.375	3.245.000	0,25950648				2.704.625				
	3	523.875	3.630.000	0,28022632				3.106.125				
	4	562.375	3.437.500	0,26207223				2.875.125				
	5	512.875	3.272.500	0,26828938				2.759.625				
PROMEDIO							2.852.300					
CUSO4-30	1	539000	2.502.500	0,22226177	0,01380725	5,65362122	0,00690363	1.963.500	31,16	19,36	7,67	3,833320194
	2	503250	2.805.000	0,24871636				2.301.750	19,30			
	3	550000	3.080.000	0,24939601				2.530.000	11,30			
	4	523875	2.777.500	0,24147546				2.253.625	20,99			
	5	490875	2.942.500	0,25924852				2.451.625	14,05			
CUSO4-50	1	518.375	2.255.000	0,21283417	0,00546979	2,51691763	0,00273490	1.736.625	39,11	36,15	4,05	2,024150918
	2	518.375	2.392.500	0,22140263				1.874.125	34,29			
	3	508.750	2.172.500	0,21015179				1.663.750	41,67			
	4	541.750	2.475.000	0,21992543				1.933.250	32,22			
	5	521.125	2.420.000	0,22229115				1.898.875	33,43			
CUSO4-70	1	534.875	1.677.500	0,16547008	0,00658048	3,78060581	0,00329024	1.142.625	59,94	56,30	2,15	1,072612847
	2	532.125	1.787.500	0,17541080				1.255.375	55,99			
	3	547.250	1.815.000	0,17356362				1.267.750	55,55			
	4	510.125	1.815.000	0,18373334				1.304.875	54,25			
	5	552.750	1.815.000	0,17211596				1.262.250	55,75			
CUSO4-80	1	537.625	935.000	0,08011072	0,01692092	17,75379178	0,00846046	397.375	86,07	82,73	3,90	1,951136454
	2	503.250	1.045.000	0,10577750				541.750	81,01			
	3	548.625	935.000	0,07717867				386.375	86,45			
	4	526.625	1.182.500	0,11709989				655.875	77,01			
	5	508.750	990.000	0,09637692				481.250	83,13			
CuSO4-90	1	522.500	521.125	-0,00038146	0,00570468	-285,39768726	0,00285234	-1.375	100,05	100,25	0,73	0,363713161
	2	547.250	537.625	-0,00256877				-9.625	100,34			
	3	511.500	500.500	-0,00314719				-11.000	100,39			
	4	541.750	506.000	-0,00988280				-35.750	101,25			
	5	521.125	543.125	0,00598596				22.000	99,23			
CUSO4-120	1	534.875	94.875	-0,25036684	0,00910336	-3,56962696	0,00455168	-440.000	115,43	115,54	0,50	0,250837076
	2	532.125	94.875	-0,24962062				-437.250	115,33			
	3	547.250	85.250	-0,26916379				-462.000	116,20			
	4	510.125	85.250	-0,25899407				-424.875	114,90			
	5	552.750	100.375	-0,24696773				-452.375	115,86			

Anexo 22. Supuestos estadísticos para bioensayos con Lodo.

Supuestos estadísticos	Prueba	Valor P para Lodo
Normalidad	Chi-cuadrado	0
	Estadístico W de Shapiro-Wilk	0
	Valor-Z para asimetría	0,00668462
Varianza	Bartlet	0,0859503
Independencia	R-cuadrado	99,9126
	Estadístico Durbin-Watson	0

Anexo 23. Análisis de Varianza para bioensayos con lodo, utilizando modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,000393585	2	0,000196793	3,59	0,0599
Lodo	0,749782	6	0,124964	2280,71	0,0000
Muestra (Bioensayo*Lodo)	0,00198625	82	0,0000242225	0,44	0,9843
Residuo	0,000657498	12	0,0000547915		
Total (corregido)	0,752472	102			

Anexo 24. Comparaciones Múltiples para TEC por Lodo. Con método: 95%Scheffe.

Lodo	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
60	13	-0,0138259	0,0020545	X
50	15	0,11683	0,00191122	X
45	15	0,168325	0,00191122	X
1	15	0,17176	0,00191122	X
40	15	0,224035	0,00191122	X
35	15	0,246551	0,00191122	X
0	15	0,265702	0,00191122	X

Anexo 25. Análisis de Varianza para valores de oxígeno iniciales de lodo y prueba de Duncan.

Análisis de Varianza para el modelo

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	317,368	87	3,64791	7,72	0,0002
Residuo	5,66997	12	0,472498		
Total (Corr.)	323,038	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	2,00929	2	1,00464	2,13	0,1620
Lodo	311,241	6	51,8735	109,79	0,0000
Muestra (Bioensayo*Lodo)	5,11196	79	0,0647083	0,14	1,0000
Residuo	5,66997	12	0,472498		
Total (corregido)	323,038	99			

Comparaciones Múltiples para Oxígeno por Lodo. Método: 95% Duncan.

Lodo	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
60	15	6,594	0,177482	X
50	15	6,97733	0,177482	XX
45	15	7,40733	0,177482	XX
40	15	7,71933	0,177482	X
35	15	8,516	0,177482	X
1	13	11,0913	0,190794	X
0	12	11,5103	0,198927	X

Anexo 26. Análisis de Varianza para valores de oxígeno finales de lodo y prueba de Duncan.

Análisis de Varianza para el modelo.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2045,06	85	24,0595	183,26	0,0000
Residuo	1,57548	12	0,13129		
Total (Corr.)	2046,63	97			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,0885966	2	0,0442983	0,34	0,7202
Lodo	2022,82	6	337,136	2567,88	0,0000
Muestra (Bioensayo*Lodo)	16,5766	77	0,21528	1,64	0,1724
Residuo	1,57548	12	0,13129		
Total (corregido)	2046,63	97			

Comparaciones Múltiples para Oxígeno por Lodo. Método: 95% Duncan.

Lodo	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
50	14	1,49364	0,0969108	X
60	14	1,5015	0,0969108	X
45	13	8,73657	0,100574	X
40	14	9,57747	0,0969098	X
35	14	11,3375	0,0969098	X
1	15	11,4927	0,0935556	X
0	14	13,821	0,0969097	X

Anexo 27. Análisis de Varianza para valores de pH iniciales de lodo y prueba de Duncan.

Análisis de Varianza para el modelo

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2,11244	87	0,024281	13,04	0,0000
Residuo	0,0223363	12	0,00186136		
Total (Corr.)	2,13478	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,00662868	2	0,00331434	1,78	0,2103
Lodo	2,0674	6	0,344566	185,12	0,0000
Muestra (Bioensayo*Lodo)	0,037315	79	0,000472342	0,25	0,9999
Residuo	0,0223363	12	0,00186136		
Total (corregido)	2,13478	99			

Comparaciones Múltiples para pH por Lodo. Método: 95% Duncan.

Lodo	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
1	10	7,46779	0,0136567	X
0	15	7,696	0,0111396	X
45	15	7,89733	0,0111396	X
40	15	7,906	0,0111396	X
50	15	7,908	0,0111396	X
35	15	7,91333	0,0111396	X
60	15	7,92667	0,0111396	X

Anexo 28. Análisis de Varianza para valores de pH finales de lodo y prueba de Duncan.

Análisis de Varianza para el modelo

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	23,8899	87	0,274597	165,91	0,0000
Residuo	0,0198615	12	0,00165513		
Total (Corr.)	23,9098	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	0,0019158	2	0,000957901	0,58	0,5755
Lodo	23,2436	6	3,87393	2340,56	0,0000
Muestra (Bioensayo*Lodo)	0,644155	79	0,00815386	4,93	0,0020
Residuo	0,0198615	12	0,00165513		
Total (corregido)	23,9098	99			

Comparaciones Múltiples para pH por Lodo. Método: 95% Duncan.

Lodo	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
60	15	7,81333	0,0169105	X
50	11	8,00087	0,0197657	X
45	15	8,28	0,0169105	X
40	15	8,41333	0,0169105	X
1	13	8,71473	0,0181787	X
35	15	8,78	0,0169105	X
0	15	9,22	0,0169105	X

Anexo 29. Análisis de Varianza para valores de temperatura iniciales de lodo.

Análisis de Varianza para el modelo.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,0000130849	87	1,50401E-7	3,84	0,0064
Residuo	4,70084E-7	12	3,91736E-8		
Total (Corr.)	0,000013555	99			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	8,07922E-8	2	4,03961E-8	1,03	0,3861
Lodo	6,41754E-7	6	1,06959E-7	2,73	0,0655
Muestra (Bioensayo*Lodo)	0,000012379	79	1,56696E-7	4,00	0,0054
Residuo	4,70084E-7	12	3,91736E-8		
Total (corregido)	0,000013555	99			

Anexo 30. Análisis de Varianza para valores de temperatura finales de lodo.

Análisis de Varianza para el modelo

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0,000113646	82	0,00000138593	6,01	0,0007
Residuo	0,00000276538	12	2,30449E-7		
Total (Corr.)	0,000116412	94			

Suma de Cuadrados Tipo III, análisis de varianza para bioensayos, tratamientos y muestras a partir de modelos lineales generalizados.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Bioensayo	7,4576E-7	2	3,7288E-7	1,62	0,2387
Lodo	0,00000409989	6	6,83316E-7	2,97	0,0516
Muestra (Bioensayo*Lodo)	0,000108932	74	0,00000147206	6,39	0,0006
Residuo	0,00000276538	12	2,30449E-7		
Total (corregido)	0,000116412	94			

Anexo 31. Prueba de Hipótesis para Salinidad Inicial-Salinidad Final de bioensayos definitivos con lodo.

Prueba t
 Hipótesis Nula: media = 0,0
 Alternativa: no igual

Media Muestral	-0,001
Mediana muestral	0
Desviación Estándar de la Muestra	0,01
Estadístico t	-1,0
Valor-P	0,319749

*No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Anexo 32. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 1 con lodo.

1 BIOENSAYO (Lodo)											
TRATAMIENTOS	RÉPLICA	Cél/mL-Día 0	Cél/mL-Día 3 (72h)	TEC-TOTAL	D.E.	ERROR EST.	Incremento total	%Inhibición (del incremento)	DE	CV%	ERROR EST.
Control (-)	1	554.125	3.410.000	0,2630488782	0,0036681000	0,0018340500	2.855.875				
	2	540.375	3.520.000	0,2712824716			2.979.625				
	3	554.125	3.465.000	0,2653651649			2.910.875				
	4	558.250	3.410.000	0,2619752157			2.851.750				
	5	555.500	3.437.500	0,2638528812			2.882.000				
	Promedio	552.475	3.448.500	0,2651058666			2.896.025				
CUSO4-70 (Control +)	1	525250	1.815.000	0,1795035228	0,0115834223	0,0057917112	1.289.750	55,46			
	2	610500	1.760.000	0,1532756665			1.149.500	60,31			
	3	517000	1.787.500	0,1795851691			1.270.500	56,13			
	4	522500	1.815.000	0,1802634449			1.292.500	55,37			
	5	519750	1.760.000	0,1765727233			1.240.250	57,17			
	Promedio	539000	1.787.500	0,1735524284			1.248.500	56,89	2,04	3,59	1,021071749
Lodo 35%	1	550.000	3.135.000	0,2519582852	0,0036164936	0,0018082468	2.585.000	10,74			
	2	550.000	3.107.500	0,2506828159			2.557.500	11,69			
	3	539.000	3.052.500	0,2510223025			2.513.500	13,21			
	4	552.750	3.080.000	0,2486739884			2.527.250	12,73			
	5	559.625	2.997.500	0,2429540281			2.437.875	15,82			
	Promedio	550.275	3.074.500	0,2490649050			2.524.225	12,84	1,92	14,96	0,960552848
Lodo 40%	1	547.250	2.667.500	0,2293062193	0,0025417579	0,0012708790	2.120.250	26,79			
	2	554.125	2.612.500	0,2244828516			2.058.375	28,92			
	3	556.875	2.640.000	0,2252820685			2.083.125	28,07			
	4	550.000	2.695.000	0,2300653600			2.145.000	25,93			
	5	555.500	2.640.000	0,2256399545			2.084.500	28,02			
	Promedio	552.750	2.651.000	0,2269603255			2.098.250	27,55	1,18	4,29	0,590391706
Lodo 45%	1	554.125	1.732.500	0,1650218330	0,0060555959	0,0030277980	1.178.375	59,31			
	2	540.375	1.842.500	0,1775707493			1.302.125	55,04			
	3	559.625	1.732.500	0,1635920453			1.172.875	59,50			
	4	550.000	1.705.000	0,1637872313			1.155.000	60,12			
	5	556.875	1.815.000	0,1710396360			1.258.125	56,56			
	Promedio	552.200	1.765.500	0,1682571065			1.213.300	58,10	2,19	3,78	1,097111297
Lodo 50%	1	550.000	1.210.000	0,1141408936	0,0039684356	0,0019842178	660.000	77,21			
	2	556.875	1.292.500	0,1218909435			735.625	74,60			
	3	555.500	1.237.500	0,1159537148			682.000	76,45			
	4	547.250	1.283.333	0,1233845682			736.083	74,58			
	5	551.375	1.237.500	0,1170327123			686.125	76,31			
	Promedio	552.200	1.252.167	0,1185219121			699.967	75,83	1,18	1,56	0,591038328
Lodo 60%	1	566.500	493.625	-0,0199342558	0,0038103775	0,0019842178	-72.875	102,52			
	2	554.125	507.375	-0,0127595600			-46.750	101,61			
	3	528.000	495.000	-0,0093429079			-33.000	101,14			
	4	556.875	507.375	-0,0134762190			-49.500	101,71			
	5	551.375	515.625	-0,0097043683			-35.750	101,23			
	Promedio	551.375	503.800	-0,0130629692			-47.575	101,64	0,49	0,48	0,27253865

Anexo 33. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 2 con lodo.

2 BIOENSAYO (Lodo)											
TRATAMIENTOS	RÉPLICA	Cél/mL-Día 0	Cél/mL-Día 3 (72h)	TEC-TOTAL	D.E.	ERROR EST.	Incremento	%Inhibición (del incremento)	DE	CV%	ERROR EST.
Control (-)	1	581.625	3.437.500	0,2571998804	0,0019800144	0,0009900072	2.855.875				
	2	576.125	3.410.000	0,2574125526			2.833.875				
	3	562.375	3.355.000	0,2585555061			2.792.625				
	4	567.875	3.465.000	0,2618168297			2.897.125				
	5	567.875	3.355.000	0,2571465916			2.787.125				
	Promedio	571.175	3.404.500	0,2584280494			2.833.325				
CUSO4-70 (Control +)	1	585750	1.842.500	0,1658983998	0,0057229854	0,0028614927	1.256.750	55,64			0,93842281
	2	556875	1.815.000	0,1710396360			1.258.125	55,60			
	3	572000	1.732.500	0,1604257382			1.160.500	59,04			
	4	561000	1.760.000	0,1655166022			1.199.000	57,68			
	5	548625	1.842.500	0,1753773009			1.293.875	54,33			
	Promedio	564850	1798500	0,1676591030			1.233.650	56,46	1,88	3,32	
Lodo 35%	1	570.625	3.025.000	0,2414581947	0,0051463275	0,0025731638	2.454.375	13,37			1,030410558
	2	562.375	2.997.500	0,2422443952			2.435.125	14,05			
	3	561.000	3.025.000	0,2439208392			2.464.000	13,04			
	4	561.000	3.025.000	0,2439208392			2.464.000	13,04			
	5	588.500	2.915.000	0,2316306973			2.326.500	17,89			
	Promedio	568.700	2.997.500	0,2406253212			2.428.800	14,28	2,06	14,43	
Lodo 40%	1	566.500	2.585.000	0,2197535444	0,0049745824	0,0024872912	2.018.500	28,76			1,211296125
	2	570.625	2.640.000	0,2217510440			2.069.375	26,96			
	3	577.500	2.502.500	0,2122740325			1.925.000	32,06			
	4	561.000	2.667.500	0,2257138556			2.106.500	25,65			
	5	563.750	2.612.500	0,2219899147			2.048.750	27,69			
	Promedio	567.875	2.601.500	0,2203236935			2.033.625	28,22	2,42	8,58	
Lodo 45%	1	550.000	1.760.000	0,1683833261	0,0031038825	0,0015519413	1.210.000	57,29			0,511693469
	2	562.375	1.787.500	0,1674066814			1.225.125	56,76			
	3	572.000	1.842.500	0,1693371559			1.270.500	55,16			
	4	569.250	1.787.500	0,1656476704			1.218.250	57,00			
	5	545.875	1.815.000	0,1739278081			1.269.125	55,21			
	Promedio	559.900	1.798.500	0,1689333249			1.238.600	56,28	1,02	1,82	
lodo 50%	1	551.375	1.292.500	0,1233278270	0,0034333283	0,0017166642	741.125	73,84			0,357277731
	2	558.250	1.320.000	0,1245817332			761.750	73,11			
	3	578.875	1.292.500	0,1162819193			713.625	74,81			
	4	562.375	1.320.000	0,1235159750			757.625	73,26			
	5	565.125	1.292.500	0,1197620106			727.375	74,33			
	Promedio	563.200	1.303.500	0,1214827965			740.300	73,87	0,71	0,97	
Lodo 60%	1	566.500	512.875	-0,0143961281	0,0060049777	0,0030024889	-53.625	101,89			0,426397799
	2	556.875	518.375	-0,0103712243			-38.500	101,36			
	3	606.375	517.000	-0,0230835815			-89.375	103,15			
	4	544.500	507.375	-0,0102229399			-37.125	101,31			
	5	596.750	515.625	-0,0211528206			-81.125	102,86			
	Promedio	574.200	514.250	-0,0159629626			-59.950	102,12	0,85	0,84	

Anexo 34. Densidad celular inicial y final del bioensayo definitivo 3 con lodo.

3 BIOENSAYO (Lodo)												
TRATAMIENTOS	RÉPLICA	Cél/mL-Día 0	Cél/mL-Día 3 (72h)	TEC-TOTAL	D.E.	ERROR EST.	Incremento	%Inhibición (del incremento)	DE	CV%	ERROR EST.	
Control (-)	1	594.000	3.712.500	0,2652933391	0,0027976740	0,0013988370	3.118.500					
	2	592.625	3.657.500	0,2634681222			3.064.875					
	3	591.250	3.767.500	0,2680940357			3.176.250					
	4	573.375	3.465.000	0,2604214953			2.891.625					
	5	573.375	3.547.500	0,2638278837			2.974.125					
	Promedio	584.925	3.630.000	0,2642688138			3.045.075					
CUSO4-70 (Control +)	1	552750	1.925.000	0,1806339942	0,0059633113	0,0029816557	1.372.250	54,94				
	2	599500	1.952.500	0,1709339517			1.353.000	55,57				
	3	584375	1.815.000	0,1640616671			1.230.625	59,59				
	4	578875	1.870.000	0,1697522708			1.291.125	57,60				
	5	583000	1.897.500	0,1708377433			1.314.500	56,83				
	Promedio	579700	1892000	0,1712392772			1.312.300	56,90	1,83	3,21	0,913284683	
Lodo 35%	1	588.500	3.052.500	0,2383030685	0,0026209009	0,0013104505	2.464.000	19,08				
	2	589.875	3.135.000	0,2418258516			2.545.125	16,42				
	3	577.500	3.135.000	0,2448951855			2.557.500	16,01				
	4	574.750	3.080.000	0,2430239122			2.505.250	17,73				
	5	589.875	3.190.000	0,2443435642			2.600.125	14,61				
	Promedio	584.100	3.118.500	0,2424861807			2.534.400	16,77	1,70	10,16	0,852189975	
Lodo 40%	1	576.125	2.612.500	0,2188465260	0,0023680372	0,0011840186	2.036.375	33,13				
	2	584.375	2.640.000	0,2183040996			2.055.625	32,49				
	3	576.125	2.695.000	0,2233473495			2.118.875	30,42				
	4	588.500	2.640.000	0,2172858199			2.051.500	32,63				
	5	602.250	2.722.500	0,2183970266			2.120.250	30,37				
	Promedio	585.475	2.662.000	0,2192332320			2.076.525	31,81	1,31	4,12	0,655795955	
Lodo 45%	1	574.750	1.760.000	0,1620112293	0,0045891872	0,0022945936	1.185.250	61,08				
	2	595.375	1.925.000	0,1698800464			1.329.625	56,34				
	3	574.750	1.870.000	0,1707875422			1.295.250	57,46				
	4	588.500	1.787.500	0,1608331944			1.199.000	60,62				
	5	585.750	1.815.000	0,1637214440			1.229.250	59,63				
	Promedio	583.825	1.831.500	0,1655080783			1.247.675	59,03	2,05	3,47	1,024926286	
Lodo 50%	1	583.000	1.182.500	0,1023775316	0,0053781680	0,0026890840	599.500	80,31				
	2	577.500	1.210.000	0,1070777939			632.500	79,23				
	3	581.625	1.237.500	0,1093007140			655.875	78,46				
	4	574.750	1.265.000	0,1142038485			690.250	77,33				
	5	594.000	1.320.000	0,1155958287			726.000	76,16				
	Promedio	582.175	1.243.000	0,1098058589			660.825	78,30	1,62	2,07	0,808638071	
Lodo 60%	1	566.500	514.250	-0,0140085379	0,0046992710	0,0023496355	-52.250	101,72				
	2	592.625	508.750	-0,0220918487			-83.875	102,75				
	3	572.000	523.875	-0,0127227850			-48.125	101,58				
	4	584.375	514.250	-0,0185057759			-70.125	102,30				
	5	574.750	534.875	-0,0104088935			-39.875	101,31				
	Promedio	578.050	519.200	-0,0155435739			-58.850	101,93	0,59	0,57	0,292811214	

Anexo 35. Clasificación de la toxicidad de los lodos de perforación.

CATEGORÍA	CONCENTRACIÓN CL₅₀(mg.L⁻¹)
No tóxico	<100.000
Casi no tóxico	10.000-100.000
Ligeramente tóxico	1.000-10.000
Moderadamente tóxico	100-1.000
Tóxico	1-100
Muy tóxico	<1

Fuente:DOIR. Petroleum Guidelines.Drilling Fluids Managements.Australia, Department of Industry and Resources.EnvironmentDivision.Government of Western Australia. 2006.