

“XII Congreso Latinoamericano de Perforación”.

Evaluación de la toxicidad de aditivos utilizados en la perforación de pozos, empleando especies dulceacuícolas.

Guillermo Muñoz-Mejía, Nadia Livia Ortiz-Cornejo y Alicia Mejía-Domínguez¹.

RESUMEN

En México, la evaluación de toxicidad de lodos de perforación o sus componentes, cuando se lleva a cabo, se realiza principalmente con especies de ambientes marinos. Poca o nula atención se ha dirigido a las especies de ambientes dulceacuícolas, susceptibles también de ser afectadas sobre todo porque, de acuerdo con el programa emergente de gas de PEP, en breve se realizarán actividades de exploración y producción en la Cuenca de Macuspana (Región Sur) entre otras, realizando la mayor parte de la perforación en zonas lacustres, en donde la diversidad de organismos dulceacuícolas, se pondría en riesgo por posibles derrames de componentes de perforación. En este trabajo, se realizaron pruebas de toxicidad aguda (CL₅₀-48 horas) con cuatro aditivos utilizados como inhibidores de hidratación de arcillas, empleando 4 especies de pulgas de agua (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia* y *Simocephalus vetulus*) para evaluar cada aditivo. Los resultados indican que a concentraciones que van de 10 a 6600 veces por debajo de las usadas en la formulación de sistemas de perforación en las que se incluyen los aditivos probados, se registró toxicidad con las cuatro especies seleccionadas. Se señala cuál fue la especie más sensible y cuál aditivo, mencionando sus componentes principales, fue el más tóxico. Se presentan los métodos de cultivo y de prueba usados con cada especie, así como los resultados de sensibilidad y replicabilidad, utilizando un tóxico de referencia de uso internacional.

Se recomienda también, un análisis de toxicidad en cada componente del fluido de perforación así como en todo el sistema, antes de su uso en los pozos ya que posibles efectos sinérgicos o antagónicos pueden presentarse en su interrelación con los organismos de prueba, y por ende, constituir un factor de riesgo ecológico en las zonas lacustres en donde se pretendan realizar actividades de exploración de hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN.

En la Industria Petrolera, la fase exploratoria constituye la etapa en la que más se pone en riesgo el delicado equilibrio ecológico en el que se encuentran los ecosistemas terrestres y acuáticos. Desde el punto de vista técnico, de salud, seguridad y medio ambiente, los fluidos de perforación y los aditivos que los componen, deben ser eficientes en la perforación, seguros en su manejo, rápidamente biodegradables y de baja o nula toxicidad. La industria petrolera ha tenido el propósito durante mucho tiempo de desarrollar fluidos base agua que encuentren los criterios señalados anteriormente con el fin de alcanzar sustentabilidad en sus operaciones.

En lo que a aditivos de perforación se refiere, su utilidad para las operaciones de exploración es alta ya que previenen el hinchamiento de las arcillas propiciando con ello, estabilidad a la pared del pozo, aseguran la integridad de los recortes y reducen la tendencia de la barrena al embolamiento. También minimizan la presencia de problemas tales como los causados por la excesiva dilución que impide

¹ Laboratorio de Ecotoxicología Acuática, Departamento de Perforación, Reparación y Mantenimiento a Pozos. INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO.- Eje Central Lázaro Cárdenas No. 152, Col. San Bartolo Atepehuacán, 07730 México, D. F. MEXICO. e-mail: gmunoz@imp.mx

controlar debidamente los recortes, el aumento de torsión y arrastre de la sarta, las altas presiones de succión y de rompimiento de circulación y el embolamiento del conjunto de fondo.

Día con día los aditivos se formulan con mayor complejidad química para promover una eficiencia elevada en la inhibición de hidratación de arcillas. En el caso de un manejo inadecuado de los residuos generados durante la perforación (recortes) y por consiguiente un derrame en suelos o en agua, los procesos microbianos encargados de degradarlos serían menos eficientes mientras más complejo sea el sustrato a degradar. Asimismo, los efectos inmediatos y a largo plazo sobre organismos terrestres y acuáticos, son desconocidos sobre todo en latitudes tropicales como las que se tienen en nuestro país ya que la evaluación de toxicidad de los lodos de perforación o sus componentes cuando se ha llevado a cabo, ha sido principalmente con especies marinas. Poca o nula atención esta dirigida a especies de ambientes dulceacuícolas.

Por lo antes mencionado y tomando en cuenta que Pemex Exploración y Producción pretende realizar importantes operaciones de perforación en diferentes cuencas gasíferas de la plataforma continental del territorio nacional, las cuales en la mayoría de los casos se ubican en zonas de alta precipitación y por consiguiente con recursos hídricos como lagunas, lagos, ríos, bordos, pantanos, etc. susceptibles de ser afectados, en este trabajo se evaluó la toxicidad aguda de 4 inhibidores de hidratación de arcillas, utilizando cuatro especies de pulgas de agua. Tres de ellas (*Daphnia pulex*, *Simocephalus vetulus* y *Ceriodaphnia dubia*), se localizan en los cuerpos de aguas interiores de nuestro país (Muñoz-Mejía, 1997) y la cuarta (*Daphnia magna*), aún cuando no se encuentra en México, es empleada como especie de referencia toxicológica a nivel internacional (Environment Canada, 1990; Weber, 1993;), motivo que originó su utilización en este trabajo. Asimismo se determinó la sensibilidad de estas especies a cada inhibidor y a un tóxico de referencia de uso internacional.

Las pulgas de agua, taxonómicamente pertenecen al Orden Anomopoda (antes Cladocera). Son un grupo abundante y de gran importancia ecológica, ya que en los ecosistemas acuáticos actúan como el principal flujo de energía entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores. Son filtradores considerados como no selectivos. En condiciones naturales se alimentan de fitoplancton, bacterias, protozoarios y detritos finos. Estos organismos a su vez son depredados por varias especies carnívoras, tales como juveniles de peces y zooplanctófagos en general (Muñoz-Mejía, 1997). Este grupo, y principalmente las especies pertenecientes a la familia Daphnidae, en la cual se encuentran las 4 especies utilizadas en este trabajo, son de amplia distribución. Habitan las aguas dulces de latitudes norte y sur y se encuentran en gran variedad de cuerpos de agua: lagos, reservorios artificiales, ríos y zonas de inundación, represas, bordos, charcas temporales, y en cultivos de arroz. Estos crustáceos pueden encontrarse en diferentes épocas del año en planicies o zonas montañosas, en aguas limpias o con alto contenido de materia orgánica.

Además, las "pulgas de agua" tienen varios aspectos biológicos interesantes que las hacen ideales para los ensayos toxicológicos. A su corta vida (4 a 6 semanas) se suma una alta fecundidad. Una vez alcanzada su madurez, se reproducen aproximadamente cada 48 horas. Prácticamente todos los individuos que se utilizan son genéticamente idénticos. Esto se debe a que se reproducen por "partenogénesis" (parthenos = virgen), es decir que los huevos se desarrollan en embriones sin previa fecundación (Paggi, J.C. *et al.* 1999).

MATERIALES Y METODOS.

Los organismos fueron cultivados en el laboratorio de toxicología acuática del Departamento de Perforación, Reparación y Mantenimiento a Pozos del Instituto Mexicano del Petróleo, de acuerdo a las condiciones señaladas en la Tabla 1.

Tabla 1.- Condiciones experimentales de los cultivos de *D. pulex*, *S. vetulus*, *C. dubia* y *D. magna*

FACTOR EVALUADO	CONDICIONES DE CULTIVO		
	<i>D. pulex</i> y <i>S. vetulus</i>	<i>C. dubia</i>	<i>D. magna</i>
Tipo de Prueba	Estática con renovación		
Recambio	Sí, cada tercer día		
Intensidad de Luz (Luxes)	600-1000		
Fotoperíodo (Luz:Oscuridad)	12:12		
Recipientes de cultivo	Vasos de precipitado de vidrio tipo Griffin	Tubos de ensaye de vidrio	Vasos de precipitado de vidrio tipo Griffin
Volumen de los recipientes (mL)	50	10	100
Volumen de agua reconstituida mas alimento (mL)	40	7.5	100
Edad de neonatos al iniciar la prueba	<24 horas (<i>D. pulex</i>) <12 horas (<i>S. vetulus</i>)	<12 horas	<12 horas
Agua de dilución	Dura reconstituida		
Temperatura de prueba	25 ± 0.2 °C		
Alimentación	Sí, cada tercer día ¹		

¹Las dietas y concentraciones se señalan en la Tabla 2.

El alimento de los organismos, se preparó partiendo de lotes monoespecíficos de algas clorofíceas, las cuales fueron cultivadas de acuerdo con Stein, (1973). En la Tabla 2 se señala el tipo de alga suministrada por especie, así como la concentración que se adicionó a cada recipiente de cultivo.

Tabla 2.- Tipo de alimento y concentración para cada especie.

ESPECIE DE PRUEBA	ALIMENTO SUMINISTRADO	DOSIS cel/mL
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>	1, 950, 000
<i>Daphnia pulex</i>	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	650, 000
<i>Simocephalus vetulus</i>	<i>Scenedesmus incrassatulus</i>	1, 950,000
<i>Daphnia magna</i>	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	400,000

Para la preparación de los cultivos algales el medio se esterilizó previamente en autoclave. Posteriormente se realizó la inoculación del medio en condiciones de esterilidad. Ya inoculado el medio, se utilizó aire comprimido como fuente de carbono y a la vez como fuente de agitación. El crecimiento algal se realizó a temperatura ambiente y con iluminación artificial continua con lámparas fluorescentes “luz de día” (aprox. 4,500 luxes). La cosecha se realizó dentro de un periodo de 9-12 días, durante la fase de crecimiento exponencial (Enserink *et al*, 1990, en Muñoz-Mejía, 1997). Una vez cosechado, se dejó sedimentar en la oscuridad a 4°C, para decantarse y obtener el concentrado el cual se virtió a otro matraz más pequeño puesto en refrigeración. Antes de ser utilizado, se obtuvo la densidad celular del concentrado empleando una cámara de Neubauer ó hematocitómetro (APHA, 1992).

Agua de cultivo de dáfnidos

El medio empleado en la totalidad de los cultivos, y en las pruebas de toxicidad fue agua reconstituida con dureza conocida (160-180 mg L⁻¹ de CaCO₃) preparada de acuerdo con Weber, (1993) y con la adición de 0.1 ml por litro de selenito de sodio para evitar el desprendimiento de las antenas (Winner, 1984). El agua reconstituida al término de su elaboración y antes de ser utilizada, se sometió a una prueba de calidad, para determinar su aptitud como medio de cultivo y de prueba para las pulgas de agua. La calidad del agua reconstituida antes de ser utilizada en cultivos y pruebas de toxicidad, se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Calidad final del agua dura reconstituida

Oxígeno disuelto. (mg L ⁻¹)	Dureza (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	Alcalinidad (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	pH
5 – 7	160 - 180	110 - 120	7.6 - 8.0

Pruebas de toxicidad aguda.

Se realizaron 5 pruebas de toxicidad aguda (CL₅₀ -48horas) a diferentes tiempos (repeticiones) con cada uno de los cuatro aditivos de perforación. La clave asignada a cada aditivo así como el tipo de aditivo, se señala en la tabla 4.

Tabla 4.- Relación de claves usadas en los Inhibidores de hidratación seleccionados.

Clave usada en el inhibidor de hidratación	TIPO
A	Amina modificada
B	Glicol polialquénico
C	Polímero Anfotérico
D	Poliol

Con el fin de probar la sensibilidad de las especies de prueba y la replicabilidad de las pruebas de toxicidad, se empleó el Dodecil Sulfato de Sodio (Sigma 95% de pureza) como tóxico de referencia.

Las condiciones en las que se realizaron las pruebas de toxicidad con los aditivos de perforación (inhibidores de hidratación de arcillas) y el tóxico de referencia Dodecill Sulfato de Sodio (DSS) se presentan en la tabla 5.

Tabla 5.- Condiciones de las prueba de toxicidad aguda para evaluar aditivos de perforación y tóxico de referencia con *D. magna*, *D. pulex*, *C. dubia* y *S. vetulus*.

VARIABLE	CONDICIONES
Tipo de prueba	Estática sin renovación
Duración (hrs.)	48 horas
Intensidad de Luz (luxes)	600-1000
pH (Unidades de pH)	7.6-8.0
Oxígeno disuelto (mg/L)	2.0-5.0
Temperatura (°C)	25 ± 0.5
Fotoperiodo (Luz:Oscuridad)	12:12
Volumen de recipientes (mL)	100 mL.- <i>D. magna</i> (vasos de precipitado) 50 mL.- <i>D. pulex</i> y <i>S. vetulus</i> (vasos de precipitado) 10 mL.- <i>C. dubia</i> (tubos de ensayo)
Volumen de Prueba (mL)	80 mL <i>D. magna</i> 40 mL <i>D. pulex</i> y <i>S. vetulus</i> 7.5 mL <i>C. dubia</i>
Edad	12-24 horas.- <i>D. magna</i> , <i>D. pulex</i> y <i>C. dubia</i> 6-12 horas.- <i>S. vetulus</i>
Número de réplicas por ensayo	Dos
Número de concentraciones por ensayo	De 5 a 7 más el control.
Organismos por réplica	Diez
Agua de dilución	Dura Reconstituída
Alimento	No
Respuesta evaluada	Mortalidad después de 48 horas de exposición
Criterio de aceptación de la prueba	Sobrevivencia mayor o igual al 90% en controles.

Lavado de Material

El material empleado en el mantenimiento de los cultivos y en las pruebas de toxicidad debe ser sometido a un proceso de limpieza muy estricto, ya que cualquier residuo, puede interferir en la respuesta que se esté buscando con el aditivo a evaluar.

El proceso de limpieza del material consistió en sumergirlo en una solución al 30% de ácido nítrico durante 2 horas. Después se enjuagó abundantemente con agua de la llave y enseguida con Acetona G. A continuación se dejó evaporar entre 1-2 horas. Finalmente se enjuagó con agua destilada. Antes de ser utilizado, el material se enjuagó nuevamente con agua destilada y posteriormente con agua reconstituida.

Análisis Estadístico

Para determinar el valor de la CL₅₀ en cada prueba, se utilizó el Método Probit (Stephan, 1977); sin embargo, cuando el valor estimado registró una baja certidumbre, se empleó el método Binomial como

alternos. Ambos métodos se calcularon mediante el software **LC₅₀** (Stephan *op. cit.*). Se calcularon los valores promedio de cada serie de datos (réplicas), desviación estándar, intervalos de confianza (P=0.05) de cada serie y coeficiente de variación (CV%) (Daniel, 1995), este último cálculo, con el fin de determinar la variabilidad resultante en los grupos de repeticiones realizadas con cada inhibidor.

Para determinar diferencias significativas (P<0.05) o bien, el gradiente de toxicidad de cada aditivo con cada especie, se realizó un análisis de varianza unifactorial. Enseguida, y con el fin de utilizar la aproximación gráfica de Gabriel (1977, citado en Sokal y Rohlf, 1981), se empleó una prueba de comparación múltiple entre medias, utilizando el Método T (Sokal y Rohlf, *op. cit.*). Lo anterior, como se mencionó, para determinar de manera gráfica, el gradiente de toxicidad que resulta por especie para los cuatro aditivos evaluados. Por último y con el fin de determinar diferencias significativas (P<0.05) entre aditivos y especies, se realizó un análisis de varianza bifactorial y se utilizó también la aproximación gráfica de Gabriel (*Op. cit.*) ya referida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Daphnia magna.

Con esta especie se realizaron un total de 23 bioensayos; tres de ellos se efectuaron con DSS y 5 con cada inhibidor de hidratación. Los resultados de las pruebas se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6.- Valores de CL₅₀ obtenidos en las pruebas de *Daphnia magna* con cada inhibidor de hidratación y con DSS.

Repetición	CL ₅₀ del INHIBIDOR(%)				CL ₅₀ de DSS (mg/L)
	A	B	C	D	
R1	0.04254	0.35	0.3076	0.01481	11.03
R2	0.05176	0.4082	0.1999	0.01231	8.31
R3	0.05663	0.3171	0.2639	0.01259	9.41
R4	0.0314	0.1495	0.2686	0.01341	
R5	0.04634	0.2193	0.2567	0.01242	
Promedio	0.04573	0.28882	0.25934	0.013108	9.583
Desv. Std.	0.00963	0.10372	0.04459	0.001044	1.368
I. C. (95%)	0.00943	0.10165	0.04370	0.001023	1.548
C. V. (%)	21.0599	35.9141	17.1967	7.9707	14.277

El promedio de CL₅₀ que resultó de los 3 ensayos con el tóxico de referencia DSS fue de 9.58 ± 1.36 mg/L (P=95%) con un coeficiente de variación de 14.27%, el cual nos indica que existe poca variabilidad en la respuesta de la especie al tóxico de referencia utilizado, como lo señalan varios autores (Berglund y Dave, 1984; Rue, *et al*, 1988; Stephenson *et al*, 1991; De Graeve, *et al*, 1992; Willis *et al*, 1995; Muñoz-Mejía, 1997). En los trabajos referidos se considera como adecuado o bien, como una respuesta constante (que se traduce en reproducibilidad en las pruebas) del organismo al tóxico evaluado, un coeficiente de variación de hasta el 40%. De acuerdo con este criterio, se puede decir que todas las evaluaciones de los aditivos **A** al **D**, realizadas con esta especie, cumplen con la reproducibilidad recomendada ya que el rango de C. V. se encuentra entre 7.97% (aditivo **D**) y 35.91% (aditivo **B**) como se puede ver en la Tabla 6. Si a esto se le adiciona que la respuesta de la especie al tóxico de referencia

DSS también estuvo por debajo de 40% se ratifica el porqué *Daphnia magna* es usada como especie de referencia toxicológica a nivel internacional (Weber, 1993; Environment Canada, 1990).

Los resultados de CL_{50} para cada uno de los cuatro inhibidores de hidratación utilizando como especie de prueba a *Daphnia magna* se presentan en la Fig. 1. El análisis estadístico demuestra que los inhibidores **A** y **D** tienen en mismo efecto tóxico hacia *D. magna*; es decir, debido a que los intervalos de comparación de **A** y **D** se sobreponen, aun cuando los valores promedio son diferentes, estadísticamente no existen diferencias significativas entre ambos aditivos. La misma situación se aprecia entre los aditivos **B** y **C** ya que también los intervalos de comparación se traslapan o sobreponen. Caso contrario es observado cuando se compara el aditivo **A** con el **B** ya que, al no traslaparse los intervalos de comparación, existen diferencias significativas ($P=4.5343E-07$) que se traducen en que el inhibidor **A** es más tóxico que el **B**, debido a que una menor cantidad de muestra (0.04573%, valor promedio) ocasiona la mortalidad del 50% de los organismos expuestos, mientras que, para que se presente el mismo porcentaje de mortalidad en la muestra **B**, se requiere de 0.2888% (valor promedio) de muestra, lo cual, correspondería aproximadamente a 6.3 veces más muestra que en el caso del inhibidor **A**. Resumiendo se puede afirmar que los aditivos **A** y **D** son más tóxicos que el **B** y el **C**; el gradiente de toxicidad para *D. magna* quedaría entonces, de la siguiente manera:

A y D > B y C

A = D

B = C

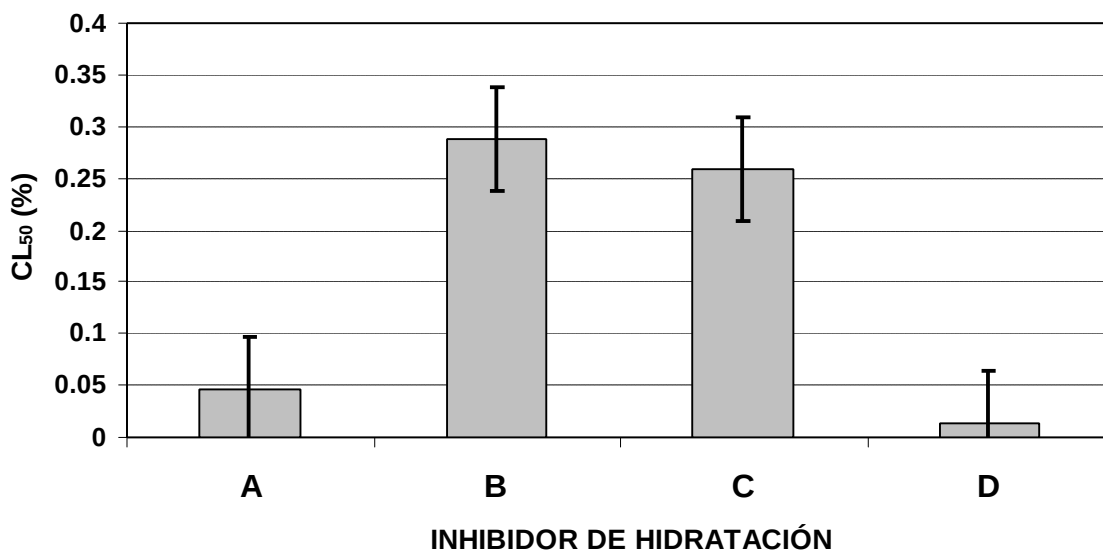


Fig. 1.- Valores promedio de CL_{50} (%) e intervalos de comparación ($P=0.05$) en inhibidores de hidratación de arcillas probados con *D. magna*

***Simocephalus vetulus*.**

Con esta especie se realizaron un total de 23 bioensayos de toxicidad con neonatos menores a 12 horas de edad. De las 23 pruebas, 3 se efectuaron con DSS y 5 con cada uno de los 4 inhibidores de hidratación, como se observa en la tabla siguiente.

Tabla 7.- Valores de CL₅₀ obtenidos en las pruebas de *Simocephalus vetulus* con cada inhibidor de hidratación y con DSS.

Repetición	CL ₅₀ del INHIBIDOR(%)				CL ₅₀ de DSS (mg/L)
	A	B	C	D	
R1	0.0033	0.0277	0.00367	0.000499	4.11
R2	0.0029	0.0309	0.00261	0.000649	3.6
R3	0.0038	0.0276	0.00325	0.000744	2.85
R4	0.0035	0.0369	0.00218	0.000595	
R5	0.0032	0.0344	0.0054	0.000536	
Promedio	0.00336	0.0315	0.00342	0.000605	3.52
Desv. Std.	0.0003381	0.004119	0.001245	0.0000966	0.6337
I. C. (95%)	0.0003313	0.00403	0.001220	0.0000947	0.7171
C. V. (%)	10.0568	13.0638	36.398	15.977	18.005

El promedio de CL₅₀ que resultó de los 3 ensayos con el tóxico de referencia DSS fue de 3.52 ± 0.7171 mg/L (P=95%) con un coeficiente de variación de 18.00%, el cual indica que existe muy poca variabilidad en la respuesta de la especie al tóxico de referencia utilizado. En cuanto al C.V. obtenido para cada inhibidor, este resultó por debajo del 40% ya señalado y el rango fue de 13.06% (inhibidor **B**) hasta 36.39% en el inhibidor **C** (Tabla 7). Lo anterior indica que la respuesta de la especie es considerada como constante por lo cual, es factible su utilización en ensayos de toxicidad y en este preciso estudio, como especie para caracterizar toxicológicamente inhibidores de hidratación de arcillas. Además, debido a que se distribuye en la zona litoral de los cuerpos de agua dulce (Muñoz-Mejía, 1997), el riesgo al que se encuentra expuesta es mayor que el de otras especies si se presenta un derrame de aditivos o de recorte impregnado con éstos ya que el acarreo de contaminantes podría ser desde la zona litoral, hasta la zona limnética de los cuerpos de agua dulce.

Los resultados de CL₅₀ para cada uno de los cuatro inhibidores de hidratación utilizando como especie de prueba a *Simocephalus vetulus* se presentan en la Fig. 2. En este caso se puede apreciar que los inhibidores de hidratación **A**, **C** y **D** no difieren significativamente entre sí ya que sus intervalos de comparación se traslapan mientras que, al comparar los tres aditivos mencionados con el **B**, existen diferencias significativas ($P=2.4231E-13$) ya que sus intervalos de comparación no se traslapan. Lo cual indica que **A**, **C** y **D** son más tóxicos a *S. vetulus* que el aditivo **B**.

Si se compara el valor de CL₅₀ promedio de **B** con el obtenido en **A**, **C** y **D**, se tiene que los tres últimos son 9.3, 9.2 y 52 veces, respectivamente, más tóxicos que el **B**. El gradiente de toxicidad que resultó en este caso fue de:

A, C y D > B

A=C

A=D

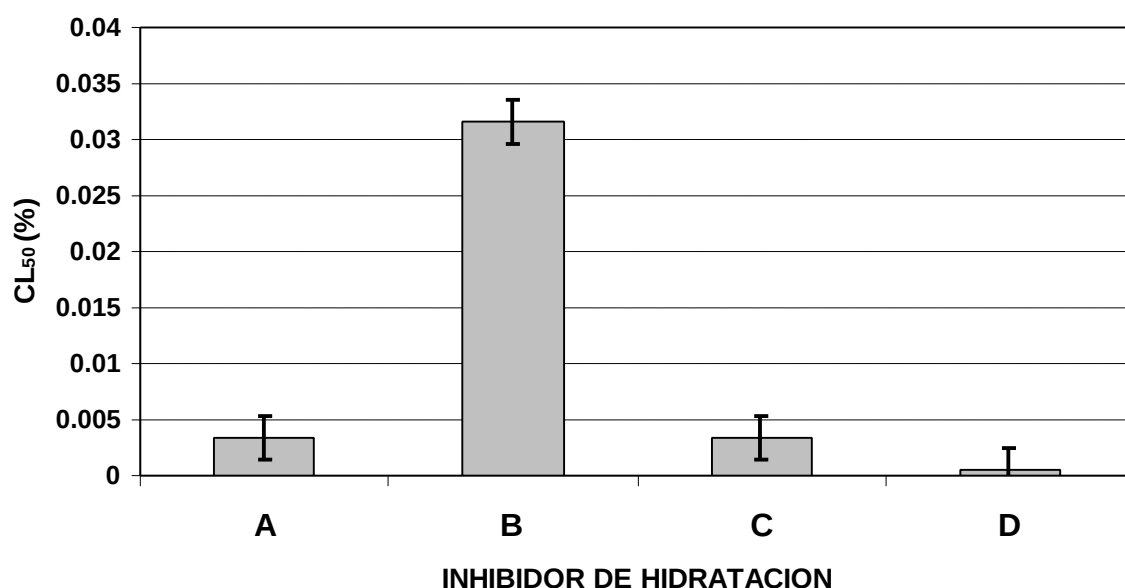


Fig. 2.- Valores promedio de CL₅₀ (%) e intervalos de comparación (P=0.05) en inhibidores de hidratación de arcillas probados con *S. vetulus*.

Daphnia pulex

Se realizaron un total 24 bioensayos de toxicidad con neonatos de *D. pulex* menores a 24 horas de edad; 4 de estos bioensayos se efectuaron con DSS y 5 con cada uno de los cuatro inhibidores de hidratación probados. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de CL₅₀ obtenidos en las pruebas de *Daphnia pulex* con cada inhibidor de hidratación y con DSS.

Repetición	CL ₅₀ del INHIBIDOR(%)				CL ₅₀ de DSS (mg/L)
	A	B	C	D	
R1	0.0359	0.0783*	0.0661	0.00275	5.04
R2	0.0485	0.0728*	0.1214*	0.00248	4.31
R3	0.0449*	0.0236*	0.130*	0.00257	4.77
R4	0.0401	0.0392	0.1234*	0.00344	4.32
R5	0.0428*	0.0805*	0.0833	0.00254	
Promedio	0.0424	0.0588	0.10484	0.00276	4.61
Desv. Std.	0.00477	0.02583	0.02835	0.000395	0.35805
I. C. (95%)	0.00468	0.02532	0.02778	0.0003876	0.4051
C. V. (%)	11.246	43.881	27.047	14.329	7.766

*La CL₅₀ se calculó empleando el Método Binomial.

El promedio de CL₅₀ que resultó de los 4 ensayos efectuados con el tóxico de referencia (DSS) fue de 4.61 ± 0.4051 mg/L (P=95%) con un coeficiente de variación de 7.76%, el cual fue el más bajo que se obtuvo con las cuatro especies probadas. Lo anterior, indica que existe muy poca variabilidad en la respuesta de *Daphnia pulex* al tóxico de referencia utilizado. En cuanto a los C. V. obtenidos en cada inhibidor, todos a excepción del **B**, reflejaron respuestas constantes de acuerdo al criterio ya señalado. El inhibidor **B** cuyo valor de 43.88% apenas sale del criterio mencionado, pudiera indicar una baja estabilidad en solución de compuesto, sin embargo, es necesario en este caso, realizar mas

evaluaciones que confirmen este supuesto. De cualquier modo, y al igual que para *S. vetulus*, *D. pulex* podría ser considerada como candidato a la caracterización toxicológica de inhibidores de hidratación de arcillas debido a la alta reproducibilidad que manifestó en cuatro de los cinco compuestos evaluados (incluido el tóxico de referencia DSS).

En la Fig. 3 se representan los resultados del análisis comparativo realizado entre los diferentes inhibidores de hidratación con *D. pulex*. Se aprecia que el inhibidor **D**, al no traslapar su intervalo de comparación con los de los otros tres inhibidores, presentó diferencias significativas ($P=3.77E-06$) y por ende, fue el más tóxico ya que solo se requirió de 0.00276% de este, para ocasionar la mortalidad en el 50% de los organismos expuestos. Una situación opuesta se dio con el inhibidor **C**, ya que fue el menos tóxico de los cuatro. El gradiente de toxicidad que resultó en este caso fue:

A, B y D > C

A y B > D

A=B

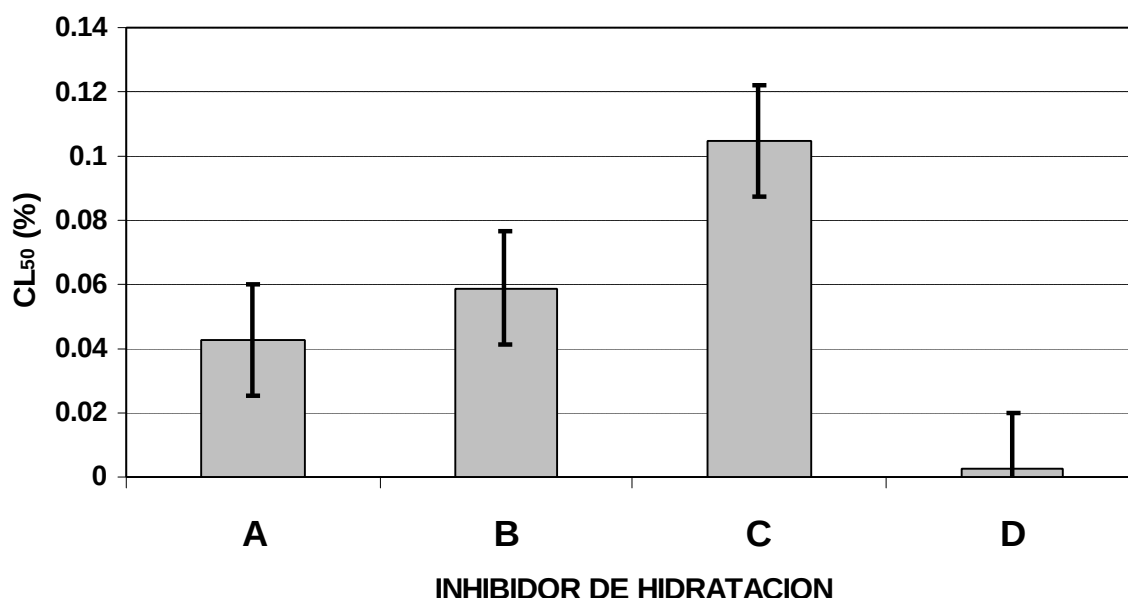


Fig. 3.- Valores promedio de CL₅₀ (%) e intervalos de comparación ($P=0.05$) en inhibidores de hidratación de arcillas probados con *D. pulex*.

Ceriodaphnia dubia

Se realizaron en total 23 bioensayos de toxicidad con neonatos de *C. dubia* cuya edad fue menor a 24 horas; 3 de estos se efectuaron con DSS y 5 con cada uno de los cuatro inhibidores de hidratación seleccionados. En la tabla 9 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 9. Valores de CL₅₀ obtenidos en las pruebas de *Ceriodaphnia dubia* con cada inhibidor de hidratación y con DSS.

Replica	CL ₅₀ del INHIBIDOR(%)				CL ₅₀ de DSS
	A	B	C	D	(mg/L)
R1	0.0436	0.0873	0.1366	0.00174	7.98
R2	0.0332	0.0880	0.0848	0.00211	6.58
R3	0.0342	0.1014	0.1041	0.00273	6.58
R4	0.0383	0.1054	0.1578	0.00108	
R5	0.0315	0.1069	0.1338	0.00164	
Promedio	0.0362	0.0978	0.1234	0.00186	7.046
Desv. Std.	0.004849	0.009484	0.02884	0.000610	0.8082
I. C. (95%)	0.004751	0.00929	0.02826	0.000598	0.9146
C. V. (%)	13.392	9.697	23.371	32.819	11.47

El valor promedio de CL₅₀ obtenido con DSS fue de 7.04 ± 0.914 (P=95%), con un C. V. de 11.47%, el cual también es muy bajo y denota una elevada reproducibilidad en las pruebas con el DSS. En lo que se refiere al mismo coeficiente, pero obtenido con los cuatro inhibidores, el rango estuvo entre 9.69% (para el inhibidor **B**) y 32.81% (inhibidor **D**). Lo cual también indica que *C. dubia* mantiene una respuesta constante a los inhibidores utilizados lo que finalmente se traduce en una elevada reproducibilidad en las pruebas realizadas con esta especie y por ende es susceptible de ser empleada como especie de referencia en caracterizaciones toxicológicas de inhibidores de hidratación de arcillas en nuestro país, ya que al igual que *D. magna* también se emplea en otras latitudes (Weber, 1993; Environment Canada, 1992).

En lo que concierne a la toxicidad entre inhibidores, en la Fig. 4 se aprecia que, de nueva cuenta, el inhibidor de hidratación de arcillas **D** resultó ser el más tóxico de los cuatro ya que se obtuvieron diferencias altamente significativas ($P=3.30E-09$), las cuales se corroboran con la ausencia de traslapamiento entre intervalos de comparación. La diferencia en toxicidad entre el aditivo **D** y el **C**, por ejemplo, sería de 66 veces, si se emplea la CL₅₀ promedio.

En el caso de los inhibidores **B** y **C** se puede apreciar también en la Fig.4, que sí hay traslape entre los intervalos de comparación lo cual indica que a pesar de que los valores promedio son diferentes, la respuesta del organismo es la misma con uno u otro aditivo. El aditivo **A** por su parte, registró una toxicidad intermedia. Finalmente, el gradiente de toxicidad de esta especie con los inhibidores probados fue:

D > A, B y C

A > B y C

B = C

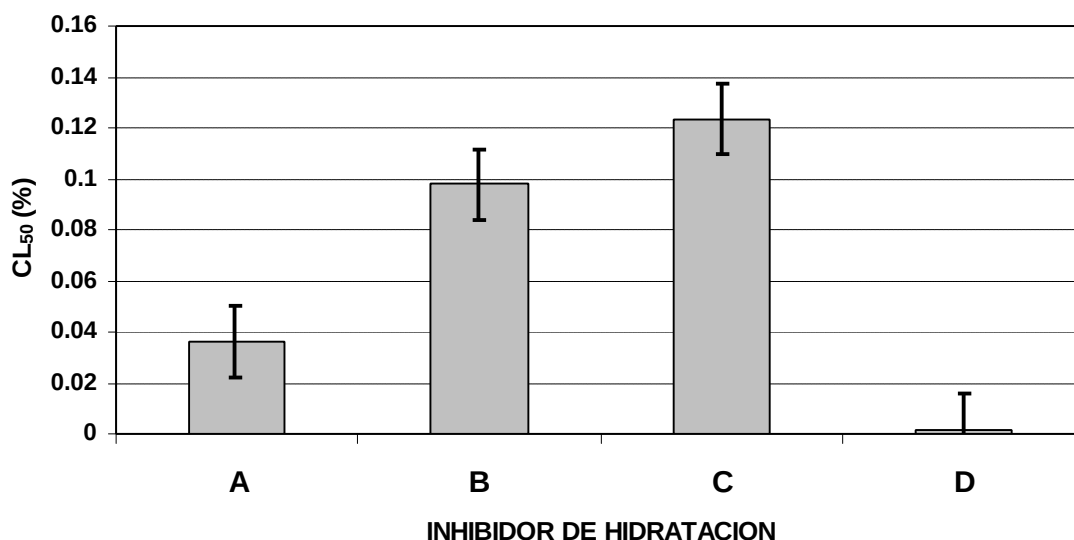


Fig. 4.- Valores promedio de CL₅₀ (%) e intervalos de comparación (P=0.05) en inhibidores de hidratación de arcillas probados con *C. dubia*.

Comparación entre especies y aditivos.

En la Fig. 5, se representa a todas las especies y a todos los inhibidores con el fin de determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las primeras y los segundos. En este gráfico, al igual que los ya señalados para cada especie, se pretende identificar diferencias en sensibilidad entre especies y diferencias en toxicidad de los aditivos a las cuatro especies, de ahí que el análisis estadístico utilizado haya sido una varianza bifactorial como ya se señaló en los métodos. De este modo, al comparar un inhibidor con las cuatro especies, se puede determinar cuál fue la más o menos sensible y cuál inhibidor fue el más tóxico para las cuatro especies utilizadas.

➤ Sensibilidad de los organismos de prueba hacia el inhibidor **A**:

En el caso de este inhibidor, se encontró que existen diferencias significativas ($P = 3.5798E-21$) solo entre *Simocephalus vetulus* y las tres especies restantes. Diferencias que indican que la especie más sensible fue precisamente *S. vetulus*, mientras que las otras tres reflejaron una sensibilidad similar entre sí. Lo antes mencionado se deriva de que el intervalo de comparación de *S. vetulus* no se traslapa con ninguno de los otros, mientras que en *D. magna*, *D. pulex* y *C. dubia* si se da el traslape de los intervalos de comparación con el inhibidor en cuestión. El gradiente de sensibilidad interespecífico (es decir, entre especies) para el inhibidor **A**, queda entonces de la siguiente manera:

S. vetulus > *D. magna*, *D. pulex* y *C. dubia*

D. magna = *D. pulex* = *C. dubia*

➤ Sensibilidad de los organismos de prueba hacia el inhibidor **B**:

Al comparar al inhibidor **B** con las cuatro especies de prueba, se encontraron diferencia significativas entre especies, lo que indicó que *S. vetulus* fue, de nueva cuenta, la especie más sensible ya que el valor

promedio de CL₅₀ fue de 0.03153%, mientras que la menos sensible fue *D. magna* con un valor promedio de 0.28882%, es decir, 8 veces menos que *S. vetulus*. En la figura 5 se puede apreciar, para el caso de este inhibidor, que en ninguna de las cuatro especies se traslapan los intervalos de comparación, lo cual indica que el gradiente de sensibilidad es el siguiente:

S. vetulus > *D. pulex* > *C. dubia* > *D. magna*

➤ Sensibilidad de los organismos de prueba hacia el inhibidor **C**:

En el caso de este inhibidor, las diferencias significativas que se registraron ($P=3.57985E-21$) indican que la especie más sensible fue *S. vetulus* con un valor de CL₅₀ promedio de 0.003422% mientras que la menos, resultó ser de nueva cuenta *D. magna* con un valor promedio de CL₅₀ igual a 0.25934%. El gradiente de sensibilidad de estas especies al inhibidor **C**, fue el siguiente:

S. vetulus > *D. pulex* y *C. dubia* > *D. magna*

D. pulex = *C. dubia*

➤ Sensibilidad de los organismos de prueba hacia el inhibidor **D**:

Con este inhibidor no se presentan diferencias significativas entre especies ya que, como se aprecia en la Fig. 5, los intervalos de comparación de las cuatro especies, se traslapan entre sí. Lo cual indica que todas las especies reflejaron la misma sensibilidad al aditivo referido. Por ello el gradiente de sensibilidad queda de la siguiente manera:

D. magna = *S. vetulus* = *D. pulex* = *C. dubia*

Por otra parte no se identifica, estadísticamente, que un aditivo sea más o menos tóxico hacia las cuatro especies utilizadas sin embargo, en términos generales, el aditivo **D** podría considerarse como el de mayor toxicidad promedio, ya que se tuvieron los valores más bajos de CL₅₀ en este, comparado con los tres restantes. En cuanto a *Simocephalus vetulus*, esta especie resultó ser la más sensible ya que en tres de los cuatro inhibidores utilizados, se tuvieron los valores más bajos de CL₅₀. *Daphnia magna* por su parte, reflejó la menor sensibilidad ya que en dos de los cuatro inhibidores, se tuvieron los valores más altos de CL₅₀ como se puede apreciar en la Fig. 5. En el caso de *D. pulex* y *C. dubia*, la sensibilidad resultante estuvo entre *S. vetulus* y *D. magna*.

En este trabajo se ha hecho hincapié, en la utilidad que tienen los organismos acuáticos para ser utilizados como especies de referencia toxicológica para evaluar aditivos de perforación. De hecho, nuestros resultados indican que las tres especies que se distribuyen en nuestro país (*S. vetulus*, *D. pulex* y *C. dubia*), son susceptibles de ser empleadas con este fin; sin embargo lo anterior aunque importante, no es lo más relevante.

De acuerdo con Stamatakis *et al*, (1995), las concentraciones de los inhibidores de hidratación que se recomienda sean agregadas a un lodo de perforación, van del 3 al 4%, es decir de 3 a 4 mL por cada 100 mL de lodo. Si en nuestros resultados se tiene que el valor de CL₅₀ mas alto (es decir, la cantidad de inhibidor que ocasionó la mortalidad del 50% de la población expuesta) fue de 0.2888% (con *Daphnia magna* empleando el aditivo **B**), entonces las concentraciones que se emplean de los aditivos son entre 10.3 y 13.8 veces más tóxicas para *D. magna* (especie que como ya se ha mencionado, no se distribuye en las aguas interiores mexicanas y que su uso en este trabajo, fue con fines netamente comparativos). Ahora bien, si por el contrario, se compara el valor de CL₅₀ más bajo, (es decir, el que ejerció el mayor efecto tóxico), el cual fue de 0.000605% (obtenido con *S. vetulus* empleando el aditivo **D**), las concentraciones que se emplean de este aditivo en la formulación de lodos son entre 4958.6 y 6611.5 veces más tóxicas para *S. vetulus*. En el supuesto caso de que se tuviera un derrame accidental o fortuito de aditivos o de recortes de perforación impregnados con aditivos, el riesgo en el que se pondría a los ecosistemas acuáticos sería realmente alto. Esto, desde el punto de vista de los autores, es lo más relevante, es decir, es la principal utilidad de los ensayos toxicológicos, ya que funcionan como una herramienta para evaluar el riesgo que tienen las operaciones de exploración en el ambiente. Por ello, se recomienda que el manejo de los aditivos usados en la perforación de pozos y en general de todos los materiales peligrosos, se haga siempre, con estricto apego a las medidas de seguridad y protección ambiental para evitar impactos que le impidan alcanzar la sustentabilidad a las operaciones de exploración y producción que realiza Pemex.

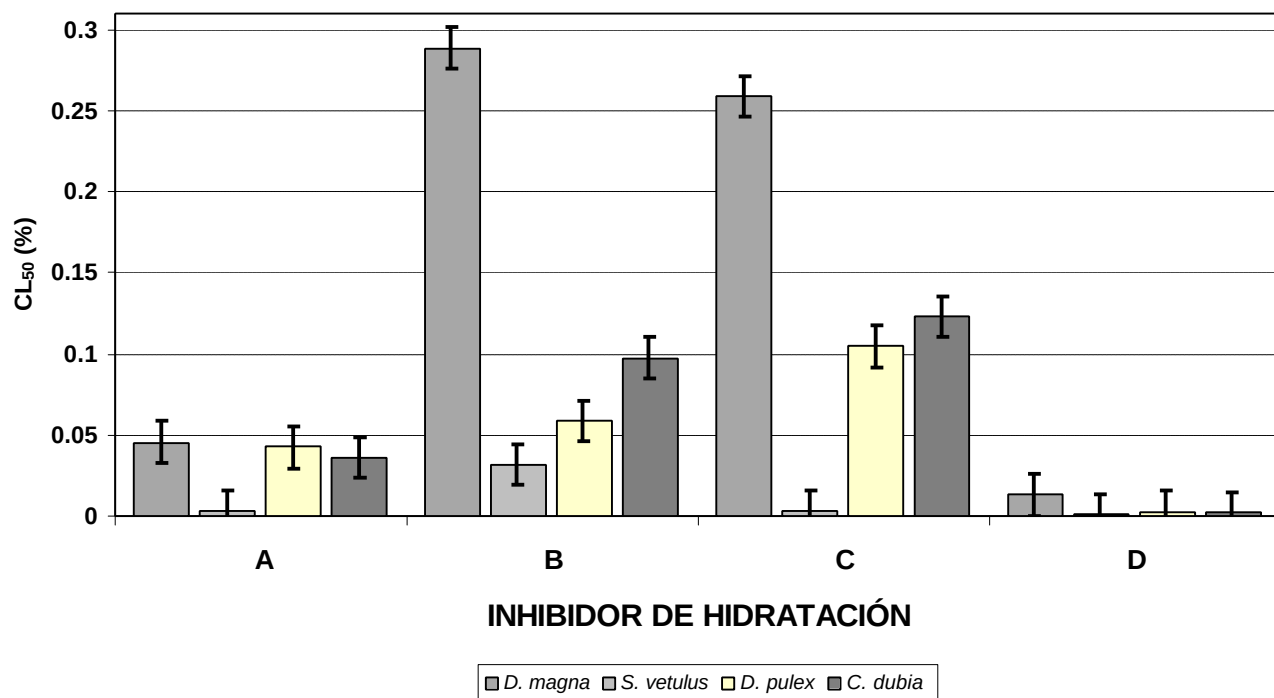


Fig. 5.- Valores promedio de CL₅₀ (%) e intervalos de comparación múltiple (P=0.05) para inhibidores de hidratación de arcillas probados con *D. magna*, *S. vetulus*, *D. pulex* y *C. dubia*

CONCLUSIONES

- En este trabajo se encontró que las cuatro especies seleccionadas, mostraron alta reproducibilidad en las pruebas tanto con los inhibidores de hidratación de arcillas como con el tóxico de referencia Dodecil Sulfato de Sodio (DSS). Por ello, se recomienda ampliamente su uso como especies de referencia toxicológica.
- La especie que mostró mayor sensibilidad a los aditivos probados fue *Simocephalus vetulus*, mientras que la más resistente o menos sensible fue *Daphnia magna*.
- En términos generales, el inhibidor de hidratación de arcillas que resultó ser el más tóxico para las cuatro especies fue el **D**, el cual correspondió al tipo POLIOL.
- Los inhibidores menos tóxicos, también en términos generales, fueron dos: el **B** y el **C**, los cuales corresponden a los tipos de GLICOL POLIALQUENÍLICO y POLÍMERO ANFOTÉRICO, respectivamente.
- Dado que la cantidad empleada de los inhibidores de hidratación en la formulación de los lodos de perforación se encuentra aproximadamente entre 3 y 4%, los valores de toxicidad obtenidos están muy por debajo de dichas concentraciones (de 10 a 6800 veces, dependiendo del inhibidor y la especie de prueba) lo cual indica que son muy tóxicos; por lo tanto, su posible derrame accidental o fortuito en los cuerpos de agua, representa un alto riesgo para las poblaciones acuáticas y por ende, atentaría contra el equilibrio ecológico de los cuerpos de agua dulce.

BIBLIOGRAFÍA.

- Muñoz-Mejía; G. ; 1997. Cultivo Experimental de tres especies de Cladóceros de la familia Daphnidae y evaluación de su utilidad como organismos de prueba en estudios toxicológicos. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Environment Canada, 1990. Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to *Daphnia magna*. Reference Method EPS 1/RM/14, Ottawa, Ontario, 18 p.
- Weber, C. I., 1993. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. EPA/600/4-90/027F. Cincinnati, Ohio USA. 273 p.
- .Paggi, J.C; Paggi S. J. de. 1999. Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Instituto Nacional de Limnología (INALI)-Santo Tomé (Santa. Fe).
- Stein, J. R., 1973. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, London, pp. 7-24.
- APHA. 1992. *Métodos normalizados para aguas potables y residuales*. Ediciones Díaz de los Santos. Madrid, España. 915 pp.
- Winner, R. W., 1984. Selenium Effects on Antennal Integrity and Chronic Copper Toxicity in *Daphnia pulex* (de Greer). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **33**:605-611.
- Stephan, C.E., 1977. Methods for calculating an LC₅₀. *In*: F. L. Mayer y J. L. Hamelink (Eds.), *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, ASTM STP 534. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, U. S. A. pp. 65-84.

- Daniel, W. W., 1995. *Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud*. Limusa. Mexico, D. F. 878 p.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf, 1981. *Biometry*. W. H. Freeman and Co., San Francisco, U.S.A., xviii+859 pp.
- Berglind, R. y G. Dave, 1984. Acute toxicity of chromate, DDT, PCP, TPBS and zinc to *Daphnia magna* cultured in hard and soft water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **33**:63-68.
- Rue, W. J., A. Fava y D. R. Grothe, 1988. A review of inter and intralaboratory effluent toxicity test method variability. *In*: W.J. Adams, G., A. Chapman y W. G. Landis (Eds.), *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10th Volume*, ASTM STP 971, Philadelphia, U.S.A. pp. 190-203.
- Stephenson, G. L., N. K. Kaushik y K. R. Solomon, 1991. Acute Toxicity of Pure Pentachlorophenol and a Technical Formulation to Three Species of *Daphnia*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**:73-80.
- DeGraeve, G. M., J. D. Cooney y B. H. Marsh, 1992. Variability in the Performance of the 7-d *Ceriodaphnia dubia* Survival and Reproduction Test: An Intra-and Interlaboratory Study. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**:851-866
- Willis, K. J., N. Ling y M. A. Chapman, 1995. Effects of temperature and chemical formulation on the acute toxicity of pentachlorophenol to *Simocephalus vetulus* (Schoedler, 1858) (Crustacea: Cladocera). *New Zealand J. of Marine and Freshwater Research.* **29**:289-294.
- Environment Canada, 1992. Biological Test Method: Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Report EPS 1/RM/21, Ottawa, Ontario, 72 p.
- Canton, J. H. y D. M. M. Adema, 1978. Reproducibility of Short-term and Reproduction Toxicity Experiments with *Daphnia magna* and the Comparison of the Sensitivity of *Daphnia magna* with *Daphnia pulex* and *Daphnia cucullata* in short-term experiments. *Hydrobiologia.* **59**(2):135-140.
- Stamatakis, E., Thaemlitz, C. J., Coffin, G. y Reid, W. 1995 A new generation of shale inhibitors for water-based muds. *SPE/IADC 29406. SPE/IADC Drilling Conference*. Amsterdam, Holanda. Febrero 28-marzo 2, 1995. pp. 623-631.