

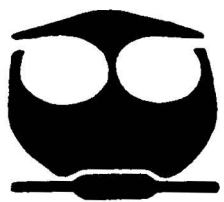
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA TOXICIDAD AGUDA EN SISTEMAS BASE AGUA Y RECORTES DE PERFORACION PROVENIENTES DE UN POZO PETROLERO EMPLEANDO Artemia franciscana.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MENDEZ VARGAS NADIA TERESA



MÉXICO, D. F.



JULIO DE 2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente **Dr. Rodolfo Torres Barrera**

Vocal **Dr. Francisco Hernández Luis**


Secretario **IQ. Cristina Avilés Alcántara**

1er. suplente **Prof. Liz Jannet Medina Reyes**

2do. suplente **Prof. Alonso Duran Moreno.**

El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Toxicidad del Instituto Mexicano del Petróleo.

Asesor del Tema:



IQ. Cristina Avilés Alcántara

Sustentante del tema:



Méndez Vargas Nadia Teresa

*A la Universidad Nacional Autónoma de México
Para comenzar a pagar con la presente
la enorme deuda que tengo con ella.*

Al Instituto Mexicano del Petróleo

Mis asesores:

I.Q. Cristina Avilés Alcántara

Biol. Julia Medina Jiménez.

Mannel

*Tania
Lenia
Y a mis
Papás
Por ser mi motivo original.*

Abuelo Chucho.

Mis primos:

Israel

Alberto

Marisol

Luz Elena

Mis tíos:

Vicki

Marce

Gloria

Salvador

Ricardo

Atívar.

*una dedicatoria especial al Dr. Victor Ugalde
Por su ese gran compromiso con el conocimiento
y su carácter ejemplar con la docencia de calidad
con mucho cariño y respeto.
Es un profesor como los que merece esta gran Universidad.*

A mis amigos:

Nieto Granados Zahé,

Fabiola I. Mata Ávila, Karla Lira García,

Oscar Moreno Farías, Roberto Jiménez Moranchel, Marco A. Pérez H.,

Raúl Cisneros M.,

Alfredo

Sosa

Arce,

Mateos

Velasco

Padrón

Terwot

Jaramillo

Miranda,

Arestegui,

Saalazar,

Calero,

Rivera,

Laura Moreno, Mildred, Ruth, Teresa, Alma, Cristina, Roxana, Lalo, Guillermo Araujo,

Oscar Gaspar, Donovan Popoca, Tonatihu, Jorge Gutiérrez Palacios, Jesús A. Obrajero

Huerta, Diego A. García Solís, Gustavo Lozano, Ignacio Zúñiga Pérez, Enrique,

Paty Gómez Lamadrid, Mónica Navarrete M., Fabiola, J. Francisco Valdez, Deyanira,

Miriam Fita, Miriam Paez, Liliana Bustamante S. Helga Castillo, Minerva Mariscal,

Oscar Ortínez, Laura Carmona, Elizabeth Juárez, Gabriela Sánchez Díaz, Paris,

Israel Moreno Ríos, Fernando Del Pozo, Adriana Garrido, Sabyne Rosas Landa

Loustau, Miriam Miranda Mondragón, Ana Elena Baeza, Eleaneth García

Paván, Mayra Montiel, Sandra Vidal, Verónica Tenorio Velásquez, Simael,

Luis "Garrapato", Mary Paz Orta, Silvia Libera Sabagh, Edna, Ara E.,

Miguel Solís I., Nadia L. Ortiz Comejo, Matilde Vázquez Tort,

Christian Mena, Gabriel "Chato", Paty García, Martha A. G.,

Miguel A García V., Sylvia Solís López, Fernando García, Josefina, Teodoro, Alfredo,

Benjamín, Engracia, Laura, Gabriel, Miguel, a todos aquellos que no mencioné

Y A MIS PROFESORES

**CONTENIDO:**

Lista de tablas y gráficas
Lista de figuras
Lista de abreviaturas
Resumen

Introducción**1 Justificación y objetivos de la tesis**

1.1	Justificación	1
1.2	Objetivos	4

2 Antecedentes

2.1	Fluidos de perforación	5
2.1.1	Definición de fluido de perforación	5
2.1.2	Recorrido que realiza un fluido de perforación	6
2.1.3	Clasificación de los fluidos de perforación	7
2.1.4	Composición de los fluidos de perforación	9
2.1.5	Propiedades de los fluidos de perforación	11
2.1.6	pH	12
2.1.7	Funciones de los fluidos de perforación	13
2.1.8	Consideraciones adicionales en la selección de un fluidos de perforación	15
2.2	Pruebas de toxicidad	16
2.2.1	Adecuación de métodos estandarizados para pruebas toxicológicas de rutina	18
2.2.2	Cálculo de CL ₅₀ (concentración letal al 50%)	19
2.3	Organismo de prueba	20
2.3.1	<i>Artemia franciscana</i> como organismo de prueba	20
2.3.2	Ventajas en el uso de bioensayos	21
2.4	Tóxico de referencia	23
3	Fase experimental	
3.1	Materiales y métodos	25
3.1.1	Pruebas de toxicidad aguda empleando <i>Artemia franciscana</i>	27
4	Resultados y Discusión	
4.1	Resultados	35
4.2	Discusión	42



Conclusiones		51
Glosario		53
Anexos		
ANEXO A	Descripción del organismo de prueba	55
ANEXO B	Cuenta de Heterótrofos	63
ANEXO C	Demanda Química de oxígeno	65
ANEXO D	Determinación del pH	67
ANEXO E	Determinación de la temperatura	69

**LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS**

Num.	TABLA	PÁGINA
1	Claves que se le asignaron a cada una de las muestras	26
2	Condiciones de trabajo en el bioensayo de pruebas de toxicidad	30
3	Condiciones de trabajo para el tóxico de referencia	34
4	Resultados de CL_{50} , C.V y $\sigma-1$ de las muestras con pH ajustado y sin ajustar	36
5	Resultados de análisis de varianza de un factor, comparando muestras con pH ajustado y sin ajustar	40
6	Resultados obtenidos de la variación de pH en el agua marina 30 %.	41
7	Resultados de CL_{50} del tóxico de referencia	42
8	Clasificación de grados de toxicidad	45
9	Resultados de CL_{50} corregido en ppm	47
10	Gráfica 1 Resultados de CL_{50} de FBAI de entrada	37
11	Gráfica 2 Resultados de CL_{50} de FBAI de salida	37
12	Gráfica 3 Resultados de CL_{50} de muestras del ECS de entrada	38
13	Gráfica 4 Resultados de CL_{50} de muestras del ECS de salida	38
14	Gráfica 5 Resultados de CL_{50} de recortes	39

**LISTA DE FIGURAS**

Num.	FIGURAS	PÁGINA
1	Equipo rotatorio	5
2	Circulación de un fluido	6
3	Recorrido que realiza un fluido de perforación en el pozo	7
4	Sistema de circulación de fluido	10
5	Transporte de recortes	14
6	Procedimiento para preparar la muestra del fluido en el bioensayo de toxicidad	29
7	Artemia expuesta al control y a la muestra TS 4	48

ANEXO I Biología de la especie

Num.	FIGURA	
A-1	<i>Artemia franciscana</i> en estado naupliar	57
A-2	<i>Artemia franciscana</i> adulto	58
A-3	Morfología del Corion	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ANOVA	Análisis de varianza
API	American Petroleum Institute
CV	Coefficiente de variación
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
ECS	Equipo de control de sólidos
EPA	Environmental Protection Agency
FBAI	Fluido base agua inhibido, Sistema base agua inhibido, Lodo
FPS	Fase de partículas suspendidas
IMP	Instituto Mexicano del Petróleo
NMX	Norma Mexicana
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
σ -1	Desviación estándar poblacional
SDS	Sodium lauryl sulphate
TSA	Agar cuenta estándar



RESUMEN

Uno de los objetivos principales del laboratorio de toxicidad del IMP, lugar donde se desarrolló el presente trabajo, es normar y evaluar toxicológicamente las descargas de los fluidos de perforación en nuestro país. Este trabajo presenta los resultados obtenidos de la evaluación toxicológica realizada a: 6 muestras de fluidos base agua inhibidos tomados a la entrada y salida del pozo, 6 fluidos muestreados en el equipo de control de sólidos (tornado) de entrada y salida y 3 muestras de recortes; provenientes de un pozo petrolero de la región sur de México.

Todas las muestras fueron analizadas tomando como marco los elementos necesarios de la norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI y la metodología pt435 subpt.A de la Environmental Protection Agency (EPA por sus siglas en inglés) empleando como organismo de prueba *Artemia franciscana*. Se analizó también de qué manera influye la variación de pH en la respuesta de los organismos.

Los fluidos y recortes evaluados resultaron ser, en general, no tóxicos de acuerdo a la tabla de clasificación de grados de toxicidad presentada por la IMCO/FAO/UNESCO para la *Artemia franciscana* en las siguientes condiciones de trabajo: temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH modificado a 8.0 ± 0.2 y sin modificar 9.0 ± 0.2 ; oxígeno mayor de 2 mg/L y salinidad de 30 g/L. Resultaron ser más tóxicas las muestras a las que no se les modificó el pH.



Este trabajo comprende un desarrollo teórico, en el cual se sustenta la importancia que tienen los FBAI en la fase de perforación de pozos petroleros. Contiene también los conceptos básicos de las pruebas de toxicidad y del uso de *Artemia franciscana* que justifican su utilidad como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad.

Contiene una parte importante donde se presenta la fase experimental de la evaluación toxicológica de las muestras antes mencionadas.

En una tercera parte se llevó a cabo el análisis de resultados, presentándolos en forma de tablas y gráficas para la mejor comprensión de éstas, se hace uso de la estadística para un mejor análisis y se propone una metodología que puede ser empleada en México para la evaluación toxicológica de fluidos de perforación empleando *Artemia franciscana*.



INTRODUCCIÓN

Los “fluidos de perforación” son un elemento insustituible en la perforación de un pozo petrolero, ya que ellos cumplen diversas funciones que permiten que la perforación sea más eficiente y segura.

No obstante los múltiples beneficios que los fluidos proporcionan a esta etapa de la actividad petrolera, el contacto de ellos con el ambiente impacta de forma negativa, cada vez menos gracias a las nuevas tecnologías de desarrollo. Los fluidos y recortes son dispuestos de manera diferente después de utilizarse en el proceso de perforación; por ejemplo algunos se tratan y después se emplean en el relleno de calles y carreteras, otros son tratados para ser dispuestos al mar; estos son destinos controlados; a pesar de que actualmente existen programas de cero descargas, se contempla la posibilidad de que ocurra algún derrame accidental.

Actualmente la industria petrolera asume que la protección y restauración del ambiente no es sólo una obligación que impone la ley sino una responsabilidad moral ante la sociedad. De ahí su deseo de que en todas las actividades industriales que realiza, se observe una armonía con la ecología del lugar.¹ Desde hace algunas décadas la industria petrolera ha destinado recursos para disminuir el impacto nocivo de los fluidos empleados en la

¹ PEMEX. *El petróleo*. Gerencia de Información y Relaciones Públicas. 1988, pp 31-33. 171-176.



perforación de pozos, desarrollando “fluidos base agua inhibidos” (FBAI) denominados “ecológicos” que disminuyen el daño al ambiente.

En mayo de 1983 se firmó el convenio entre la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología donde la industria petrolera asume la obligación de proteger, controlar y restaurar el ambiente en lo relativo a sus actividades industriales.

Derivado de lo anterior, y aprovechando el avance de las tecnologías de fluidos, se han desarrollado aditivos que resultan ser menos tóxicos al emplearse en la formulación de los “fluidos base agua inhibidos” (FBAI) utilizados en la perforación de pozos petroleros, es así como surge el proyecto de evaluar mediante bioensayos la toxicidad de los aditivos y todo lo que resulte de las operaciones en campo; en éste trabajo dichas evaluaciones se hicieron a través de pruebas de toxicidad aguda estáticas -sin renovación del medio de prueba. posteriormente se hizo la determinación de toxicidad para las muestras en las que se obtuvo una concentración letal al 50% (CL₅₀) con el programa Probit LC₅₀ versión 2.5.



I JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Justificación

El petróleo es un producto energético y por el momento insustituible para la economía mundial. Una etapa de la extracción del mismo es la perforación del pozo petrolero, en esta etapa de desarrollo se debe evitar el impacto nocivo sobre el medio ambiente.

Esta preocupación y la atención a restricciones legales han obligado al uso de prácticas cada vez más rigurosas para la obtención del hidrocarburo, una de ellas es que cumplan con las normas ambientales y de seguridad. Una de las restricciones tiene que ver con el uso de los fluidos empleados en la perforación, lo que ha propiciado tratar de sustituir o cambiar los fluidos base aceite (emulsiones inversas) por lodos o “fluidos base agua inhibidos” (FBAI); esta tarea ha resultado muy compleja; sobre todo en las zonas con alto contenido de arcillas, ya que estas se hidratan al ser intervenidas con “fluidos base agua” (FBA), resultando problemas de inestabilidad e incluso la probabilidad de que se colapse el pozo.

El cumplimiento de la legislación en materia ambiental obliga a las compañías perforadoras a trabajar con nuevos fluidos; estos usan aditivos inhibidores de la hidratación de arcillas en la preparación de “fluidos base agua inhibidos” (FBAI), mismos que reducen el impacto ambiental. La importancia de profundizar en el estudio de este tipo de fluidos se debe a que los campos petroleros mexicanos se encuentran en zonas con altos contenidos de arcilla.



Las operaciones de perforación implican el análisis detallado de procesos, prácticas, metodologías, técnicas y herramientas de control para alcanzar las metas y objetivos planeados, dentro de un marco de desarrollo sustentable siendo parte importante el uso de FBAI.

En los E.U.A la regulación vigente en materia de descarga de fluidos de perforación, concebida mediante el instrumento legal denominado NPDES (National Pollution Discharge Elimination System), ha originado que las diferentes compañías manufactureras de estos fluidos tengan una mayor tendencia al desarrollo de fluidos menos nocivos al ambiente.²

Esta industria se ha enfocado a atender la selección de diseños de fluidos de perforación que permitan cumplir con las regulaciones ambientales del país, las cuales cada vez son más estrictas en las operaciones de perforación. Los “fluidos base agua” han sustituido el uso de aceite diesel, reduciendo de ésta manera los niveles tóxicos de sus componentes, la concentración de sustancias orgánicas y el daño al ambiente.

El gran desarrollo de la industria petrolera ha traído consigo mejoras tecnológicas para lograr una mayor eficiencia en las operaciones de perforación de pozos petroleros. Este desarrollo tiene como consecuencia efectos significativos en el medio ambiente (flora y fauna). Este proceso es tan acentuado que representa un capítulo en la historia ya que ocasiona

² IMP. Estudio de la especie marina *Penaeus setiferus* y el impacto generado sobre la misma debido a los sistemas de fluidos utilizados en la perforación de pozos costa fuera. Proyecto Fidepemex CDC-0402. 1995. pp 25-29



impacto directo o indirecto tanto en el ser humano como en otras especies que incluso se encuentran en peligro de extinción.

Los FBAI son una mezcla de materiales y aditivos que se emplean en las operaciones de perforación, contribuyendo a la generación de contaminantes.³

Por las razones mencionadas es importante realizar la evaluación de un FBAI empleando el crustáceo *Artemia Franciscana*. La evaluación debe realizarse con muestras representativas generadas durante la etapa de perforación. Cabe mencionar que casi en ningún análisis de toxicidad se considera una modificación del pH en la muestra que esta en contacto con el organismo, un cambio en las condiciones de acidez puede ser de interés en los resultados que arroje esta evaluación.

Dado que *Artemia Franciscana* es un organismo que presenta muchas ventajas en este tipo de bioensayos, un estudio con estas características puede resultar una propuesta interesante para regular la evaluación de estos materiales.

³ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985. pp 289-302.



1.2 Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la toxicidad aguda de un “fluido base agua inhibido” empleado en la perforación de un pozo petrolero, usando como organismo de prueba *Artemia franciscana*.

Objetivos particulares

- Evaluar la toxicidad aguda de un fluido de perforación (lodos y muestras del equipo de control de sólidos) y recortes obtenidos en diferentes niveles de perforación del pozo, a 1000, 1500 y 2000 metros de profundidad, empleando como organismo de prueba *Artemia franciscana*.
- Determinar la influencia de una modificación en el pH en la toxicidad aguda de todas las muestras.
- Presentar la utilidad de la *Artemia franciscana* como una posible alternativa en la regulación de las pruebas de toxicidad en fluidos provenientes de la perforación de un pozo.



2 ANTECEDENTES

2.1 Fluidos de perforación

2.1.1 Definición de “fluido de perforación”

Los fluidos de perforación son una mezcla de materiales y aditivos que se emplean en las operaciones de perforación de pozos petroleros. De acuerdo con el Instituto Americano del Petróleo (API, por sus siglas en inglés) se define como un fluido circulante utilizado en la perforación rotatoria (Fig. 1) para ejecutar todas las funciones requeridas (operaciones de perforación).⁴

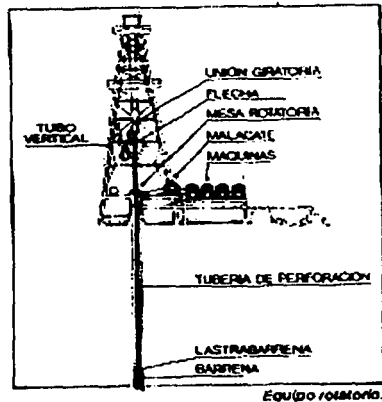


Fig. 1. Equipo rotatorio.⁵

⁴ Morales, D. de V. *Fluidos de perforación*. IMP-UNAM, México, 2001, pp 1-45.

⁵ PEMEX. *El petróleo*. Gerencia de Información y Relaciones Públicas, 1988, pp 31-33, 171-176.



2.2.1 Recorrido que realiza un fluido de perforación

El lodo (FBAI), como comúnmente se le conoce es bombeado a través de la sarta de perforación hasta las toberas de la barrena en el fondo del pozo (Fig 2), y regresa hacia arriba a través del espacio anular formado por las paredes del hoyo o la tubería de revestimiento. Una vez que el lodo alcanza la superficie, es recuperado a través de un equipo de control de sólidos (centrífuga, temblorina, hidrociclones) en el cual se separan las rocas removidas (recortes) de la formación geológica del lodo. Finalmente el lodo es reconstituido con aditivos para devolverle sus características fisicoquímicas deseadas y posteriormente recircularse al sistema (Fig. 3).

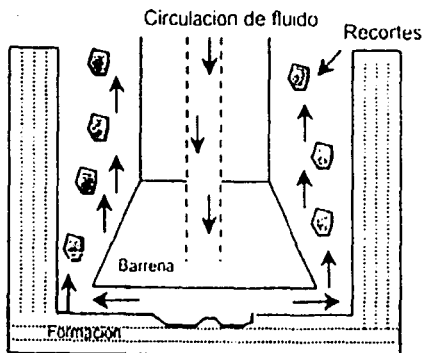


Fig. 2 Circulación de un fluido.⁶

⁶ González, S. Formulación de un fluido de perforación base agua utilizando glicoles como inhibidores de hidratación de lutitas. Tesis de Licenciatura. Ingeniería química, FESC-1, UNAM. 1999: 1-92.

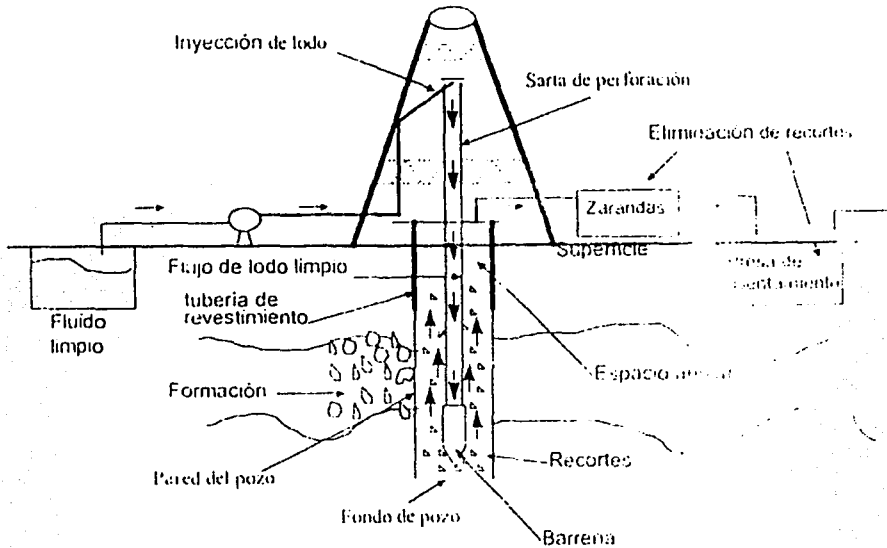


Fig. 3. Recorrido de un fluido de perforación.⁷

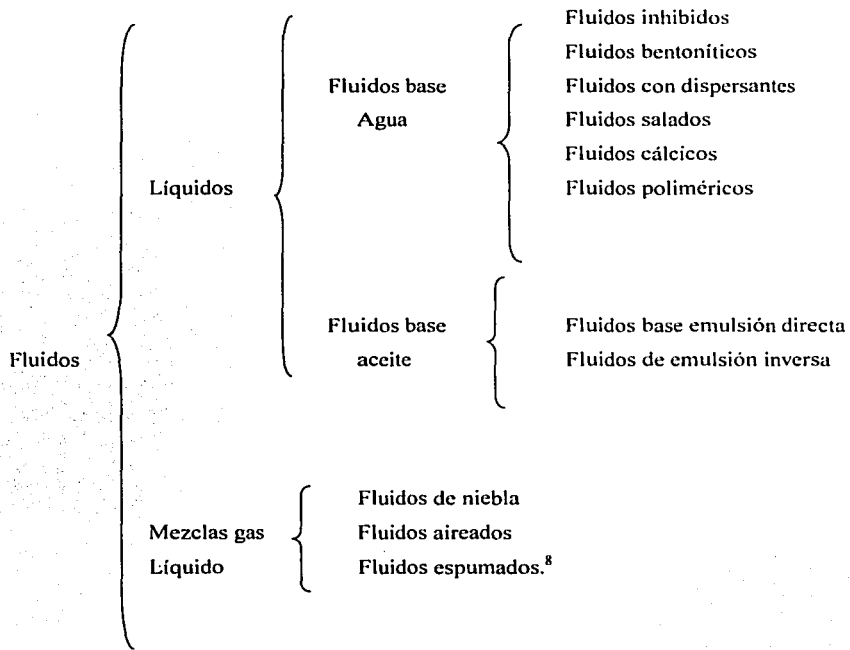
2.1.3 Clasificación

Los fluidos que en este trabajo son objeto de estudio son los llamados “fluidos base agua inhibidos” (lodos y fluidos del ECS) y recortes los cuales, a diferencia de otros, poseen la característica de dañar menos el ambiente.

⁷ Idem.6.



Los fluidos de perforación se pueden clasificar de acuerdo a la fase continua en la que se mezclan sus componentes, y a esto se le conoce como la base del fluido, la cual puede ser base agua o base aceite.



* Morales, D. de V. *Fluidos de perforación*. IMP-UNAM. México. 2001, pp 1-45.



2.1.4 Composición del fluido de perforación

El agua fue el primer fluido de perforación que se empleó en la perforación de pozos y actualmente es el componente principal de muchos fluidos. Los “lodos base agua” son los más utilizados en el mundo, en estos fluidos la fase continua es el agua.⁹

Los aditivos que se añaden a los fluidos de perforación para controlar algunas variables son los siguientes:

- Viscosificantes: arcillas (bentonita, atapulgita), polímeros.
- Densificantes: barita.
- Reductores de viscosidad: fosfatos, tanatos, poliacrilato de sodio.
- Reductores de filtrado: carboximetilcelulosa, celulosa polianiónica, acrilatos, bentonita, dispersantes.
- Emulsificantes: aceite en agua, agua en aceite.
- Materiales para pérdidas de circulación: granular, fibroso, hojuelas, lechadas.
- Aditivos especiales: floculantes, anticorrosivos, antiespumantes, controladores de pH, lubricantes.
- Despegador de tuberías.

⁹ Zapata, P. Evaluación de la toxicidad de ocho fluidos genéricos de perforación de pozos petroleros con nauplios de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). Tesis de licenciatura Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 1999: 1-66.



El fluido de perforación a lo largo de su recorrido por el pozo va sufriendo diversas modificaciones químicas y físicas al aumentar la presión y la temperatura; además de que se adicionan nuevos compuestos que van facilitando el proceso de perforación.¹⁰ (Fig. 4).

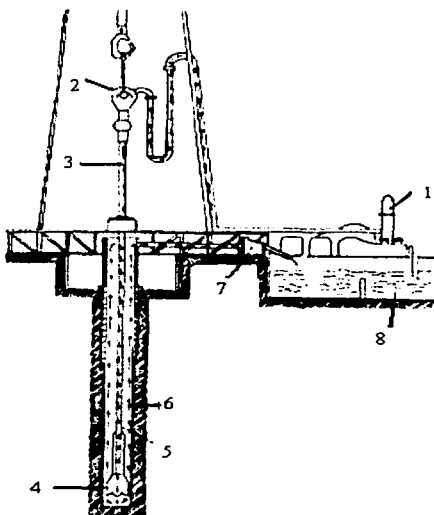


Fig. 4. Sistema de circulación del fluido.

- | | |
|---------------------|--|
| 1.- Bombas de lodo | 5.- Circulación del lodo dentro de la tubería de perforación |
| 2.- Unión giratoria | 6.- Espacio anular |
| 3.- Kelly | 7.- Temblorina |
| 4.- Barrena | 8.- Presa de succión. ¹¹ |

¹⁰ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985, pp 289-302.

¹¹ Fernández, P. Fundamentos y conceptos básicos de la ingeniería de perforación. Tesis de Licenciatura. ESIA, IPN. 1988: 112.



2.1.5 Propiedades de los fluidos de perforación

Las propiedades reológicas que se evalúan en un fluido son:

Viscosidad.- definida como la resistencia que presenta un fluido a fluir. Las arcillas como bentonita o atapulgita le proporcionan tales propiedades a los lodos. Para medirla se emplea el embudo Marsh o el viscosímetro Fann.

Las propiedades tixotrópicas:

Punto de cedencia y geles.- determinan la magnitud de las fuerzas atractivas que existen entre sólidos y que dependen de la distancia que hay entre las partículas.

Las propiedades físicas:

Densidad.- definida como la relación de masa / volumen. La barita es el material más empleado para aumentar esta propiedad en los fluidos de perforación.¹² Esta propiedad se controla para dar suficiente presión hidrostática. Su control evita la pérdida de circulación.

Filtración.- es la habilidad que tiene el lodo para sellar la formación geológica permeable expuesta por la barrena por medio de un enjarre de baja permeabilidad. Propiedad importante de controlar para evitar inestabilidad del pozo.

Enjarre.- se refiere a la capa de sólidos del lodo que se forma en la pared del agujero cuando el líquido del lodo se filtra en la formación.

¹² Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985, pp 289-302.



Las propiedades químicas:

Alcalinidad.- propiedad que asegura el control apropiado de la química de fluido, los defloculantes, requieren de un medio alcalino para funcionar adecuadamente; ésta es originada por la cantidad de iones hidroxilo (OH^-) presentes

Dureza.- la dureza del fluido se evalúa principalmente con la cantidad de iones calcio y magnesio.

Cloruros.- la concentración de cloruros se usa para estimar resistividad de las aguas de formación y para diferenciar entre formaciones subsuperficiales.¹³

Todas estas son propiedades que se evalúan para conocer la funcionalidad del fluido de perforación, es importante controlar cada parámetro para obtener una perforación eficiente y segura. El tipo de fluido a emplear se selecciona teniendo como referencia la formación geológica a intervenir. Como vemos los fluidos de perforación son una mezcla química y funcional muy compleja.

2.1.6 pH

Esta variable se determina con un potenciómetro de alta impedancia. Experimentalmente esta variable tuvo una influencia importante en los resultados obtenidos.

¹³ IMP. *Manual de Tecnología de Lodos*. Subdirección de capacitación. 1979, pp 1-40.



El pH se define como el logaritmo negativo de la concentración de H^+ .

$$pH = -\log [H^+]$$

Cuando se mide el pH con el dispositivo adecuado, lo que se mide es el logaritmo negativo de la actividad de iones hidrógeno, no su concentración:

$$pH = -\log \alpha_{H^+} = -\log [H^+] \gamma_{H^+}$$

donde:

α es actividad de H^+

y γ es el coeficiente de actividad de H^+ .¹⁴

Para establecer un pH alcalino en un lodo base agua se puede usar sosa cáustica (NaOH) o hidróxido de potasio (KOH). Es importante mantener un pH adecuado para que la arcilla se disperse y para que se lleven a cabo las reacciones químicas necesarias en el lodo tales como solubilidad, efectividad de los aditivos y control de corrosión por sulfuros.

2.1.7 Funciones de los fluidos

Es trascendente resaltar las funciones que tienen los fluidos de perforación para que de ésta manera conocer la importancia que tienen en la extracción del hidrocarburo. A continuación se enumeran:

¹⁴ Harris, C. *Análisis químico cuantitativo*. Grupo editorial Iberoamérica. 1992, pp 67-115.



- Acarrear los recortes hacia la superficie. La velocidad del fluido en el espacio anular debe ser mayor que la velocidad de asentamiento de las partículas, para que puedan ser llevadas hacia la superficie (Fig. 5).
- Remoción de recortes del lodo en la superficie. Los recortes de roca deben ser removidos del lodo en la superficie y evitar una alta concentración de sólidos en el fluido.
- Sustentar los recortes. El fluido deberá tener la capacidad de sustentar los recortes circulados a fin de que estos puedan ser transportados eficientemente en el caso de que se suspenda el bombeo.¹⁵

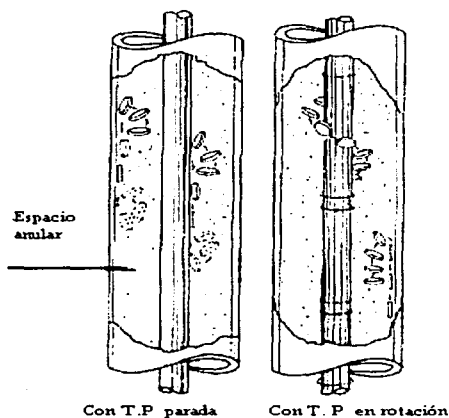


Fig. 5. Transporte de recortes.

T.P: Tubería de perforación.¹⁶

¹⁵ IMP. *Manual de Tecnología de Lodos*. Subdirección de capacitación. 1979, pp 1-40.

¹⁶ Fernández, P. *Fundamentos y conceptos básicos de la ingeniería de perforación*. Tesis de Licenciatura. ESIA. IPN, 1988: 112.



- Enfriar y lubricar la barrena y la sarta de perforación. Debido a la fricción que hay entre la barrena y la formación geológica, se genera calor; el lodo debe transmitir y absorber ese calor hacia la superficie y al mismo tiempo lubricar la barrena.
- Mantener la integridad del pozo. Por fenómenos geológicos se encuentran zonas de fractura, y/o arcillas hidratables. El lodo debe controlar que la parte perforada permanezca abierta y así continuar con la perforación.
- Control de la presión de la formación geológica El lodo debe ser capaz de proveer la presión suficiente para igualar o exceder la presión de la formación. Si no hay control de la presión podrían ocurrir derrumbes.¹⁷
- Controlar corrosión de la sarta de perforación, tubería de revestimiento y tuberías en general. Muchos pozos generan gases tóxicos como sulfuro de hidrógeno, el cual daña la salud del personal y daña los componentes metálicos haciéndolos más frágiles.¹⁸

2.1.8 Consideraciones adicionales en la selección de un fluido de perforación:

- No deben ser contaminantes al ambiente ni al personal.
- Debe favorecer una operación eficiente de terminación de pozos.
- Evitar el daño a la formación geológica.
- No debe interferir con la productividad normal de la formación.
- Tipo de formación perforar.

¹⁷ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985, pp 289-302.

¹⁸ Morales, D. de V. *Fluidos de perforación*. IMP-UNAM. México. 2001, pp 1-45.



- Intervalos de temperatura, resistencia y presión de la formación.
- Procedimiento de evaluación de la formación.
- Calidad del agua disponible.
- Riesgos ambientales.¹⁹

2.2 Pruebas de toxicidad

La toxicidad son los efectos adversos que causan en un organismo las sustancias químicas o agentes físicos. Las pruebas de toxicidad determinan la resultante de la concentración y del tiempo de exposición.²⁰

Los estudios de toxicidad tienen una gran importancia ya que permiten evaluar muestras que interaccionan con el ambiente y causan un impacto en él. Una prueba de toxicidad acuática es un procedimiento en el que el organismo de prueba es sometido al tóxico disuelto en diferentes concentraciones y se mide la respuesta del organismo acuático. para detectar o medir el efecto de una o más sustancias, residuos o factores ambientales actuando aisladamente o en combinación.

¹⁹ *Idem* 14.

²⁰ APHA, AWA, WPCF. *Standard Methods for examination of water and wastewater. Métodos Normalizados Para el análisis del agua y aguas residuales*. 20ª ed. E.U.A. 1998, Capítulo 8.



Clasificación de toxicidad de acuerdo al tiempo de exposición:

La toxicidad aguda se refiere al efecto letal u otro efecto producido en un tiempo relativamente corto; usualmente 4 días de exposición al tóxico para macrovertebrados y periodos más cortos, 2 días, para organismos más pequeños. La toxicidad crónica es el efecto a largo plazo que puede estar relacionado con crecimiento, metabolismo, reproducción, mutaciones o la muerte.²¹

Actualmente para saber si alguna sustancia esta ocasionando algún daño de cualquier índole se recurre a uso de pruebas de toxicidad, en este caso se empleó un organismo acuático marino para evaluar las muestras antes señaladas poniéndolo en contacto con ellas y así determinar en un periodo corto de exposición si son tóxicas y en qué grado. En un estudio de toxicidad es de suma importancia conocer la biología de la especie de prueba para que sea trabajado de manera adecuada.

Cuando se produce la muerte del 50% de los organismos expuestos durante un tiempo de exposición específico a determinada concentración del tóxico, hablamos de una concentración letal al 50% (CL₅₀).²²

²¹ Zapata, P. Evaluación de la toxicidad de ocho fluidos genéricos de perforación de pozos petroleros con nauplios de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). Tesis de licenciatura Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 1999: 1-66

²² APHA, AWA, WPCF. Standard Methods for examination of water and wastewater. Métodos Normalizados Para el análisis del agua y aguas residuales. 20ª ed. E.U.A. 1998, Capítulo 8.



La importancia de una prueba de toxicidad en un periodo de tiempo corto radica en que se puede obtener así mismo información que sirve como base para el diseño de una prueba crónica o para determinar la sensibilidad relativa del organismo a las diferentes condiciones de prueba.²³

Las pruebas de toxicidad se clasifican de acuerdo al flujo de la siguiente manera: una prueba estática es aquella en la que el medio en disolución (tóxico y medio de cultivo) y el organismo se mantienen en sus recipientes durante el tiempo que dure la prueba. Una prueba de renovación es una prueba estática en donde la disolución es remplazada por una disolución fresca de igual composición cada 24 horas aproximadamente. Una prueba de flujo continuo consiste en remplazar la disolución continuamente durante el tiempo que dure la prueba.²⁴

2.2.1 Adecuación de métodos estandarizados para pruebas toxicológicas de rutina

1.- Desarrollo y estandarización de la metodología de prueba:

- a) Selección de la especie de prueba.
- b) Selección del criterio de prueba y duración de la misma.
- c) Análisis de parámetros bióticos (origen geográfico de los quistes, fase de vida, edad de los organismos, dieta) y selección de valores estándares.

²³ *Idem.*

²⁴ Zapata, P. Evaluación de la toxicidad de ocho fluidos genéricos de perforación de pozos petroleros con nauplios de *Artemia franciscana* (Anostraca: Artemiidae). Tesis de licenciatura Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, 1999: 1-66.



- d) Análisis de parámetros abióticos (nacimiento, medio de dilución, temperatura, salinidad, equipo, personal) y selección de valores estándares.
- e) Determinación de la repetibilidad.

2.- Evaluación de la sensibilidad del método de prueba:

- a) Determinación de la sensibilidad de la prueba por varios tipos de tóxicos.

3.- Evaluación de interlaboratorios:

- a) Validar precisión (reproducibilidad) y aceptabilidad de la prueba.
- b) Ajuste del procedimiento de prueba.²⁵

2.2.2 Cálculo de CL_{50}

Para evaluar la relación concentración – respuesta de un contaminante (fluidos, recortes y tóxico de referencia) sobre un organismo, medido en términos de su CL_{50} y su precisión o intervalo de confianza, se empleó el programa de Unidades Probabilísticas “Probit” versión 2.5.²⁶

²⁵ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985, pp 289-302.

²⁶ Stephan, C.E. *Methods calculating an LC50. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, ASTM STP 534. Philadelphia, U.S.A. 1977, pp 65-84.



2.3 Organismo de prueba

2.3.1 *Artemia franciscana* como organismo de prueba

La artemia es usada ampliamente como un organismo modelo en estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y ecológicos.²⁷ Fue uno de los primeros organismos empleados en pruebas de toxicidad partiendo de organismos en un estado de vida latente o de quiste.²⁸ Ver ANEXO A.

Como prueba de rutina en ecotoxicidad, se emplea por razones de uniformidad y reproducibilidad. La Academia Nacional de Ciencias en E.U.A. estableció un criterio para evaluar procedimientos para la realización de la prueba y en primer lugar exige estandarizarla para reducir la variabilidad entre laboratorios. El uso de la artemia proporciona diversas ventajas: por ejemplo los quistes se pueden guardar por periodos largos sin perder su viabilidad, una vez incubados estos nacen en un periodo de 24 horas, su cultivo en el laboratorio es fácil y pueden vivir algunos días sin alimento.²⁹

²⁷ Browne, R.A. y Wanigasekera, G. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1999**, 244 (2000), 29-43.

²⁸ Van Steertegem, M. y Persoone, G. *Progress in standardization of aquatic toxicity test*. Edit. Aspecial publication. **1993**, pp 81-93.

²⁹ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. **1985**, pp 289-302.



2.3.2 Ventajas en el uso de bioensayos:

- Disponibilidad todo el año.
- Mantenimiento mínimo.
- Bajo costo.
- Sensibilidad.
- Organismo valioso de referencia para otras especies de prueba.
- Organismo muy estudiado, se cuenta con abundante información del mismo.³⁰

Los siguientes parámetros biológicos necesitan ser cuidadosamente seleccionados y estandarizados:

- ✓ El origen geográfico y condiciones de almacenamiento de los quistes. Los quistes de artemia son colectados a nivel mundial, localizados en diversos sitios, por lo que presentan una diferente sensibilidad a los tóxicos, entonces es importante conocer sus características genéticas e información sobre su origen.³¹ La sensibilidad del organismo puede variar con las condiciones de almacenamiento.
- ✓ La edad del organismo de prueba. La sensibilidad letal y subletal de las diferentes concentraciones varían durante el ciclo de vida. Para evitar diferencias en la sensibilidad, los organismos deben ser exactamente de la misma edad al iniciar la prueba. los embriones salen del cascarón bajo condiciones estrictamente controladas de

³⁰ Van Steertegem, M. y Persoone, G. *Progress in standardization of aquatic toxicity test*. Edit. Aspecial publication. 1993, pp 81-93.

³¹ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985, pp 289-302.



temperatura, aireación, luz y pH. Se conoce que la larva de artemia es más sensible al tóxico que los adultos.³²

- ✓ Condiciones de cultivo y dieta especial. La sensibilidad se ve afectada por la dieta: ésta debe ser de adecuada, conocerse la composición, cantidad y horarios de alimentación.

- *Artemia franciscana* en la Norma Mexicana

La Norma Mexicana NMX –AA-110-1995-SCFI establecida por la Dirección General de Normas propone la metodología para la evaluación de la toxicidad aguda con *Artemia franciscana*, método que se sigue para hacer una evaluación de la calidad del agua. Esta norma es aplicable para determinar la toxicidad aguda de aguas residuales industriales, municipales y agrícolas, lixiviados, sustancias puras o combinadas así como de extractos acuosos con salinidades mayores que 10 %.

Esta norma no es aplicable para el análisis toxicológico de fluidos de perforación.

³² Browne, R.A. y Wanigasekera, G. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1999, 244 (2000), 29-43.



2.4 Tóxico de referencia

Se refiere a una sustancia química empleada en bioensayos de toxicidad, cuyo efecto en los organismos a determinadas concentraciones es conocido; de esta manera permite establecer el estado de respuesta de los organismos empleados en la prueba. El empleo de este tóxico proporciona una evaluación general de la precisión del método a través del tiempo.³³

El tóxico de referencia puede establecer una variabilidad en el organismo que pudiera deberse a varios factores genéticos o cambios en la calidad del agua. Da información a cerca de la anomalía del organismo de prueba y de la sensibilidad que posee.³⁴

Para propósito regulatorios, las pruebas de toxicidad, deben demostrar un adecuado control de calidad intra y entre laboratorios, deben ser lo suficientemente simples para que puedan ser realizadas por los sectores públicos, académico y privado.³⁵

El tóxico de referencia empleado en este estudio fue el lauril sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) el cual posee las siguientes características:

³³ Norma Mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI. Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia Franciscana* (Crustácea:anostraca).

³⁴ Environmental Protection Series. *Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicans*. Report EPS 1/RM/12. Canadá. 1990, pp 1-20

³⁵ Cairns, J. *What constitutes Field Validation of Predictions Based on Laboratory Evidence?*. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10 Volume, ASTM STP 971. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, E.U.A.. 1988, pp 361-368.



- Se encuentra disponible en su forma pura.
- No es soluble en agua marina.
- No es muy estable en disolución.
- Estable en anaquel.
- Fácil de analizar.
- Su uso es prácticamente seguro.

La literatura recomienda emplear por lo menos dos tóxicos de referencia, de esta manera se obtienen datos más confiables. El tóxico que se empleó en ocasiones en el presente trabajo fue el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_4$), reactivo dañino para el hombre, además de que es difícil de darle tratamiento para recuperarlo, razón por la cual o se utilizó más; la ventaja que tiene el $K_2Cr_2O_4$ sobre el SDS es que éste es estable en disolución.

Las pruebas con el tóxico de referencia se deben realizar frecuentemente cuando se introducen nuevos organismos o un nuevo protocolo en el laboratorio; se propone realizar una prueba por semana cuando se trata de toxicidad aguda y dos pruebas si se realizan pruebas crónicas. Para realizar un control estadístico se requieren de 5 a 10 pruebas y se acepta un coeficiente de variación menor o igual a 30%.³⁶

³⁶ Environmental Protection Series. *Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicans*. Report EPS 1/RM/12. Canadá. 1990, pp 1-20



3 FASE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y métodos

La toxicidad evaluada fue de un sólo fluido a diferentes etapas de circulación. El lodo fue muestreado a tres diferentes profundidades. Para el caso de los lodos de entrada fueron: 850-1000 m, a 1400-1600 m y a 1900-2000 m. Para los lodos de salida las profundidades fueron: 850-950 m, 1400-1550 m, y 1850-1950 m. Las muestras del equipo de control de sólidos provenientes de la entrada del pozo fueron de las siguientes profundidades: 800-1150 m, 1300-1600 m, 1850-1950 m. Y las que corresponden a la salida: 900-950 m, 1350-1600 m, y 1800-1950 m de profundidad. También provenientes del equipo de control de sólidos, se evaluaron los sólidos separados del lodo que ha salido de circulación junto con ellos y que sólo se clasificaron por su profundidad, a: 800-1000 m, 1400-1650 m, 1850-2000 m de la superficie.

Para fines prácticos se le asignó una clave a cada una de las muestras evaluadas provenientes de diferentes profundidades del pozo petrolero (Tabla 1).



Tabla 1.- Muestras obtenidas del pozo de perforación que se evaluaron en éste trabajo:

Lodos de perforación.

Muestra	Clave	Profundidad (m)
Lodo entrada 1	LE 1	850-1000
Lodo salida 2	LS 2	850-950
Lodo entrada 3	LE 3	1400-1600
Lodo salida 4	LS 4	1400-1550
Lodo entrada 5	LE 5	1900-2000
Lodo salida 6	LS 6	1850-1950

Muestras del ECS

Muestra	Clave	Profundidad (m)
Tornado entrada 1	TE 1	800-1150
Tornado entrada 2	TE 2	1300-1600
Tornado entrada 3	TE 3	1850-1950
Tornado salida 4	TS 4	900-950
Tornado salida 5	TS 5	1350-1600
Tornado salida 6	TS 6	1800-1950

Recortes.

Muestra	Clave	Profundidad (m)
Recorte 1	R1	800-1000
Recorte 2	R2	1400-1650
Recorte 3	R3	1850-2000



3.1.1 Pruebas de toxicidad aguda empleando *Artemia franciscana*

El empleo de quistes de artemia en pruebas de toxicidad, abre una perspectiva importante para regularizar metodologías. Éstos, como material biológico, evitan problemas de mantenimiento y captura del organismo en su hábitat natural, disminuyendo tanto la variación de la sensibilidad del organismo, como la variabilidad genética.

Material:

Un dispersor (velocidad de 3000 rpm)	Un vaso de precipitado de 150 mL
Balanza	Matraces de 10 mL
Potenciómetro	18 tubos de ensayo
Termómetro	Una caja petri
Refractómetro	Pipetas Pasteur.
Oxímetro	Pipetas volumétricas
Termostatos	<i>Artemia franciscana</i>
Un vaso de precipitado de 250 mL	Agua marina al "Instan Ocean" 30 %

Desarrollo experimental

A.-Preparación de la muestra

- 1.- En un vaso de precipitados de 250 mL colocar 10 mL de muestra y añadir 90 mL de agua marina al 30 % (Es una relación 1:9).



- 2.- Agitar con dispersor a 3000 rpm durante 10 minutos para homogeneizar la mezcla.
- 3.- Ajustar el pH de la mezcla a un pH cercano al que tiene el agua marina, con HCl 6N.
- 4.- Dejar reposar la mezcla durante 1 hora.
- 5.- Una vez transcurrido el tiempo, decantar el sobrenadante en un vaso de precipitados de 150 mL.
Evitar la turbulencia.
- 6.- Con la fase de partículas suspendidas (FPS) trabajar para realizar las diluciones correspondientes (Fig. 6).

B.- Bioensayo

- 1.- Realizar una prueba exploratoria con las siguientes concentraciones (v/v):
100 %, 50 %, 10 %, 5 %, 1 %.
Tomar la cantidad de muestra indicada para cada concentración y aforar con agua marina al 30 %.
- 2.- Los parámetros a medir y a controlar son: pH, temperatura, salinidad y oxígeno, al inicio de la prueba y al final de la misma.
- 3.- Cada concentración se va a distribuir en un volumen de 5 mL en dos tubos de ensayo.
- 4.- Colocar los tubos a temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una vez determinado el intervalo de CL_{50} elegir 5 concentraciones alrededor del mismo y realizar el bioensayo con tres replicas y dos repeticiones.



Los bioensayos realizados en este trabajo fueron monitoreados y se controlaron variables que pudieran ejercer algún cambio en la respuesta del organismo de prueba. En la Tabla 2 se describen las condiciones de trabajo definidas para la realización de las pruebas.

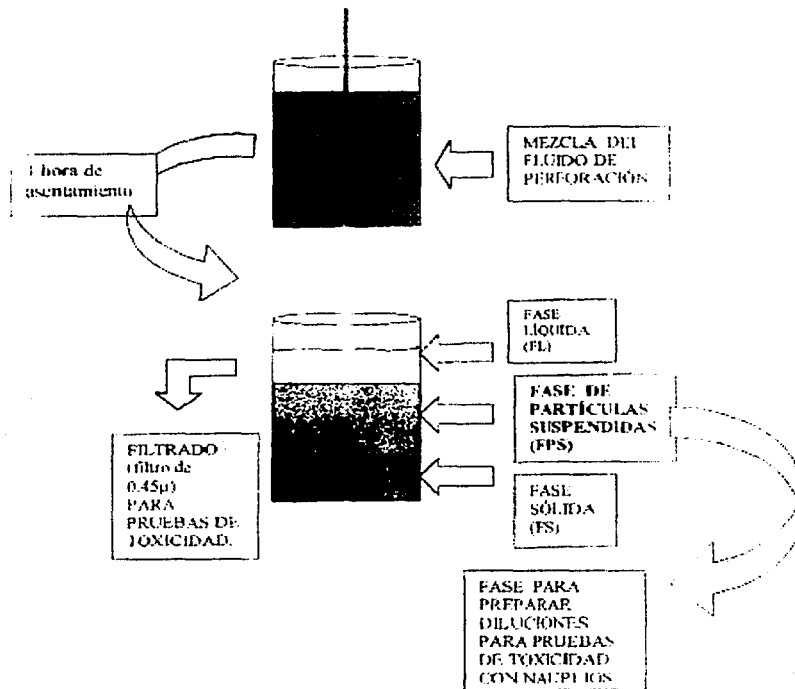


Fig. 6. Procedimiento para preparar la muestra en el bioensayo de toxicidad.³⁷

³⁷ Jones, M. y Hulse, M. Drilling-fluid bioassays and the GCS. *Technology, Oil and Gas Journal*, A Division of Halliburton Co. Houston, 1982, pp 241-244.



Tabla 2. Condiciones de trabajo en el bioensayo de pruebas de toxicidad.

Característica	Observación
✓ Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la disolución de prueba
✓ Duración	48 horas
✓ Intensidad luminosa	600- 1000 luxes
✓ Fotoperiodo	16 horas luz/ 8 horas oscuridad
✓ temperatura	27°C ± 0.2 °C
✓ salinidad	30 ‰
✓ pH	8.0 ± 0.2 AJUSTADO 9.0 ± 0.2 SIN AJUSTAR
✓ aireación	No
✓ alimentación	No
✓ recipientes de prueba	Tubos de ensaye
✓ volumen de prueba	5 mL / tubo
✓ No. De concentraciones (%)	5
✓ No. De replicas	3 / concentración
✓ No. De repeticiones	2/ concentración
✓ Medio de dilución	Agua marina artificial 30 ‰ "Instan Ocean"
✓ No. De organismos por replica	10
✓ Edad de los organismos	Nauplios en estadio I
✓ Respuesta evaluada	mortandad



C.- Metodología para la obtención de los organismos de prueba (*Artemia franciscana*)

Parámetros a controlar en una eclosión: la temperatura se mantendrá constante entre 25°C y 30°C, salinidad al 30 % y un pH en un intervalo de 7.5 a 8.5; oxígeno con niveles mayores de 2 mg/ L; iluminación de 200 luxes.

Material: * 1g de quistes de *Artemia franciscana*
 * 2 g de lentejas de NaOH
 * 50 mL de (cloralex 6%)
 * 2 L de agua marina al 30 %

- 1.- Colocar 50 mL de hipoclorito de sodio 6% de pureza en un vaso de precipitado de 250 mL.
 Añadir 50 ml de agua marina.
- 2.- Poner en agitación tal mezcla con una barra magnética.
- 3.- Adicionar las lentejas de sosa. Esperar hasta disolver.
- 4.- Añadir el gramo de quiste y continuar con la agitación.
- 5.- Los quistes presentan un color café oscuro, al romperse el corion con esta reacción toman un color rojizo.
- 6.- En este momento, enjuagar los quistes en una coladera con agua corriente.
- 7.- Una vez enjuagados, pasarlos a un recipiente con 2 L de agua marina, con aireación; expuesto a luz blanca, con una temperatura entre 25°C y 30 °C.
- 8.- Esperar 24 horas.



D.-Acondicionamiento de la especie de prueba (*Artemia franciscana*)

- 1.- Una vez eclosionada la artemia, colocarla en agua salina al 30 % en una caja petri.
- 2.- Con una pipeta Pasteur tomar 10 organismos. colocarlos en cada tubo de cada concentración de la muestra. Tomar las artemias que presentan mayor movimiento.
- 3.- La prueba se lleva a cabo por 48 horas, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

E.- Prueba de sensibilidad del organismo de prueba.

Control positivo o tóxico de referencia

- 1.- Pesar 1 mg de lauril sulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), y aforar a 10 mL con agua destilada.
 - 2.- Hacer diluciones para obtener concentraciones de:
32 mg/mL, 16 mg/mL, 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL.
- La CL₅₀ de este tóxico se encuentra en 16 mg/mL \pm 2 mg/mL.³⁸ (Tabla 3).

F.- Control negativo

- 1.- Emplear agua marina al 30 %.
- 2.- En tres tubos de ensaye colocar 5 mL de agua marina.
- 3.- Medir parámetros fisicoquímicos ya mencionados.
- 4.- Templar a 27°C \pm 0.2 °C.
- 5.- Colocar 10 organismos en cada tubo.
- 6.- Leer la prueba a las 48 horas así como los parámetros fisicoquímicos.

³⁸ Norma Mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI. Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Artemia Franciscana* (Crustácea:anostraca).



G.- Medición de parámetros fisicoquímicos

pH. Siguiendo la metodología que propone la NMX-AA-008-SCFI-2000. Análisis de agua - determinación del pH - método de prueba. (ANEXO D).

Temperatura. Siguiendo la metodología que propone la NMX-AA-007-SCFI-2000. Análisis de agua - determinación de la temperatura en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba (ANEXO E).

H.- Pruebas complementarias

La artemia es un organismo que se alimenta de bacterias y de materia orgánica: para determinar la presencia de ambas se realizó una DQO y una DBO en la muestra LE 1 (ANEXO C), así como una cuenta de heterótrofos (ANEXO B).



Tabla 3. Condiciones de trabajo para el tóxico de referencia.

Características	Observaciones
✓ Tipo de prueba	Estática, sin renovación de la disolución de prueba
✓ Duración	48 horas
✓ Intensidad luminosa	600- 1000 luxes
✓ Fotoperiodo	16 horas luz/ 8 horas oscuridad
✓ temperatura	27°C ± 0.2 °C
✓ salinidad	30 ‰
✓ pH	8.0 ± 0.2
✓ aireación	No
✓ alimentación	No
✓ recipientes de prueba	Tubos de ensaye
✓ volumen de prueba	5 mL / tubo
✓ No. De concentraciones (mg/mL)	5
✓ No. De replicas	3 / concentración
✓ No. De repeticiones	2/ concentración
✓ Medio de dilución	Agua marina artificial "Instan Ocean" al 30 ‰
✓ No. De organismos por replica	10
✓ Edad de los organismos	Nauplios en estadio I
✓ Respuesta evaluada	mortandad



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

En la Tabla 4 se presentan los resultados informados en % de la FPS que se obtuvieron en la evaluación de la toxicidad aguda de fluidos y recortes de perforación ajustando el pH de la mezcla (1:9) una vez agitada a 8.0 ± 0.2 unidades, con su respectivo análisis estadístico; así como los resultados de las muestras sin modificación de pH (9.0 ± 0.2 unidades).

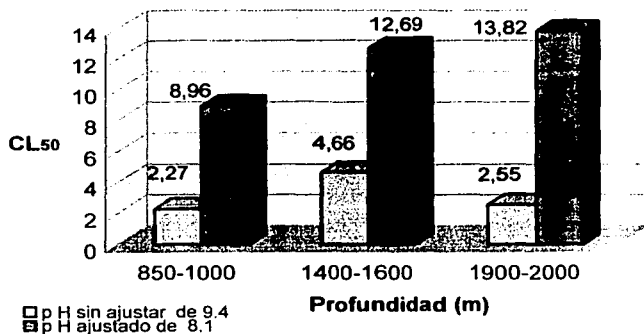
Se presentan las gráficas comparativas de las muestras a las que se le modificó el pH y las originales. Se realizan las comparaciones entre los sistemas de entrada a diferentes profundidades, los sistemas evaluados de salida y los recortes. La CL_{50} esta reportada en % de la FPS. Se realizaron la graficas con el promedio obtenido de las tres repeticiones realizadas.

Para realizar una comparación entre muestras con una variable modificada entre ellas, se aplicó un análisis de varianza de un factor, proponiendo hipótesis nulas para determinar si la variable pH modifica indirectamente la respuesta del organismo (Tabla 5). Existen muestras que no poseen un análisis estadístico debido a que su CL_{50} se encuentra por encima del 100 % de la FPS, el programa empleado Probit, no determina dicho valor.

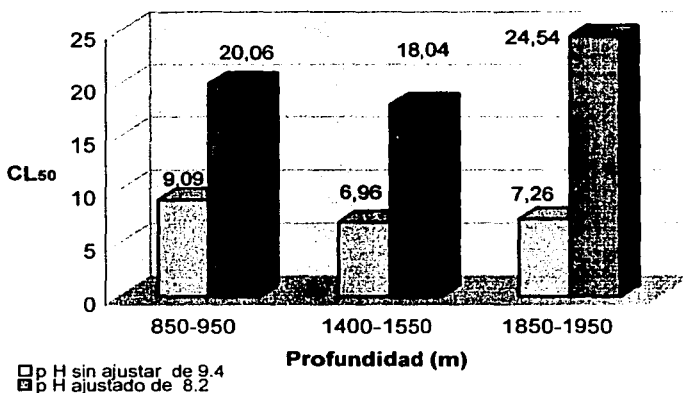


Tabla 4. Resultados promedio de (CL₅₀), desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos de la prueba con *Artemia franciscana* de los fluidos de perforación y recortes.

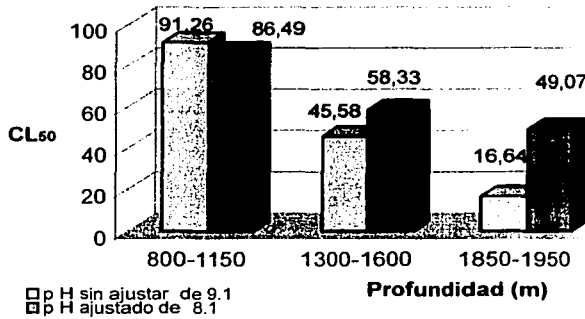
muestra	pH sin ajustar			pH ajustado		
	CL ₅₀ (%)	σ -1	C.V (%)	CL ₅₀ (%)	σ -1	C.V (%)
LE1	2.27	0.9521	41.8	8.96	0.2874	3.20
LS2	9.09	2.3055	25.34	20.06	0.9914	4.94
LE3	4.66	0.8139	17.45	12.69	2.4742	19.49
LS4	6.96	0.4318	6.19	18.04	1.1053	6.12
LE5	2.55	0.3401	13.32	13.82	1.1230	8.12
LS6	7.26	0.7657	10.54	24.54	3.0195	12.30
TE1	91.26	2.7838	3.00	86.49	2.4400	2.82
TE2	45.58	3.2550	7.10	58.33	1.8200	3.13
TE3	16.64	2.7861	16.74	49.07	1.6110	3.28
TS4	Mayor a 100	-	-	Mayor a 100	-	-
TS5	49.36	3.7000	7.51	51.03	3.6114	7.07
TS6	19.70	3.9000	19.80	47.68	0.9291	1.94
R1	98.02	3.9272	4.00	Mayor a 100		
R2	55.20	8.5200	15.44	48.33	2.7528	5.69
R3	22.22	5.9572	26.80	49.01	6.7744	13.82



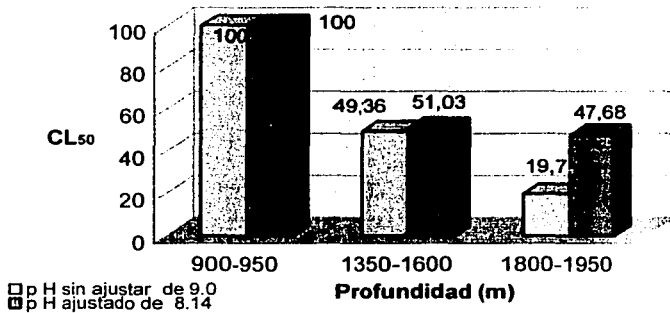
Gráfica 1. Comparación de los resultados de CL₅₀ entre las muestras de los FBAI de entrada con pH ajustado y sin ajustar a diferentes profundidades.



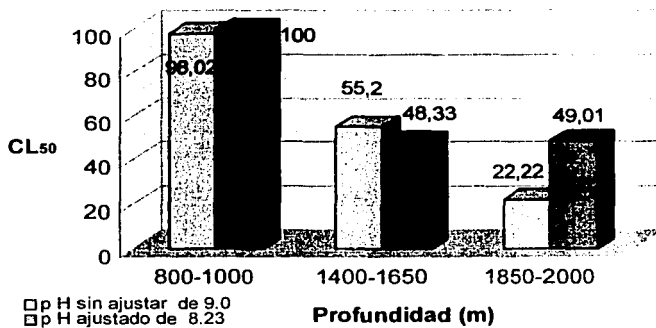
Gráfica 2. Comparación de los resultados de CL₅₀ entre las muestras de los FBAI de salida con pH ajustado y sin ajustar a diferentes profundidades.



Gráfica 3. Comparación de los resultados de CL₅₀ entre las muestras de entrada del equipo de control de sólidos con pH ajustado y sin ajustar a diferentes profundidades.



Gráfica 4. Comparación de los resultados de CL₅₀ entre las muestras de salida del equipo de control de sólidos con pH ajustado y sin ajustar a diferentes profundidades.



Gráfica 5. Comparación de los resultados de CL₅₀ entre las muestras de recortes con pH ajustado y sin ajustar a diferentes profundidades.



Tabla 5. Resultado del análisis de varianza (ANOVA) de un criterio, comparando resultados de Cl₅₀ de muestras de fluidos de perforación y recortes con pH ajustado vs pH sin ajustar.

muestra	F teo. 0.05	F exp.	ANOVA
LE1	7.71	135.78	Hay diferencia significativa
LS2	7.71	57.32	Hay diferencia significativa
LE3	7.71	28.514	Hay diferencia significativa
LS4	7.71	261.57	Hay diferencia significativa
LE5	7.71	276.79	Hay diferencia significativa
LS6	7.71	92.31	Hay diferencia significativa
TE1	7.71	3.53	No hay diferencia significativa
TE2	7.71	20.28	Hay diferencia significativa
TE3	7.71	304.61	Hay diferencia significativa
TS4	7.71	-	Sin estadístico
TS5	7.71	0.31	No hay diferencia significativa
TS6	7.71	146.12	Hay diferencia significativa
R1	7.71	-	Sin estadístico
R2	7.71	1.76	No Hay diferencia significativa
R3	7.71	26.45	Hay diferencia significativa



Tabla 6. Resultados obtenidos de la variación de pH en el agua marina al 30 %.

Agua marina al 30 % con pH de:	Respuesta del organismo
10	Mortandad del 70 %
9	Sobrevivieron 100%
8.5	Sobrevivieron 100%
7	Sobrevivieron 100%
6	Sobrevivieron 100%

De las pruebas complementarias en la cuenta de heterótrofos en la muestra LE 1 se

obtuvo lo siguiente:

pH sin ajustar (UFC)		
concentración	Agar nutritivo	TSA
0.1%	621	413
10%	185	188

Toma de muestra al inicio de la prueba. Lectura a las 48 horas

pH ajustado (UFC)		
concentración	Agar nutritivo	TSA
1%	78	66
20%	130	77

Toma de muestra al inicio de la prueba. Lectura a las 24 horas

pH sin ajustar (UFC)		
concentración	Agar nutritivo	TSA
0.1%	980	500
10%	800	448

Toma de muestra al final de la prueba. Lectura a las 48 horas

pH ajustado (UFC)		
concentración	Agar nutritivo	TSA
1%	600	876
20%	660	872

Toma de muestra al final de la prueba. Lectura a las 48 horas

Las pruebas de DQO Y DBO se realizaron en el laboratorio de Control Analítico de la Facultad de Química de la UNAM, en las cuales se obtuvo lo siguiente:

DQO (NMX-AA-030-SCFI-2001) = 1,589 mg/L

DBO (ISO 5815-1989) = No detectable. Materia orgánica no biodegradable por los microorganismos.



Los resultados con el tóxico de referencia coinciden dentro del intervalo proporcionado por la NMX-AA-110-1995-SCFI la cual informa un valor de CL_{50} de 16 mg/ml. \pm 0.2 mg/mL. Esta prueba se realizó una vez por mes, siendo un total de 4 pruebas. En la Tabla 7 se presentan los resultados de CL_{50} obtenidos en los 4 bioensayos realizados en el presente trabajo. El análisis estadístico se realizó con una prueba de hipótesis referente a la media (X_{CR}), usando la distribución normal al 5%.

Tabla 7. Resultados de CL_{50} del tóxico de referencia.

PRUEBA No.	CL_{50} (mg/mL)
1	12.3
2	15.8
3	17.2
4	16.1

Promedio = 15.33 mg/mL

C.V = 13.81%

$\sigma-1$ = 2.1205

X_{CR} = 15.33 \pm 2.0780

El valor de la prueba uno sale del límite aceptado.

4.2 Discusión

Los lodos de perforación (FBAI) presentaron una densidad en promedio de 1.60 g/mL. además metales pesados como cobre, cromo, cadmio, plomo, níquel, fierro, zinc y bario (datos proporcionados por absorción atómica). El pH que presentaron las muestras sin ningún tipo



de tratamiento fue de 12.34 ± 0.08 unidades y una salinidad de 22.0 mg/L. para el LS 2. hasta de 70.9 mg/L. para el LS 6, es decir que la salinidad incrementó con la profundidad del pozo.

Las muestras del equipo de control de sólidos (ECS) presentaron un valor promedio de pH de 9.35 ± 0.09 unidades y una salinidad de 20.6 mg/L. hasta 32.5 mg/L.

Las muestras en la fase de partículas suspendidas (FPS) sin ajustar el pH registraron dicho parámetro para el caso de los lodos de entrada y salida un promedio de 9.30 ± 0.3 con una salinidad mayor de 30 mg/L pero menor de 40 mg/L.

Las muestras del fluido proveniente del ECS recuperadas mostraron un valor promedio de pH en la FPS de 8.9 ± 0.2 unidades y una salinidad de $30 \text{ mg/L} \pm 0.1$. Las muestras de recortes presentaron un valor promedio de pH de 9.0 ± 0.1 y una salinidad de $30 \text{ mg/L} \pm 0.1$.

Para el caso de las muestras con pH ajustado, se determinó el parámetro fisicoquímico al agua marina al 30 % la cual tenía un pH de 8.0 ± 0.2 en promedio; la muestra se ajustó inmediatamente después de agitarla, se aproximó a dicho valor con una disolución de ácido clorhídrico 6N, se observó un cambio de color de la muestra de café claro a oscuro.

Los resultados de CL_{50} mostraron en general que las muestras de lodos fueron los más tóxicos, ya que los valores de CL_{50} fueron de los más pequeños; las muestras de fluido provenientes del ECS y de recortes presentaron un valor de CL_{50} mayor en general, indicando



con ello una menor toxicidad con respecto a los lodos. En estos dos últimos sistemas los valores de CL_{50} varían entre sí y es difícil determinar cuál sistema es más tóxico entre sí (Tabla 4 y 9).

Los lodos de entrada presentaron una mayor toxicidad que los de salida, es decir, el lodo se volvió más tóxico conforme fue entrando. En su recorrido dentro del pozo se le incorporaron sólidos (rocas), y los aditivos se fueron quedando en las paredes del pozo, por esta razón cuando el fluido salió presentó una menor toxicidad; se presentó un comportamiento semejante en las muestras de pH ajustado y sin ajustar (Gráficas 1 y 2).

El equipo de control de sólidos centrifuga el lodo de perforación que ya recorrió el pozo petrolero, y elimina los sólidos que se fueron agregando durante la operación de perforación. Las muestras provenientes de este equipo presentaron una mayor toxicidad a mayor profundidad tanto de la entrada como de la salida; este comportamiento fue semejante entre las muestras de pH ajustado y sin ajustar (Gráficas 3 y 4).

Los muestras de recortes tuvieron una CL_{50} con una tendencia de aumento de toxicidad al aumentar la profundidad (Gráfica 5). Cabe mencionar que las muestras de recortes están compuestas en su mayoría por trozos de roca provenientes de la formación geológica.

No hubo una diferencia de valores de CL_{50} entre las muestras del ECS y de los recortes que indicara cuál sistema fue más tóxico; sin embargo, las muestras de recortes tenían poca



cantidad de fluido impregnada en las rocas con respecto a las muestras del ECS que eran completamente líquidas.

Tabla 8. Clasificación de grados de toxicidad.

No tóxico	> 10, 000 ppm
Ligeramente tóxico	1,000 – 10,000
Moderadamente tóxico	100 – 1 000
Tóxico	1 – 100
Muy tóxico	< 1

Tomado de: IMCO/FAO/UNESCO/WMO, 1969; M. Jones y M. Hulsc. 1982

Es importante recordar que en el bioensayo se trabajó con la FPS. Inicialmente se empleó una proporción de 1 parte de muestra y 9 partes de agua marina al 30 %, para obtener las tres fases de un lodo (Fig. 6) y, posteriormente, preparar las concentraciones convenidas. Los cálculos de CL_{50} se deben ajustar para todo el lodo y no sólo para la FPS. Los valores de CL_{50} se multiplican por 0.1 para obtener el 100% del valor de la muestra: como se requiere obtener la concentración en ppm es necesario hacer el cálculo con la relación de 1 000 000 de ppm que corresponde a un 100% de la muestra ³⁹(Tabla 9).

³⁹ API. *Standart procedure for drilling fluid bioassays RP13H*. Washington D.C. 1984, pp 1-27.



$X_1 = \text{Valor de obtenido } CL_{50} * 0.1$ (que corresponde al 10 % de la muestra)

100 % ——— 1 000 000 ppm

X_1 % ——— X_2 ppm

Donde:

X_1 = concentración de la muestra en correspondiente a 10 % del total de la mezcla (1:9)

X_2 = concentración real de toda la mezcla en ppm.

Revisando los valores propuestos de toxicidad en ppm (Tabla 8). Se observa que los lodos con pH sin ajustar son ligeramente tóxicos y las demás muestras del ECS y recortes incluyendo las de pH ajustado son no tóxicas:

Tabla 9. Resultados de CL₅₀ en ppm.

muestra	pH sin ajustar	pH ajustado
	CL ₅₀ (ppm)	CL ₅₀ (ppm)
LE1	2270	8960
LS2	9090	20060
LE3	4660	12690
LS4	6960	18040
LE5	2550	13820
LS6	7260	24540
TE1	91260	86490
TE2	45580	58330
TE3	16640	49070
TS4	Mayor a 100000	Mayor a 100000
TS5	49360	51030
TS6	19700	47680
R1	98020	Mayor a 100000
R2	55200	48330
R3	22220	49010

De acuerdo con las observaciones realizadas al microscopio "Iroscope" modelo MG-IIT, se encontró que la artemia expuesta a la muestra TS 4 presentó una franja de color negro en el tórax (Fig. 7). Así mismo, se observó que el tamaño y la movilidad adquirida fue superior al de los controles.



Fig 7. Ejemplo de *Artemia franciscana* control (izquierda). Ejemplo de *Artemia franciscana* expuesta a la muestra TS4 (derecha). Fotografía a 40 aumentos.

En este caso la variable modificada en las muestras fue el pH; de acuerdo al análisis estadístico en el cual se empleó una ANOVA de un factor; se comparó la misma muestra con la variable modificada, se encontró que la mayoría de las muestras presentaron diferencia significativa entre sí, es decir que el pH tiene un efecto indirecto en la respuesta evaluada de los organismos (Tabla 5). Los fluidos de perforación están compuestos por diferentes materiales y aditivos que incluyen sólidos suspendidos, compuestos alcalinos, bactericidas, polímeros orgánicos, viscosificantes, densificantes, floculantes, dispersantes, lubricantes y surfactantes, entre otros.⁴⁰ Es evidente que la muestra se modificó químicamente al adicionar una fuente rica en iones H^+ y, que pudieron formarse complejos y/o precipitados, al entrar en contacto con los metales pesados y aditivos que se encuentran en las muestras, los cuales podrían causar la mortandad del organismo de prueba. Para corroborar que el pH por sí

⁴⁰ Smith, D. y Capuzzo, M. *Wastes in the ocean*. Vol. 4, Chapter 10. Environmental Science and technology. 1985. pp 289-302.



mismo no era la causa de muerte, se realizó una prueba ajustando agua marina a pH de 10, 9, 8.5, 7 y 6 empleando ácido clorhídrico 6 N e hidróxido de sodio 6 N, respectivamente. El resultado observado fue que a pH de 9, 8.5, 7, 6 sobrevivió más de la mitad de la población expuesta, pero a pH 10 se registró una mortandad superior al 50.% (Tabla 6). Esta concentración de H⁺ es desestimable ya que las muestras que interesan en este trabajo no tenían un pH de 10 unidades.

La metodología de la Agencia Americana de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés), Pt. 435, Subpt. A., para la evaluación de fluidos de perforación empleando como organismo de prueba a *Mysidopsis bahia* hace la recomendación de ajuste de pH en caso de que la muestra exceda de 9 unidades; en este caso se conoció el valor de pH del agua marina que se empleó como medio de dilución; una vez que se agitó la muestra se ajustó aproximadamente al pH del agua marina (8.0 ± 0.2) con HCl 6N. La norma mexicana NMX-AA-110-1995-SCFI, para análisis de agua-evaluación de toxicidad aguda con *Artemia franciscana* Kellog, está basada en la norma EPA, citada anteriormente, sólo que esta no hace la recomendación para pH. Sin embargo, este trabajo muestra como la variable de pH perturbó la respuesta de los organismos de prueba expuestos a muestras con composición química tan compleja como los fluidos de perforación.



Se realizaron pruebas complementarias ya que la *Artemia franciscana* se alimenta de materia orgánica y de bacterias. Para ello se efectuó un ensayo de toxicidad aguda con la muestra LE 1 a la cual se le realizó una cuenta de heterótrofos por el método de placa fluida (ANEXO B).

La muestra con un pH modificado presentó un mayor número de microorganismos en las concentraciones más altas y menor cantidad de UFC en la concentración menor. La muestra a la que no se le modificó el pH mostró mayor número de UFC en las concentraciones menores.

Otras prueba complementaria para determinar materia orgánica biodegradable fueron la de demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (ANEXO C), obteniéndose para la primera un resultado de 1,589 mg/L basándose la metodología en la NMX-AA-030-SCFI-2001 y una DBO no detectable empleando la metodología de la ISO 5815-1989. El resultado de la prueba de DQO, demostró la presencia de materia orgánica e inorgánica presente en la muestra. La prueba de DBO da un resultado en donde no detecta materia orgánica biodegradable por los microorganismos.



CONCLUSIONES

- Como resultado de la evaluación experimental de toxicidad empleando *Artemia franciscana*, se encontró que las muestras evaluadas a pH de 8 ± 0.2 unidades, no son tóxicas.
- Las muestras evaluadas del ECS y recortes a pH de 9 ± 0.2 son no tóxicas.
- El sistema de lodo FBAI con pH sin ajustar (9 ± 0.2), resulto ser ligeramente tóxico para *Artemia franciscana*.
- De acuerdo a resultados obtenidos de CL_{50} , las muestras de fluido (FBAI) son más tóxicas que las muestras provenientes del tornado (ECS) y de los recortes
- El pH es una variable que modifica la composición química de las muestras evaluadas, estas muestras poseen una composición química muy compleja y dicha modificación repercute en la respuesta del organismo.
- El estudio de la *Artemia franciscana* abre una perspectiva importante al proponerla como organismo de prueba en la evaluación toxicológica de los fluidos de perforación.



Comentario final:

Los experimentos realizados en este trabajo, constituyen una metodología para la evaluación de la toxicidad de muestras provenientes del sector petrolero mexicano. Es importante señalar que el control de las variables tales como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH son fundamentales para obtener resultados reproducibles y confiables en estos bioensayos ya que su control no perjudica la respuesta del organismo. Un factor de crucial importancia es la obtención de una muestra representativa previa homogeneización de la misma, lo cual en particular para las muestras trabajadas en la presente tesis, no resulta sencillo debido a que contienen aditivos muy densos como la barita la cual posee un valor de densidad de 4.23 g/cm³ y tiende a asentarse si no se agita correctamente.



GLOSARIO

Aditivo: Es un material que se agrega al fluido de perforación, para modificar determinadas propiedades.

Colonia: Desarrollo que es observable macroscópicamente de microorganismos en un medio de cultivo sólido.

Demanda bioquímica de oxígeno: Se refiere al oxígeno molecular consumido por los microorganismos aerobios, durante la degradación de materia orgánica. Es una medida indirecta de cantidad de materia orgánica.

Enjarre: Capa de sólidos del lodo que se forma en la pared del agujero cuando el líquido del lodo se filtra en la formación.

Fluido de perforación: Conocido también como lodo el cual circula a través de pozo durante la perforación rotatoria. Es una mezcla compleja que cumple con diversas funciones importantes.

Gelatinosidad: Medida de la habilidad de una dispersión coloidal para desarrollar y mantener la forma de gel, basada en el esfuerzo cortante. El esfuerzo de gel de un lodo determina su habilidad para mantener sólidos en suspensión.

Petróleo: Nombre genérico para hidrocarburos, incluye petróleo rudo y gas natural.

Pozo: Agujero perforado en la roca desde la superficie de un yacimiento a efecto de explorar o para extraer aceite o gas.

Viscosidad: Medición de la resistencia de un fluido a fluir. La resistencia es ocasionada por la fricción interna que resulta de los efectos combinados de cohesión y adhesión.



ANEXOS



ANEXO A

DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO DE PRUEBA: *Artemia franciscana*.

A continuación se describe el organismo de prueba seleccionado para la evaluación de la toxicidad de las muestras de fluidos y recortes de perforación.

Clasificación sistemática:

Phylum:	Artropoda	
Clase:	Crustacea	(Pennat, 1777).
Subclase:	Branquiopoda	(Latreille, 1817).
Orden:	Anostraca	(Sars, 1817).
Familia:	Artemiidae	(Grohowski, 1896).
Género:	Artemia	(Leach, 1819).

Se conocen 6 especies de cepas bisexuales:

Artemia salina: Lymington, Inglaterra.

Artemia tunisiana: Europa.

Artemia franciscana: América (norte, centro y sur).

Artemia persimalis: Argentina.

Artemia urmiana: Irán.

Artemia monica: Mono Lake, E.U.A.



Morfología

La artemia es un crustáceo planctónico el cual posee 42 cromosomas; presenta dimorfismo sexual. Generalmente su hábitat es en aguas hipersalinas cuya concentración varía de 50 % hasta 150 %. Es una especie originaria del continente americano.⁴¹

Los quistes de forma bicóncavos se hidratan una vez colocados en agua de mar y toman la forma esférica, el embrión recobra su metabolismo reversible el cual se encontraba interrumpido. Pasadas 24 horas la membrana externa del quiste se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión; en las siguientes horas el embrión abandona la cáscara del quiste.⁴² El nauplio se desarrolla dentro de la membrana de eclosión, sus apéndices comienzan a moverse y después de un periodo de tiempo, la membrana de eclosión se rasga y el nauplio queda libre.

Estadios

El nauplio es la primera etapa de desarrollo del crustáceo que es conocido como el estado 1 (Fig. A-1), mide entre 400 y 500 micras de longitud, recién nacido presenta una forma ovoide y presenta un color pardo anaranjado por la acumulación de reservas vitelinas.⁴³

⁴¹ Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P. *Manual para el cultivo y uso de Artemia en Acuicultura*. Universidad del Estado en Gent, Bélgica. 1986, pp 1-98.

⁴² *Idem*.41.

⁴³ *Idem*.41.



Su cuerpo presenta tres segmentos cefálicos y una región post mandibular no segmentada. En el primer segmento cefálico se encuentran el par de antenas conocidas como anténulas las cuales tienen una función sensorial, colocadas una a cada lado del ojo naupliar; en el segundo segmento cefálico se localizan el segundo par de antenas que funcionan como un sistema de locomoción y filtración; el tercer segmento posee las mandíbulas que le sirven para tomar alimento. Presenta un ojo naupliar de color rojo el cual se encuentra situado en la cabeza entre el primer par de antenas. En este primer estado no se alimenta ya que su aparato digestivo no es funcional, la boca y el ano aun permanecen cerrados, y sobrevive gracias a sus reservas originales de lípidos. En ocho días se convierte en adulto. El nauplio sobrevive hasta la madurez con el rango de 20°C a 28°C y de 100 mg/L a 170 mg/L de salinidad.⁴⁴



Fig. A-1. *Artemia franciscana* naupliar. 6 horas de nacida (Laboratorio de microbiología de la UNAM).

⁴⁴ Browne, R.A. y Wanigasekera, G. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1999, 244 (2000). 29-43.



El segundo estadio comienza después de 24 horas; en este estadio el crustáceo es capaz de alimentarse con microalgas y bacterias que miden aproximadamente 1 a 40 micras; estas son filtradas por el segundo par de antenas pasando el alimento hacia el aparato digestivo que ya es funcional.⁴⁵ (Fig. A-2).



Fig. A-2. *Artemia franciscana* adulto. 48 horas de nacida
(Fotografía a 40 aumentos)

⁴⁵ Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P. *Manual para el cultivo y uso de Artemia en Acuicultura*. Universidad del Estado en Gent, Bélgica. 1986, pp 1-98.



Morfología de los quistes

Se compone de tres capas:

A: el corion que es una capa dura de lipoproteínas con quitina y hematina que es el producto de la descomposición de la hemoglobina.⁴⁶ Esta última le proporciona el color a la cáscara. La función del corion es la de proporcionar protección al embrión contra rupturas mecánicas y radiaciones UV. Esta capa es propensa de oxidación por el hipoclorito.

B: membrana cuticular externa que protege al embrión de la penetración de moléculas mayores al CO₂. Es una barrera de permeabilidad.

C: cutícula embrionaria es una capa transparente y muy elástica.

El embrión es una gástrula en estado metabólico latente reversible por poseer un nivel de agua menor al 10%, pero es altamente higroscópico, una vez hidratado su metabolismo se activa (Fig. A-3).

Cuando los quistes bicóncavos se incuban con agua de mar y toman la forma esférica en un período de 1 a 2 horas. Transcurridas 15 a 20 horas la cáscara del quiste estalla y aparece el prenauplio rodeado por la membrana de eclosión. El embrión deja la cáscara vacía hasta que la membrana de eclosión se rompe y deja libre al nauplio.

⁴⁶ *Idem.*45.

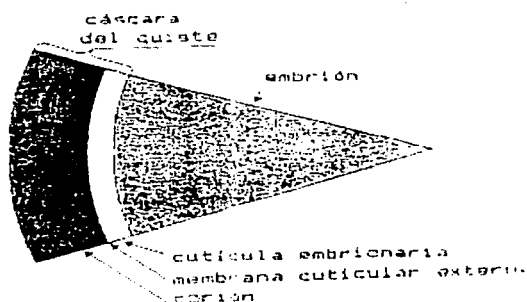


Fig. A-3. Morfología del corion.⁴⁷

Metabolismo de los quistes

El quiste es el que conserva la mayor cantidad de energía potencial, la cual el embrión gasta al continuar su desarrollo y al eclosionar el nauplio.⁴⁸ Los quistes son higroscópicos, una vez hidratados se inicia su metabolismo reversible, además requieren de la luz para que ocurra el metabolismo activo. El metabolismo en presencia de oxígeno transforma la trealasa (carbohidrato de reserva) en glicógeno (fuente de energía) y en glicerol; los cuales son acumulados por el embrión a través de la membrana externa. Si aumenta el glicerol, que es higroscópico, aumenta la cantidad de agua dentro del embrión y como consecuencia aumenta

⁴⁷ *Idem.*46.

⁴⁸ Castro, B.T. y Gallardo, R.C. Importancia del tamaño de los quistes descapsulados y de nauplios de *Artemia franciscana* (Texcoco) para la alimentación de organismos acuáticos. *Revista de Investigaciones Marinas* 1997, 18 (2), 150-154.



la presión osmótica en el interior de la membrana externa ocasionando la ruptura de tal membrana y de la cáscara del quiste, de esta manera se libera glicerol al medio de eclosión.⁴⁹ Si la ruptura se realiza en un medio con abundantes sales, se requieren mayores cantidades de glicerol para generar una presión osmótica que rompa la cáscara.

Ecología

Las población mundial de artemia se encuentra distribuida en más de 300 lagos salinos naturales los cuales poseen una diferencia en cuanto a su composición química, composición de especies y productividad.⁵⁰ Algunas cepas se han adaptado a temperaturas que van desde los 6° C hasta 35°C y con una composición iónica del biotopo como cloruros, sulfatos, y carbonatos.⁵¹ Las poblaciones se encuentran localizadas en biotopos aislados de climas templados y tropicales; es por ello que las características ecológicas, físicas y químicas del hábitat pueden diferir ampliamente.⁵² No posee ningún mecanismo de defensa contra los predadores lo que las hace presa fácil de peces, crustáceos o insectos; sin embargo la artemia posee un sistema osmorregulatorio muy eficiente; son capaces de sintetizar pigmentos respiratorios (hemoglobina) de esta manera resiste a ambientes con un bajo nivel de oxígeno disuelto característico de lugares hipersalinos.

⁴⁹ Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P. *Manual para el cultivo y uso de Artemia en Acuicultura*. Universidad del Estado en Gent, Bélgica. 1986, pp 1-98.

⁵⁰ Browne, R.A. y Wanigasekera, G. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1999, 244 (2000), 29-43.

⁵¹ Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P. *Manual para el cultivo y uso de Artemia en Acuicultura*. Universidad del Estado en Gent, Bélgica. 1986, pp 1-98.

⁵² Correa, S. y Buclé, R. Morfología y biometría de cinco poblaciones de *Artemia franciscana*. *Revista De Biología Tropical* 1993, 41 (1), 103-110.



La temperatura y la salinidad son factores físicos muy importantes en la vida marina y ambos factores poseen una correlación entre sí. La temperatura puede modificar el efecto de la salinidad cambiando el rango de tolerancia a la salinidad del organismo.⁵³

Tiene la facilidad de producir quistes en fase de latencia cuando las condiciones ambientales ponen en peligro la supervivencia de la especie. Muere a salinidades próximas a la saturación en NaCl (266 g/L) ocasionando un estrés fisiológico por cambios iónicos extremos.

La artemia es un organismo filtrador no selectivo alimentándose de materia orgánica y de organismos vivos como microalgas y bacterias.

⁵³ Browne, R.A. y Wanigasekera, G. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1999**, 244 (2000), 29-43.



ANEXO B

CUENTA DE HETERÓTROFOS: Método de placa fluida

Preparación del medio de cultivo

Los medios a emplear son agar nutritivo y agar cuenta estándar para microorganismos heterótrofos. Preparar el medio de cultivo poniendo agua destilada en un matraz a baño maria en el cual colocar la cantidad correspondiente de medio de cultivo. Tapar el matraz para evitar pérdida de agua; calentar y agitar hasta disolver para impedir que el agar se quemé. Dejar de suministrar calor hasta tener una disolución transparente. Antes de que comience a cuajar el agar, verter aproximadamente 9mL en tubos de ensaye, taparlos con una torunda para que sean sometidos a esterilizar en autoclave a 15 libras de presión y temperatura entre 120 a 121 °C durante 15 minutos.

Al término de la esterilización, aun líquido el agar (45 a 50 °C), junto a la flama del mechero destapar cada tubo de ensaye y vaciar el contenido en cajas petri estériles. Dejar enfriar durante 20 min. hasta que solidifique el medio y voltear las cajas para evitar que se forme agua de condensación en las tapas.⁵⁴

⁵⁴ APHA. AWA, WPCF. Standard Methods for examination of water and wastewater. Métodos Normalizados Para el análisis del agua y aguas residuales. 20ª ed. E.U.A. 1998, Capítulo 8.



Muestra.

Preparar la muestra siguiendo la metodología de la (Fig. 5). Una muestra con pH ajustado y otra sin ajustar. Tomar la concentración más baja y la concentración más alta de ambas muestras (10 %, 0.5 % y 20 %, 1 %; respectivamente). Realizar la prueba se por duplicado para cada concentración, dos controles con agua marina al 30 % y dos blancos para cada agar. De cada concentración tomar 1 mL de muestra con pipeta estéril cerca de un mechero. Tomar el inóculo al inicio de la prueba y al termino de la misma. Incuba las cajas a 36.5 °C por 48 horas dando lectura de los mismos inmediatamente.



ANEXO C

DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO)

Fundamento:

El método se basa en una oxidación energética de la materia orgánica e inorgánica oxidable, que se encuentra en el agua o en la muestra; en un medio fuertemente ácido, con una disolución valorada de dicromato de potasio. El exceso de agente oxidante después de un periodo de reflujó a 150°C durante 2 horas, se determina con una disolución valorada de sulfato ferroso amoniacal, en presencia de un complejo ferroso de ortofenantrolina (ferroína indicador) como indicador interno. El valor obtenido se introduce a una ecuación, cuyo desarrollo da como resultado la concentración en mg/L de materia oxidable químicamente:

$$DQO = \frac{V_1 - V_2 * M * 8\ 000}{V_3}$$

Donde:

- V₁ Es el volumen en mL de la disolución de sulfato ferroso amoniacal requerido para la valoración del testigo;
- V₂ es el volumen en mL de la disolución de sulfato ferroso amoniacal requerido para la valoración de la muestra;
- V₃ es el volumen en mL de la muestra, y
- M es la molaridad de la disolución de sulfato ferroso amoniacal utilizada en la determinación.



Nota: mediante esta prueba no es posible conocer el tipo de compuestos orgánicos presentes, ni diferenciar entre material biodegradable y sustancias tóxicas, por lo cual sólo constituye un análisis para la determinación del total de material presente.

DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGENO (DBO)

Fundamento:

Es una estimación de la cantidad de oxígeno que requiere una población microbiana heterogénea para oxidar la materia orgánica de una muestra de agua en un periodo de 5 días.

El método se basa en medir el oxígeno consumido por una población microbiana en condiciones en las que se ha inhibido los procesos fotosintéticos de producción de oxígeno en condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos.⁵⁵ Se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de cinco días de incubación a 20.

⁵⁵ Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001. Análisis de agua – Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO5) y residuales tratadas – método de prueba.



ANEXO D

DETERMINACIÓN DEL pH SIGUIENDO LA METODOLOGÍA DE LA NMX-AA-008-SCFI-2000.

Fundamento:

El método se fundamenta en la existencia de una diferencia de potencial entre las dos caras de una membrana de vidrio, expuestas a disoluciones acuosas que difieren en su valor de pH. La magnitud de esta diferencia de potencial es directamente proporcional a la diferencia de pH entre dichas disoluciones.

✓ Electrodo de vidrio para pH

Electrodo cuyo potencial depende del pH de la disolución en la que se sumerge, constituido por un tubo de vidrio de alta resistencia cuya extremidad es de vidrio especial en forma de bulbo o de cualquier otra forma apropiada, que contiene una disolución interna de pH invariable en la que se encuentra sumergido un electrodo interno de referencia.

✓ Agua destilada

✓ Ácido Clorhídrico concentrado (HCl)

✓ Disoluciones amortiguadoras comerciales de pH cercano a 4, 7 y 10. cuyo valor de pH se conozca con dos cifras decimales.



Conservación de los electrodos: Cuando no se utilizan, los electrodos deben conservarse en una disolución diluida de ácido clorhídrico 0,000 1 M (pH cercano de 4) o en una disolución preparada por adición de 1 mL de la disolución amortiguadora de hidrógenofalato de potasio a 100 mL de agua.

Medición de pH de las muestras

Retirar los electrodos de su disolución de conservación. Enjuagarlos completa y cuidadosamente con agua y secarlos con papel absorbente suave, sin tallar.

Sumergir los electrodos en la primera porción de disolución amortiguadora de pH. de ser posible, agitar suavemente, esperar entre 1 y 2 min. que se establezca la respuesta del dispositivo de determinación. Ajustar la lectura del aparato de medición con el botón de calibración hasta obtener el valor de pH asignado. Realizar lo mismo con las tres disoluciones amortiguadoras.

Enjuagar cuidadosamente los electrodos con agua. Transferir una porción de la disolución problema a un recipiente limpio de tamaño apropiado.

Sumergir los electrodos en una porción de la muestra problema durante 1 minuto para acondicionar el electrodo de vidrio; de ser posible, agitar suavemente. Retirar los electrodos de la disolución, secarlos con papel absorbente, sin enjuagarlos y sin tallar.

Los electrodos limpios se regresan a su disolución respectiva de conservación.



ANEXO E

DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA SIGUIENDO LA METODOLOGÍA QUE PROPONE LA NMX-AA-007-SCFI-2000.

Termómetro de vidrio con columna de mercurio

Termómetro que se basa en la dilatación del mercurio líquido para indicar la temperatura. Consta básicamente de un bulbo de vidrio que contiene el mercurio, soldado a un tubo capilar de vidrio de diámetro uniforme, graduado y sellado en su otra extremidad.

Siempre que sea posible se debe realizar la medición directamente en el cuerpo de agua. se debe tomar en un volumen suficiente de muestra tal que el instrumento quede debidamente inmerso, esperar el tiempo suficiente para obtener mediciones constantes. Enjuagar con agua destilada el instrumento de medición.

Las lecturas se obtienen directamente de la escala del aparato medidor de temperatura, y se informan en grados Centígrados ($^{\circ}\text{C}$), con aproximación a la décima de grado (0.1°C).

Sumergir el termómetro de mercurio para uso rutinario, en posición centrada en el recipiente, hasta la marca de inmersión parcial o hasta una graduación apropiada inmersión total. Esperar 1 minuto hasta que la lectura del termómetro se estabilice.