

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE UN FLUIDO DE EXPLORACIÓN *OFFSHORE* EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR *LYTECHINUS VARIEGATUS**

Sandra Milena Cerón Benavides¹, Marisol Santos-Acevedo¹, Ariel Emiro Gómez Cerón²,
Gloria Helena Ospina-Salazar¹, Marco Antonio Imués Figueroa² y Javier Gómez-León¹

1 Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar). Calle 25 No. 2-55 Playa Salguero, Santa Marta, Colombia. samil.benna@yahoo.es, marisol.santos@invemar.org.co, gloria.ospina@invemar.org.co, javier.gomez@invemar.org.co

2 Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Ciudad Universitaria Torobajo. Calle 18 Carrera 50, San Juan de Pasto, Nariño, Colombia. arielgomez609@hotmail.com, marcoi@udenar.edu.co

RESUMEN

En Colombia, la industria petrolera está interesada en realizar exploración de hidrocarburos *offshore*, actividad que ocasiona el vertimiento de sustancias perjudiciales en áreas marinas, por lo cual es fundamental conocer los efectos que pueden ocasionar sustancias producto de estas actividades, particularmente frente a organismos nativos de las zonas de influencia. Este trabajo propone un ensayo con un organismo autóctono del Caribe colombiano, que sirva como bioindicador de contaminación, para lo cual se evaluó la toxicidad aguda de un lodo de exploración *offshore* en base agua sobre la fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus*, utilizando como tóxico de referencia sulfato de cobre pentahidratado. Se estandarizó el protocolo de obtención de gametos y de fecundación, así como los ensayos con el tóxico de referencia y con el lodo, para determinar la toxicidad aguda dada en términos de concentración efectiva (CE₅₀). El porcentaje de fecundación para validar el ensayo debe ser mayor al 85% en el tratamiento control, el cual se obtuvo al fecundar 2000 ovocitos con 50 x 10⁶ espermatozoides y se contaron 200 ovocitos (10%) para determinar el porcentaje de fecundación en cada una de las réplicas. La CE₅₀ se determinó en 20.45 ± 1.90 mg.L⁻¹ para el tóxico de referencia y 3649 mg.L⁻¹ ± 400 mg.L⁻¹ correspondientes a la fase suspendida particulada del lodo la cual fue preparada a una relación lodo-agua de 1:9 (v/v). Los resultados muestran el alto grado de sensibilidad de los gametos de *L. variegatus* a la acción del lodo de perforación para exploración *offshore* de hidrocarburos, lo cual evidencia la sensibilidad del organismo de prueba ante estas sustancias y su potencial como bioindicador de contaminación.

PALABRAS CLAVES: Erizo de mar, fecundación, toxicidad aguda, sulfato de cobre pentahidratado, fluido de exploración *offshore*.

* Contribución No. 1150 del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (Invemar).



ABSTRACT

Acute toxicity assessment of an offshore exploration fluid for the fertilization sea urchin *Lytechinus variegatus*. In Colombia, oil industry is interested in developing offshore hydrocarbon exploration, activity that causes spills of harmful substances in marine areas. It is essential to understand the effects that those substances may cause in native organisms in the influence zones. This manuscript proposes an assay with an autochthonous organism from the Colombian Caribbean, that may be used as a bioindicator of contamination. The acute toxicity (CE_{50}) of a fluid used in offshore exploration was assessed on basis on the fecundity of the sea urchin *Lytechinus variegatus*, using as a standard toxic pentahydrated cooper sulfate. The protocol for obtaining the gametes and fecundation was previously standardized with the reference toxic which is used to guarantee and validate its results in terms of effective concentration (CE_{50}). The fecundation percentage should be greater than 85% in order to validate the assay in the control treatment, that was carried out by fecundating 2000 oocytes with 50×10^6 sperms. In each replicate 200 oocytes (10%) were counted in order to determine the percentage of fecundation. The obtained CE_{50} value of pentahydrate copper sulphate was $20.45 \pm 1.90 \text{ mg.L}^{-1}$ and $3649 \text{ mg.L}^{-1} \pm 400 \text{ mg.L}^{-1}$ corresponding to the suspended particulate phase of mud, which was prepared from a mud-water relationship of 1:9 (v/v). The results show a high sensitivity degree of the *L. variegatus* gametes to the action of the drilling mud of offshore hydrocarbon exploration, which shows the sensitivity of the test organism to these substances and its potential use as bioindicator of pollution.

KEYWORDS: Fertilization, acute toxicity, pentahydrate copper sulfate, offshore exploration fluid.

INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia económica de los recursos minerales, las entidades encargadas de la regulación y la industria petrolera están interesadas en conocer los efectos que pueden ocasionar sustancias derivadas de estas actividades en áreas marinas colombianas, particularmente frente a organismos nativos, por lo que se requiere estandarizar y validar bioensayos de toxicidad que permitan evaluar los efectos tóxicos de los productos de la exploración *offshore*, entre los que se encuentran los lodos de perforación, que son fluidos de composición variable, la gran mayoría artificiales y que se aplican de acuerdo con las condiciones especiales de los pozos (Dávila y Forero, 2011). Su manejo inadecuado puede ocasionar derrames al medio, afectando la vida y bienestar de muchas especies acuáticas.

Los ensayos ecotoxicológicos determinan el nivel de toxicidad evaluando la respuesta de los organismos al ser expuestos a una serie de diluciones del lodo, comparándolo con los resultados obtenidos frente a un tóxico de referencia con el cual se valora previamente la sensibilidad del organismo (Environment Canada, 2011). La repetitividad y reproducibilidad de los resultados se evidencia al elaborar una carta control con una serie de ensayos, primero con el tóxico de referencia y posteriormente con la sustancia a evaluar, la cual evidencia la sensibilidad y estabilidad de la respuesta del organismo a la sustancia, considerando unos límites establecidos por el coeficiente de desviación entre cada una de sus respuestas (Díaz-Báez *et al.*, 2004a).

La toxicidad de los lodos de perforación ha sido evaluada en diversos organismos acuáticos, entre ellos la trucha arcoíris, en cuyo ensayo determinaron que la mitad de los componentes del lodo evaluado son altamente tóxicos, presentándose una concentración letal (LE_{50}) < 1000 ppm (Ferrante, 1981). En Colombia también se ha evaluado la toxicidad aguda de seis lodos de perforación en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, demostrando que la concentración letal media (CL_{50}) a 96 h para lodos en base agua va entre 4224 ppm y 26635 ppm y entre 40781 ppm y 308248 ppm para los de base sintética (Contreras-León *et al.*, 2013).

Para el desarrollo de la actividad petrolera en Colombia la Resolución No. 1315 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS) indica que durante todo el proceso de exploración y perforación *offshore* hay que realizar ensayos según el programa de monitoreo de lodos y cortes de perforación, en el cual se deben presentar el laboratorio que elabora los ensayos y las especies a utilizar que, de acuerdo con la resolución, son misidáceos de la clase Malacostraca y erizos de mar de la especie *Lytechinus variegatus*. Estos ensayos no se realizan en ningún laboratorio del país, por lo cual se genera la necesidad de iniciar la evaluación y primeras aproximaciones a la estandarización de los ensayos de toxicidad con organismo nativos, en este caso con el erizo de mar, para tener resultados más cercanos a la realidad ecológica de los ecosistemas colombianos.

Lytechinus variegatus es una especie autóctona del Caribe colombiano, se caracteriza por ser de rápido crecimiento (Buitrago y Lodeiros-Seijo, 2005) y sus gametos evidencian una sensibilidad comprobada en la realización de bioensayos, siendo aceptados internacionalmente para ensayos toxicológicos (Böttger y McClintock, 2001). Actualmente se desconoce su comportamiento frente a agentes extraños y frente a cualquier actividad de intervención humana, por ejemplo frente a lodos de perforación utilizados por las empresas petroleras. La estandarización del ensayo de toxicidad para la fecundación del erizo de mar *L. variegatus* surge de la necesidad de poner a disposición de la industria y de las autoridades este tipo de ensayos para su posterior uso como indicadores que tengan utilidad en la toma de decisiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló durante nueve meses en el Laboratorio de Bioprospección Marina del Invermar (Labbiop), ubicado en Santa Marta (Colombia), el cual cuenta con un sistema de recirculación semicerrado de agua de mar, que permite manejar diferentes sistemas de cultivo de organismos de manera independiente y de acuerdo con los requerimientos de cada especie, cuyas variables fisicoquímicas se manejan de manera controlada y en el que se realizan bioensayos de mantenimiento y cultivo de organismos marinos (Ospina-Salazar *et al.*, 2011; Santos-Acevedo *et al.*, 2011). Los ejemplares de *L. variegatus* fueron recolectados mediante buceo a pulmón entre 2-2.5 m de profundidad en



la bahía de Chengue (11°19'00"N, 74°07'00"O) y trasladados al laboratorio en neveras con agua de mar del lugar y acondicionadas con divisiones de espuma para evitar su maltrato. A la llegada al Labbip se aclimataron agregando agua de mar del sistema a las neveras lentamente hasta igualar las condiciones, se ubicaron en canaletas de 500 L sin sustrato y se dio inicio al proceso de cuarentena, el cual consiste en mantener los organismos aislados del resto del sistema y con un seguimiento permanente de las condiciones fisicoquímicas, durante un período de cinco días. A partir del segundo día de cuarentena se empezaron a alimentar con algas colectadas del medio natural, que posteriormente se fueron combinando con alimento peletizado. Se registraron y controlaron los valores de temperatura (26 °C), salinidad (35), oxígeno disuelto (7.7 mg.L⁻¹) y pH (8.05) de manera diaria, realizando los recambios de agua que se requirieran y al finalizar el quinto día de cuarentena las canaletas fueron incorporadas al sistema de recirculación. Los erizos colectados y mantenidos en el Labbip fueron identificados siguiendo las claves taxonómicas publicadas por Álvarez-Larrauri (1978) y Borrero-Pérez *et al.* (2012) y confirmados por Giomar Helena Borrero-Pérez. Invemar. Santa Marta, Colombia. 2012. Com. Pers.

Lytechinus variegatus es una especie omnívora (Lawrence *et al.*, 2001; Gómez-Gaspar, 2003; García y Criales, 2005; Espinoza-G. *et al.*, 2008); los especímenes fueron alimentados *ad libitum* tres veces al día con *Gracilaria* sp., *Ulva lactuca* y peletizado (Buitrago y Lodeiros-Seijo, 2005). Los dos tipos de *pellet* utilizados fueron Ital Mojarra 24® y una mezcla con base en Ital Mojarra 24® preparada en el laboratorio, a la cual se le adicionó Cyclop-eeze® con el fin de aportar un mayor porcentaje de proteínas y lípidos; además se suministraron como alimentos complementarios espinaca entera y trozos de zanahoria, seleccionados por su contenido de carotenoides los cuales, de acuerdo con George *et al.* (2001) y Lawrence *et al.* (2002), contribuyen a la calidad de la gónada y producción de gametos.

La limpieza de las canaletas se realizó diariamente antes de la primera alimentación, consistiendo en extraer la materia orgánica y alimento no consumido y depositado en el fondo con una manguera. Además, los erizos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Inducción y obtención de gametos. Los gametos se obtuvieron inyectando cada erizo a través del peristoma 0.5 mL de KCl 0.5 M, sustancia utilizada como inductora en estudios con este tipo de organismos (Newmark *et al.*, 2005; Germendia *et al.*, 2009); una vez inyectado se ubicó cada erizo sostenido en el borde de un recipiente con agua de mar apoyado sobre su cara aboral y al cabo de uno a cinco minutos se empezó a obtener el material gonadal, que podía ser esperma de color blanco u ovocitos de color naranja. Una vez iniciado el desove, se ubicaban en un vaso de precipitado de 50 mL, limpio y seco para recolectar los gametos en seco (Guirao-Marin *et al.*, 2002; Newmark *et al.*, 2005) y posteriormente utilizar para cada tipo de gametos el material obtenido de tres machos y de tres hembras respectivamente (Environment Canadá, 1992).

Mantenimiento de gametos. Los gametos se mantuvieron dentro de sus respectivos vasos de precipitado de 50 mL y aunque Berdyshev (1999) recomienda refrigerar el espermatozoides, en el laboratorio no fue necesario, ya que el tiempo requerido para determinar la calidad gamética, el número de células.mL⁻¹ y la elaboración de las concentraciones gaméticas no fue mayor a 30 minutos, período en que el espermatozoides se mantuvo sobre el mesón del ensayo entre 26.5 y 27 °C (temperatura ambiente) e iniciando el ensayo inmediatamente después de este período.

Determinación de la calidad de los gametos. Se tomó una muestra de material gonádico para determinar su calidad observando sus características al microscopio; los ovocitos de buena calidad se caracterizaron por ser redondos y turgentes con los bordes claramente definidos y un diámetro cercano a 100 µm y el espermatozoides se observaba en su gran mayoría completo con su cabeza y cola y con gran movilidad (Germendia *et al.*, 2009).

Manejo de gametos para conteo y realización de diluciones. Una vez obtenido el espermatozoides, se preparó una dilución 1:500 adicionando 10 µL de espermatozoides en 4990 µL de ácido acético 1:2000, preparado a partir de una solución madre al 10% (Environment Canada, 2011); con este procedimiento los espermatozoides se fijan para poder realizar el conteo. La dilución se preparó en tubos Falcón para facilitar la homogenización, evitando la formación de espuma y la aglomeración de espermatozoides.

Los conteos de espermatozoides se realizaron en el cuadrante central de una cámara Neubauer tomando una alícuota (10 µL) de la dilución preparada y realizando el procedimiento con cuatro alícuotas para obtener a partir de estos valores un promedio y establecer la cantidad de espermatozoides por mililitro utilizando la fórmula de Cisneros-Prado (2011):

$$\frac{(\text{No. de espermatozoides})}{\text{mL}} = \text{No. de espermatozoides} * 50000 * \text{Factor de dilución}$$

Los ovocitos fueron recogidos en un vaso de precipitado de 50 mL y se llevaron a un volumen de 100, 150 o 200 mL adicionando agua de mar filtrada e irradiada con luz UV (AMF + UV) (Newmark *et al.*, 2005), lo anterior dependiendo de la cantidad de muestra. Con los ovocitos concentrados se elaboraron dos diluciones 1:10-1:100 en AMF + UV y se realizó el conteo en cámara Sedgewick-Rafter (Torres-Campaña *et al.*, 2009).

$$\frac{(\text{No. de ovocitos})}{\text{mL}} = \text{No. de ovocitos} * \text{Factor de dilución}$$

Concentraciones gaméticas. Para determinar la concentración de espermatozoides adecuada para obtener porcentajes de fecundación superiores a 85%, se evaluaron concentraciones *stock* entre 7 x 10⁴ y 100 x 10⁶ espermatozoides.



mL⁻¹ utilizando 2000 ovocitos.mL⁻¹ (Salas-Garza *et al.*, 2005; Aguirre-Martínez *et al.*, 2009). Las concentraciones de los gametos se prepararon adicionando el volumen calculado de gametos.mL⁻¹ al volumen de AMF + UV; para el caso del esperma en tubos Falcon de 10 mL y para los ovocitos en un vaso de precipitado de 200 mL. Se resalta que al adicionar AMF + UV para obtener las concentraciones establecidas se produce la activación del esperma, proceso que duró 30 minutos (Berdyshev, 1999). El cálculo usado para preparar las concentraciones fue el sugerido por Environment Canada (2011) cuya fórmula es:

$$C1*V1 = C2*V2$$

donde,

C1 = Concentración inicial de gametos.mL⁻¹

V1 = Volumen (mL) de gametos necesarios para obtener la concentración requerida

C2 = Concentración de gametos requerida

V2 = Volumen (mL) de gametos requeridos para el ensayo

Ensayo de fecundación. Se adicionaron en cajas de Petri de 55 mm de diámetro 5 mL de AMF + UV, seguidamente 100 µL de la concentración espermática correspondiente y se dejaron en reposo durante una hora, luego de lo cual se agregó un mililitro de ovocitos, se esperaron 20 minutos mientras se efectuaba la fecundación y se procedió a detener el proceso agregando siete gotas de formalina al 2% (modificado de Newmark *et al.*, 2005). Cada vez que se adicionaba esperma, ovocitos o formol a las cajas de Petri se homogenizaba la muestra con cinco movimientos suaves en forma de ocho. Terminado este proceso se determinó el porcentaje de fecundación realizando el conteo de 200 ovocitos en buen estado por cada unidad experimental, registrando si estaban o no fecundados y se calculó aplicando la fórmula de Reis y Cerqueira (2003).

$$\% \text{ de fecundación} = (\text{No. de ovocitos fecundados} / \text{No. de ovocitos totales}) * 100$$

Para establecer la concentración espermática se realizaron dos ensayos, el primero con cinco concentraciones espermáticas con intervalos que abarcaran un ámbito amplio establecido de acuerdo con la literatura consultada y el segundo derivado de los resultados del primero, con seis concentraciones más cercanas a los valores de fecundación requeridos para el ensayo; en cada ensayo se manejaron mínimo tres replicas por concentración.

Ensayos con tóxico de referencia y lodo. Para realizar estos ensayos se seleccionó como tóxico de referencia el sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sustancia que cumple con los requisitos descritos en la literatura como que tiene comprobada toxicidad aguda frente algunos organismos acuáticos (Scelzo, 1997), que es fácil de analizar químicamente, que es considerado un contaminante ambiental, que esta disponible en el mercado con pureza consistente, solubilidad y estabilidad en el agua (Alea-Reyes *et al.*, 2003) y que se encuentra dentro de los tóxicos de referencia recomendados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Espinosa-Ramírez *et al.*, 2004). Los ensayos con el tóxico de referencia se desarrollaron con concentraciones preparadas a partir de una solución madre de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fuentealba *et al.*, 2007).

Para el desarrollo de los ensayos con el lodo de perforación también fue necesario partir de una solución madre del lodo, la cual se preparó realizando un dilución del lodo original 1:9 (lodo: agua) (v/v), mezclando hasta lograr su homogenización, dejando decantar y tomando la fracción media que se obtiene al separarse la muestra (EPA, 2011), denominada fase suspendida particulada (FSP), la cual se toma como la solución madre que corresponde en partes por millón (ppm) a $1 \times 10^6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Brown y Salle, 1977); a partir de ella se prepararan las diluciones seriadas para la realización del *screening test* y de los ensayos. La concentración efectiva media (CE_{50}) del lodo original se obtuvo dividiendo la CE_{50} de la FSP entre 10 para corregir la dilución 1:9 (Jones *et al.*, 1986). De acuerdo con Ronco *et al.* (2004), la solución debe tener condiciones fisicoquímicas aptas para la vida marina, por lo que para este caso fue necesario ajustar la salinidad, la cual registraba valores superiores a 40 adicionando AMF + UV a la solución madre hasta llegar a 35; el pH estaba dentro del ámbito (entre 6 y 9) por lo que no fue necesario ajustarlo.

Las diluciones del sulfato de cobre y de la FSP se elaboraron a partir de la correspondiente solución madre con un factor de dilución de 0.5 (Díaz-Báez *et al.*, 2004b; Espinosa-Ramírez *et al.*, 2004); con base en los resultados obtenidos, buscando establecer valores escalonados entre los extremos, se realizaron ensayos adicionales con las concentraciones que producían porcentajes de fecundación por encima y por debajo de 50% y/o índices de fecundación (Y) por encima y por debajo de 0.5, hasta obtener por lo menos cinco concentraciones que obtuvieran índices de fecundación entre 0 y 1. En todos los ensayos con el tóxico de referencia se utilizaron cinco réplicas por cada concentración evaluada y un control negativo (AMF + UV) y para la FSP del lodo se utilizó además el valor medio del tóxico de referencia como control positivo ($20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$), en ambos casos se elaboraron las cartas control para determinar la estabilidad de la CE_{50} .

Para los experimentos con el tóxico de referencia y la FSP del lodo se siguió el mismo procedimiento del bioensayo de fecundación utilizado para determinar la concentración de esperma, solo que se reemplazaron 5 mL de AMF + UV por 5 mL de cada concentración de las sustancias de prueba y determinando en estos casos el índice de fecundación (Y). El valor mínimo registrado de oxígeno disuelto (7.8 mg.L^{-1}) nunca estuvo por debajo de lo establecido para la especie en el medio natural (Gómez-Gaspar, 2000), fue un ensayo estático sin recambio de agua y el tiempo de exposición entre la inclusión del esperma, la de los ovocitos y su fijación fue en todos los casos de sesenta minutos.

Diseño experimental y análisis estadístico. Una vez obtenidos los datos del ensayo de fecundación se realizó una transformación del porcentaje de fecundación a Y, la cual es una variable dependiente con la que se logró obtener valores de fecundación entre 0 y 1, que en este estudio se denominó índice de fecundación; este índice se requiere para obtener la CE_{50} mediante el análisis Probit. Posteriormente se realizó un análisis de datos atípicos e influyentes, con lo cual se pudo depurar la base de datos para asegurar la veracidad de los mismos. La fórmula con la que se llevó a cabo la transformación fue la siguiente (StatPoint Technologies, 2006):

$$(Y) = \text{Número de ovocitos fecundados} / \text{Número de ovocitos muestreados}$$

Las pruebas de concentración espermática se evaluaron mediante un diseño completamente al azar con submuestreo, con seis tratamientos: 62.5×10^6 , 12.5×10^7 , 25×10^7 , 5×10^8 , 1×10^9 y 12×10^8 espermatozoides. mL^{-1} respectivamente, para determinar cuál de ellas produce porcentajes de fecundación mayores a 85%. En todos los análisis estadísticos se asumió un $\alpha = 0.05$.

Con los resultados referentes al índice de fecundación se realizó un análisis de varianza para verificar la existencia de diferencias significativas entre ensayos y concentraciones y una prueba de comparación múltiple de Duncan con el fin de establecer las diferencias entre las medias del porcentaje de fecundación en cada concentración espermática. El ensayo para medir el efecto del tóxico de referencia y de la FSP sobre la fecundación del erizo de mar utilizó un diseño en bloques completos al azar con submuestreo, conformado por cuatro y tres bloques respectivamente, cuyos bloques estuvieron constituidos por los correspondientes ensayos y siete tratamientos representados por las diferentes concentraciones del tóxico o de la FSP del lodo, incluyendo los controles negativo y positivo de la investigación, cuya distribución se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de esperma utilizadas para evaluar el índice de fecundación de *Lytechinus variegatus* con sulfato de cobre como tóxico de referencia y un lodo en base agua para exploración offshore.

Tratamientos	Concentración stock del esperma (espermatozoides.mL ⁻¹)	Concentración CuSO ₄ ·5H ₂ O (mg.L ⁻¹)	Concentración lodo (%)
Control negativo		AMF + UV	AMF + UV
Control positivo		No aplica	20 mg.L ⁻¹ de CuSO ₄ ·5H ₂ O
T1	500 x 10 ⁶	10	0.01
T2		15	0.5
T3		20	0.6
T4		30	0.8
T5		40	1
T6		60	

Los datos correspondientes al índice de fecundación obtenido frente al tóxico de referencia fueron transformados mediante el modelo arcoseno (y), con los que se procedió a verificar los supuestos estadísticos de normalidad (pruebas de Chi-cuadrado, Shapiro-Wilk y asimetría), homocedasticidad (prueba de Cochran) e independencia (prueba de Durbin Watson), con lo cual se garantiza la confiabilidad de los análisis de varianza; posteriormente se realizó el estudio de datos atípicos e influyentes, para depurar la base de datos. Los datos correspondientes al índice de fecundación obtenido frente a la FSP del lodo solo requirieron una transformación del porcentaje de fecundación a Y, la cual también se aplicó al tóxico de referencia. Los datos de índice de fecundación obtenidos en las pruebas de toxicidad con el tóxico de referencia fueron ajustados mediante el modelo Spearman-Karber (Díaz-Báez *et al.*, 2004c) y para la FSP del lodo mediante el modelo Probit (EPA, 1994) para proceder a calcular la CE₅₀. Los datos se presentan como la media por tratamiento y la desviación estándar (ES) en el formato ± ES; las figuras muestran el error estándar de cada porcentaje o índice de fecundación y una línea punteada resaltando el valor de 0.85 u 85% según corresponda, de manera que se pueda apreciar el cumplimiento de este valor dentro del control negativo para cada uno de los ensayos realizados.

Variables evaluadas. Las variables evaluadas durante el transcurso de esta investigación fueron número de ovocitos fecundados y no fecundados, variables de las cuales se encontró el porcentaje de fecundación, índice de fecundación (Y) y la CE₅₀ del tóxico de referencia y de la FSP.

RESULTADOS

Determinación de la concentración de espermatozoides apta para obtener porcentajes de fecundación mayores a 85%

El primer ensayo se realizó con las concentraciones espermáticas que registra la literatura para otras especies de erizos de mar, estas fluctuaron entre 5×10^4 y 5×10^7 espermatozoides.mL⁻¹ y produjeron porcentajes menores a 20%. Por tal razón se establecieron nuevas concentraciones *stock*, entre 62.5×10^6 y 12×10^8 espermatozoides.mL⁻¹ con las cuales se evidenció un incremento en la fecundación llegando a obtener porcentajes superiores a 85% desde 12.5×10^7 espermatozoides.mL⁻¹ (Tabla 2). El porcentaje de fecundación a 62.5×10^6 espermatozoides.mL⁻¹, fue menor comparado con los demás tratamientos (12.5×10^7 a 12×10^8 espermatozoides.mL⁻¹) y estadísticamente fue el único que presentó diferencias significativas con respecto a los otros ($p = 0.04$).

Al analizar los resultados y teniendo en cuenta que a concentraciones iguales o superiores a 12.5×10^7 espermatozoides.mL⁻¹ se obtiene un porcentaje de fecundación superior a 85% sin efectos secundarios (polispermia), se eligió la concentración *stock* de 500×10^6 espermatozoides.mL⁻¹ para realizar cada uno de los ensayos, considerando que con esta concentración se observó la más baja variabilidad en el porcentaje de fecundación (Tabla 2). A esta concentración la relación ovocito:espermatozoide fue de 1:25000.

Tabla 2. Porcentajes de fecundación a diferentes concentraciones espermáticas. Los valores son expresados como el promedio de mínimo tres réplicas \pm el error estándar.

Ensayo	Concentración <i>stock</i> (espermatozoides.mL ⁻¹)	% de fecundación \pm error estándar
1	5×10^4	0.00 ± 0.00
	1×10^5	0.31 ± 0.19
	1×10^6	0.50 ± 0.20
	25×10^6	16.13 ± 2.57
	50×10^6	17.63 ± 5.32
2	62.5×10^5	69 ± 11.2
	12.5×10^6	90 ± 1.40
	25×10^7	89 ± 3.09
	50×10^7	92 ± 1.3
	1×10^9	89 ± 2.90
	12×10^8	89 ± 1.58

Concentración efectiva ($CE_{50-60 \text{ minutos}}$) de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ como tóxico de referencia en la fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus*

Una vez establecida la relación adecuada de gametos se procedió a realizar los ensayos con el tóxico de referencia hasta lograr su estandarización, para lo cual se realizaron 13 ensayos, el primero de ellos fue utilizando un factor de dilución (FD) de 0.5 y los demás se ajustaron con base en los resultados obtenidos (Figura 1). Con el primer ensayo se detectó que a concentraciones mayores de 75 mg.L^{-1} de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ no se presenta fecundación y que menores a 12.5 mg.L^{-1} dan valores superiores a 70% o 0.7 según el índice de fecundación (Y). Por lo tanto se ajustaron las concentraciones para obtener una respuesta escalonada entre 0 y 1, estas concentraciones fueron 10, 15, 20, 40 y 60 mg.L^{-1} de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Tabla 3). El análisis estadístico de la distribución promedio de los índices de fecundación muestra que a concentraciones $> 40 \text{ mg.L}^{-1}$ no hay fecundación después de exponer el esperma 60 minutos al agente tóxico, mientras que $\leq 15 \text{ mg.L}^{-1}$ se puede obtener un índice de fecundación ≥ 0.7 .

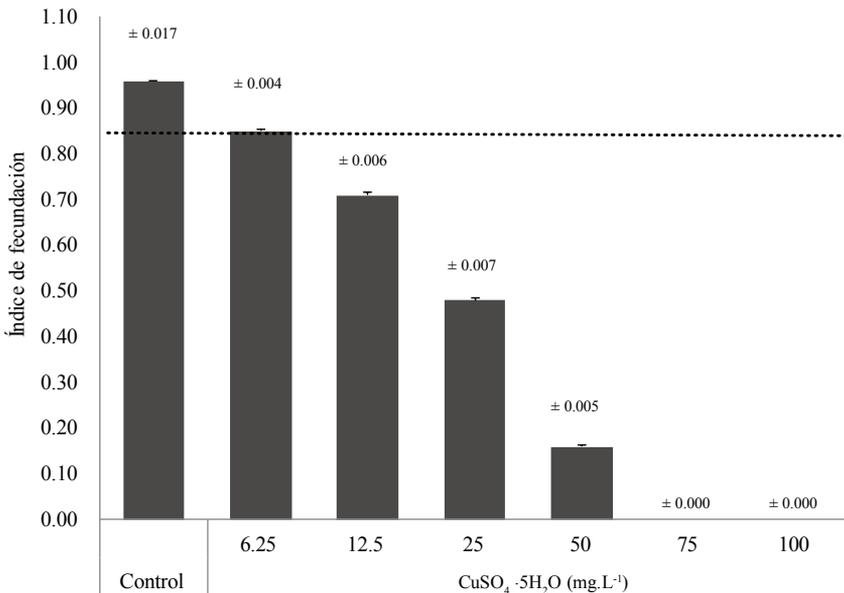


Figura 1. Índice de fecundación de gametos de *Lytechinus variegatus*, utilizando sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) como tóxico de referencia a diferentes concentraciones, empleando un factor de dilución de 0.5. La línea punteada indica la aceptación del control negativo.

Tabla 3. Índice de fecundación en gametos de *Lytechinus variegatus* a concentraciones de 10 a 60 mg.L⁻¹ de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O) como tóxico de referencia.

Ensayo	Concentración	Índice de fecundación ± error estándar	
Ensayo 3	Control	0.96 ± 0.00	
	10	0.93 ± 0.02	
	15	0.77 ± 0.03	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (mg.L ⁻¹)	20	0.35 ± 0.05
	40	0.02 ± 0.01	
	60	0.00 ± 0.00	
Ensayo 4	Control	0.86 ± 0.01	
	10	0.85 ± 0.01	
	15	0.81 ± 0.01	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (mg.L ⁻¹)	20	0.69 ± 0.04
	40	0.12 ± 0.04	
	60	0.00 ± 0.00	
Ensayo 5	Control	0.88 ± 0.03	
	10	0.85 ± 0.01	
	15	0.84 ± 0.01	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (mg.L ⁻¹)	20	0.77 ± 0.03
	40	0.71 ± 0.02	
	60	0.00 ± 0.00	
Ensayo 6	Control	0.93 ± 0.02	
	10	0.85 ± 0.01	
	15	0.78 ± 0.03	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (mg.L ⁻¹)	20	0.70 ± 0.02
	40	0.48 ± 0.00	
	60	0.01 ± 0.00	

No se presentaron diferencias significativas entre ensayos ($p = 0.3588$, $gl = 3$, $F = 1.14$). Sin embargo, hubo diferencias significativas entre las concentraciones ($p = 0.0000$, $gl = 6$, $F = 229.09$), ya que a medida que aumenta la concentración del tóxico ocurre una disminución del número de ovocitos fecundados. Solo entre las concentraciones más altas (40 y 60 mg.L⁻¹) y entre las más bajas (10 y 15 mg.L⁻¹) las diferencias mediante la prueba de Tukey no fueron significativas ($p > 0.05$), por cuanto las primeras produjeron una fecundación cercana a 0.80 y las últimas casi una inhibición total de la fecundación.

El índice promedio obtenido en el control negativo en los cuatro ensayos fue > 0.85 , lo cual permite asegurar que la concentración a la cual se ve afectada el 0.5 según el índice de la fecundación promedio es alrededor de 20 mg.L⁻¹ de CuSO₄·5H₂O (Figura 2). En la medición de parámetros fisicoquímicos se registró

una disminución en el pH a medida que aumentaba cada concentración del tóxico de referencia y se evidenció que al trabajar con concentraciones mayores a 30 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O dentro de los ensayos los ovocitos perdían su forma redondeada y tonicidad, probablemente debido a la presencia de sulfato, el cual es considerado un contaminante ambiental capaz de disminuir el pH en el agua (Capó-Martí, 2007). Sin embargo, esta variación no influyó en los resultados, ya que el conteo se realizó como en todos los casos solamente con los ovocitos en buen estado.

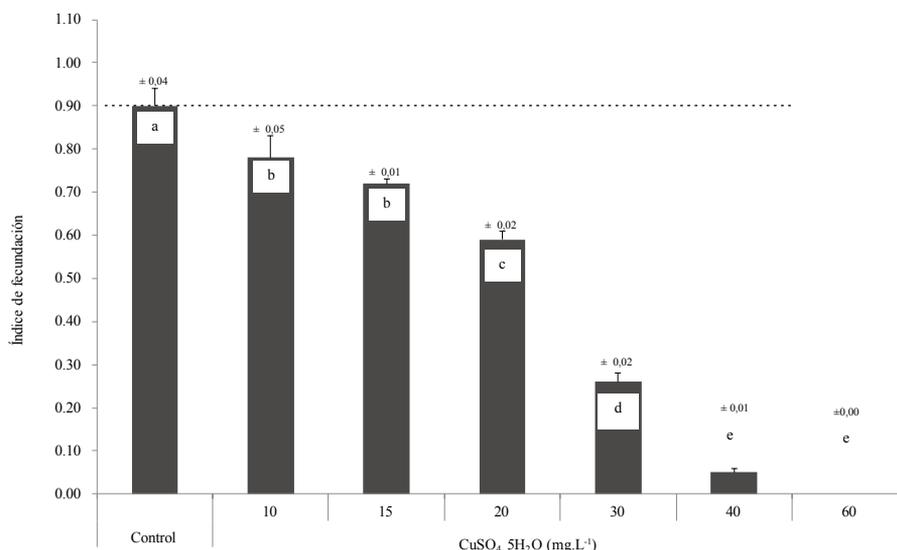


Figura 2. Índice de fecundación promedio a diferentes concentraciones de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) en gametos de *Lytechinus variegatus*. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. La línea punteada indica el índice de fecundación mínimo que debe presentar el tratamiento control.

CE₅₀. La concentración efectiva calculada por el método Spearman-Kärber con 0.5 de índice de fecundación es de 20.45 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O, con un límite inferior de 19.10 mg.L⁻¹, un límite superior de 21.89 mg.L⁻¹ y un coeficiente de variación de 9.29 con 95% de confianza.

Carta control. La estabilidad de la CE₅₀ con el tiempo puede cambiar entre 16.65 y 24.24 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O y de acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio varió desde 18.68 a 22.30 mg.L⁻¹; esta variación puede deberse a factores externos propios de la biología del organismo o de las condiciones de mantenimiento en laboratorio, pero puede reducirse en la medida en que se cuente con mayor habilidad para el manejo de los organismos y procedimientos (Figura 3).

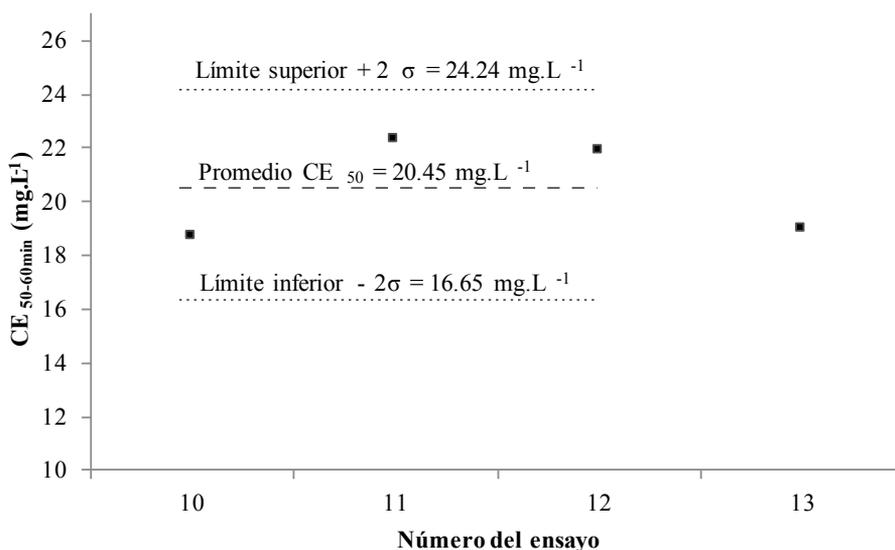


Figura 3. Carta control para el sulfato de cobre pentahidratado como tóxico de referencia evaluado en la fecundación en *Lytechinus variegatus*.

Concentración efectiva 50% (CE_{50-60 minutos}) del fluido de exploración offshore en la fecundación del erizo de mar *L. variegatus*. Con la metodología establecida se realizaron 11 ensayos, donde solo los últimos tres se tuvieron en cuenta para establecer la CE₅₀ de la FSP del lodo. El primer ensayo consistió en realizar diferentes concentraciones a un factor de dilución de 0.5, partiendo de un 100% de la solución madre (1 x 10⁶ mg.L⁻¹ de la FSP). Se observó que en el control negativo se obtuvo un (Y) promedio > 0.85; sin embargo, a concentraciones > 31250 mg.L⁻¹ de la FSP del fluido de exploración offshore no se produce fecundación de los ovocitos, por lo tanto fue necesario desarrollar más ensayos con concentraciones menores a 30000 mg.L⁻¹ de la fase suspendida particulada.

Los ensayos 2, 3, 4 y 5 se realizaron con su respectivo control negativo y usando 20 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O como control positivo. Los valores para los dos primeros ensayos a concentraciones de 100 a 30000 mg.L⁻¹ presentaron mucha variabilidad, posiblemente debido a factores externos, los cuales no se pudieron controlar dentro de la metodología. Solo en los ensayos 4 y 5 los valores fueron aceptables respecto a los controles, con lo cual se pudo establecer que el 0.5 del índice de fecundación se encontraba entre 5000 y 10000 mg.L⁻¹ de la FSP del lodo. Los ensayos siguientes se trabajaron con concentraciones

de 100, 5000, 6000, 8000, y 10000 mg.L⁻¹, pero no fue posible obtener en los controles índices de fecundación mayores a 0.85 para el negativo y de ± 0.5 para el positivo. Por ello, al evidenciar una alta variación para seis ensayos, se decidió revisar el estado de los organismos ingresados y mantenidos dentro del laboratorio, incluyendo un tiempo de acondicionamiento de cinco días previos a cada semana de ensayo, en los cuales durante los primeros tres días se mantuvo baja la temperatura del agua en las canaletas (25 ± 1 °C) y dos días antes de iniciar con los ensayos se incrementó a 27 ± 1 °C, con esta actividad se empezaron a obtener nuevamente los resultados esperados. El control negativo y positivo en los ensayos 12 a 14 arrojaron índices de fecundación deseados > 0.85 y ± 0.5 respectivamente, la desviación de los datos obtenidos no supera ± 0.04 .

Las concentraciones por ensayo determinaron la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.0000$, $gl = 5$, $F = 185.27$), excepto entre las bajas (0 y 100 mg.L⁻¹) y entre las altas (8000 mg.L⁻¹ y 10000 mg.L⁻¹) concentraciones, las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$). También se presentó la ausencia de las mismas entre ensayos ($p = 0.1347$, $gl = 2$, $F = 2.47$), validando la estandarización del protocolo para la FSP del fluido de exploración *offshore*. La Figura 4 muestra la variación en el índice de fecundación con cada concentración de la fase suspendida particulada del lodo y evidencia que el erizo de mar es sensible frente al fluido de exploración *offshore*, encontrando que la concentración efectiva de 50% o 0.5 según (Y) es cercana a 4000 mg.L⁻¹ de la FSP.

Un lodo de perforación puede inhibir el crecimiento, así como el desarrollo reproductivo de algunas especies acuáticas; puede incrementar la sensibilidad de algunos crustáceos marinos en sus fases tempranas de desarrollo larvario; también puede generar condiciones anaeróbicas en el fondo de los sedimentos, alterando la composición de las comunidades microbianas y estas, a su vez, generar altas mortalidades en poblaciones susceptibles (Bravo, 2007). En este experimento no se evaluó el efecto tóxico de la FSP del lodo en la condición física de las células, sin embargo se observó que a concentraciones mayores a 10000 mg.L⁻¹ presentaban lisis y/o deformación (Cerón-Benavides, 2013).



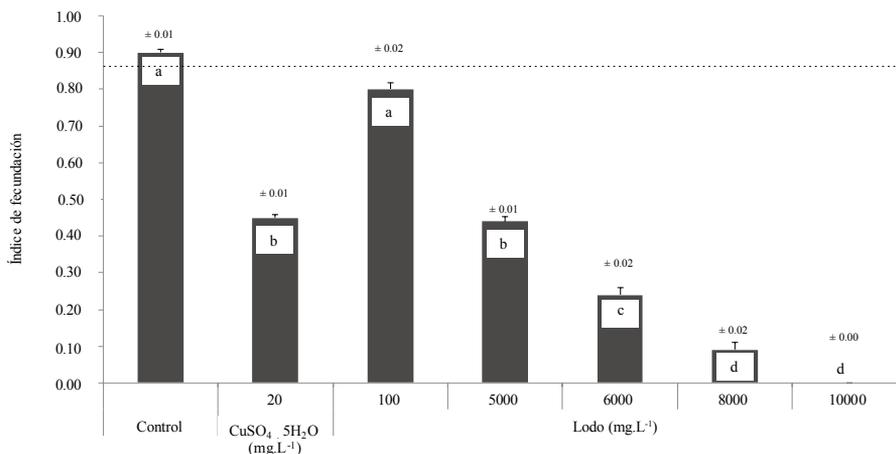


Figura 4. Índice de fecundación promedio obtenido con diferentes concentraciones de lodo para *Lytechinus variegatus*. Letras iguales representan que no hay diferencias significativas entre tratamientos. La línea punteada indica el índice de fecundación mínimo que debe presentar el tratamiento control.

CE₅₀. Se determinó que la concentración efectiva donde se observa una afectación de 0.5 según el índice de fecundación (Y) es de 3649 mg.L⁻¹ de la FSP, con un límite inferior y superior de 3613 y 3701 mg.L⁻¹ respectivamente y un coeficiente de variación de 12%. El gráfico de cajas y bigotes permitió evidenciar que a concentraciones de 6000 y 8000 mg.L⁻¹ no existe una distribución normal de los datos, mientras que a 100 y 5000 mg.L⁻¹ de la fase suspendida particulada hay una aproximación considerable a una distribución normal, debido a que su media se encuentra casi en el centro de la caja. Los bigotes, por el contrario, demuestran que (Y) puede variar drásticamente en cada concentración, por ejemplo: para la concentración de 100 mg.L⁻¹ el índice puede disminuir o indicar una tendencia con la repetitividad de los ensayos de 0.80 a 0.65, de igual forma puede aumentar el (Y) hasta 0.55 para 5000 mg.L⁻¹ de la FSP del lodo.

Carta control. La Figura 5 indica que la especie *L. variegatus* ve afectada la fecundación de sus gametos en 50% o 0.5 del índice de fecundación con 3649 mg.L⁻¹ del lodo disuelto en agua. El intervalo de variación en la obtención de la CE₅₀ estuvo entre 2773 mg.L⁻¹ a 4525 mg.L⁻¹ de la FSP.

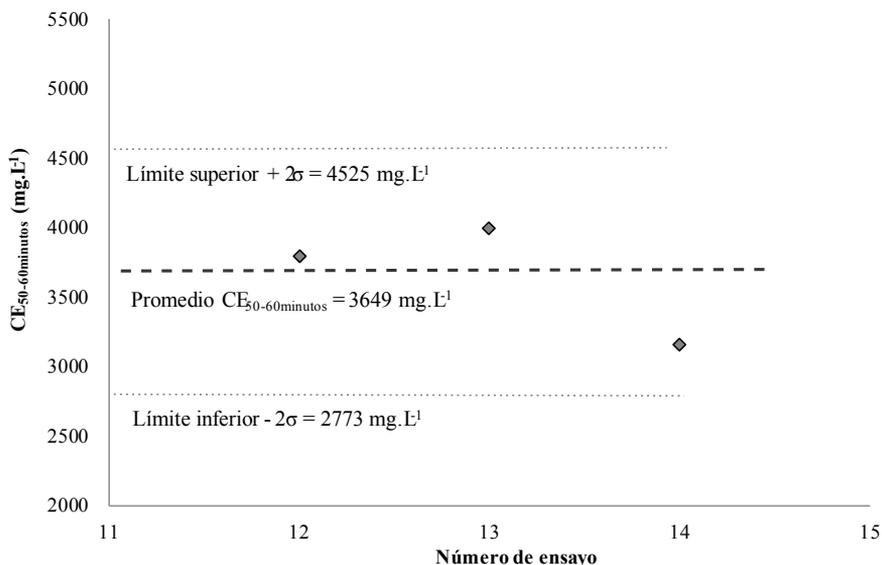


Figura 5. Carta control para la fecundación en *Lytechinus variegatus* con el lodo de perforación.

Principales variables fisicoquímicas evaluadas durante los ensayos. El agua de mar utilizada para los ensayos fue previamente filtrada e irradiada con UV, con ella se prepararon las soluciones del tóxico de referencia, de la fase suspendida particulada del lodo, las concentraciones de ovocitos y de espermatozoides, así como los 5 mL que se adicionaron a cada réplica y al control negativo. Para los ensayos realizados que dieron los resultados esperados se trabajó con valores promedio de pH de 7.9 ± 0.15 , salinidad de 34.80 ± 0.42 , oxígeno disuelto de 8.00 ± 0.2 mg.L⁻¹, temperatura de 25.2 ± 0.49 °C, y temperatura ambiente entre 26.3 ± 0.24 °C. La salinidad con la que se trabajó en los ensayos (34.8) estuvo cerca del ámbito establecido para la especie en el medio natural (35-37), al igual que los valores de temperatura (24 a 30 °C) y oxígeno disuelto (2.72 a 5.16 mg.L⁻¹) (Gómez-Gaspar, 2000; Montealegre-Quijano y Gómez-Gaspar, 2005). Si bien no hay registro del pH en esta especie en el medio, para la vida marina es apropiado el valor manejado (7.5 a 8.5) (Ospina-Salazar *et al.*, 2011; Santos-Acevedo *et al.*, 2011).

DISCUSIÓN

El porcentaje de fecundación evidenció un incremento a medida que aumentaba la concentración espermática. Estos resultados son similares a los obtenidos por Salas-Garza *et al.* (2005), quienes registraron el mismo incremento

hasta lograr valores muy cercanos a 100% sin la aparición de larvas anormales en *Strongylocentrotus franciscanus*.

En este trabajo con *L. variegatus* una fecundación > 85% luego de una hora de activación de los espermatozoides se obtuvo con concentraciones *stocks* iguales o superiores a 12.5×10^7 espermatozoides.mL⁻¹ para 2000 ovocitos y la menor variación en el porcentaje se logró con 500×10^6 espermatozoides.mL⁻¹, equivalente a una relación ovulo:espermatozoide de 1:25000. Esta relación es alta se considera que la concentración espermática con fecundación inmediata utilizada para obtener porcentajes superiores a 90% para *S. franciscanus* es de 1×10^7 espermatozoides.mL⁻¹ (Salas-Garza *et al.*, 2005) y para *L. variegatus* con una relación ovocito:espermatozoide 1:30 de 80% (Buitrago y Lodeiros-Seijo, 2005). En ambos casos, la concentración espermática es mucho menor comparada con la de esta investigación, lo cual se debe probablemente a que la fecundación no es inmediata sino que el ensayo exige el tiempo de exposición de una hora. Por lo tanto, para cada metodología, tiempo de exposición y especie de erizo de mar, hay una concentración espermática diferente para obtener el valor deseado en el porcentaje de fecundación.

Los gametos de *L. variegatus* presentaron una CE_{50-60minutos} de 20.45 mg.L⁻¹ para el CuSO₄.5H₂O utilizado como tóxico de referencia tras 60 minutos de exposición, siendo las concentraciones bajas (1 mg.L⁻¹) no tóxicas por presentar porcentajes de fecundación iguales al control. Este valor de CE_{50-60 minutos} se considera alto si se compara con los CE₅₀ registrados para *Arbacia spatuligera* (4.69 mg.L⁻¹) (Rudolph *et al.*, 2005) y para *Paracentrotus lividus* (entre 0.016 mg.L⁻¹ y 0.069 mg.L⁻¹) (Lera *et al.*, 2006), con lo que se puede inferir que *L. variegatus* es aparentemente más tolerante frente a este tóxico.

Es posible que entre enero y marzo hayan ingresado al laboratorio organismos que se encontraban, según su ciclo anual, con un bajo desarrollo gonadal (Espinoza-G. *et al.*, 2008), lo que pudo causar la alta variación entre los resultados de los ensayos 6 al 11 con la FSP del lodo. En cautividad, la manipulación de las condiciones ambientales como la temperatura y el fotoperíodo pueden provocar gametogénesis fuera del período natural en los erizos de mar; se ha trabajado con diferentes temperaturas en *P. lividus* y se ha determinado que temperaturas entre 18 a 24 °C aumentan crecimiento, desarrollo y calidad gonadal (Spirlet *et al.*, 2000; Shpigel *et al.*, 2004; Germendia *et al.*, 2009). Durante el mantenimiento en el laboratorio las condiciones fisicoquímicas fueron constantes y para *L. variegatus* las temperaturas bajas parecen ser un factor de gametogénesis y las altas de desarrollo y maduración gonádica (Espinoza-G. *et al.*, 2008), por lo que incluir un proceso de aclimatación previo a la realización de los ensayos, en el cual se incrementa y disminuye la temperatura, puede contribuir a mejorar los resultados.

La concentración de la FSP a la cual 50% o 0.5 del índice de fecundación fue afectada es de 3946 mg.L⁻¹ correspondiente a 394.6 mg.L⁻¹ del lodo original, según este último valor el lodo es considerado moderadamente tóxico, según la clasificación que presentan Jones *et al.* (1986) y Department of Mines and Petroleum (2006). Los gametos de *L. variegatus* demuestran más tolerancia frente a sustancias de exploración *offshore* que otros organismos acuáticos, si se compara el grado de toxicidad presentado con lo publicado por Contreras-León *et al.* (2013), los cuales mencionan que para postlarvas de *Lytopenaeus vannamei* la sensibilidad o toxicidad aguda (CL_{50-96h}) de seis tipos de lodos de perforación en base agua va ente 4224 ppm y 26635 ppm y entre 40781 ppm y 308248 ppm para los lodos en base sintética.

La CE_{50-60minutos} del tóxico de referencia presenta menor heterogeneidad o dispersión en sus valores (9.29%) con respecto a los obtenidos en los ensayos con la fase suspendida particulada del fluido de exploración *offshore* (12.01%). Ambos porcentajes aparentemente son buenos pero se puede lograr mayor exactitud en la CE₅₀ si se siguen realizando más ensayos.

El efecto observado sobre la fecundación al exponer los gametos a la FSP del lodo de exploración también puede estar influenciado por los sólidos suspendidos, los cuales, de acuerdo con Darszon (2007), disminuyen las probabilidades de que los péptidos contenidos en la capa gelatinosa cumplan la función de preparar y guiar el espermatozoide hacia el ovocito, dificultando que este sea fecundado. La prueba de toxicidad utilizada para determinar la CE_{50-60minutos} del tóxico de referencia y la fase suspendida particulada del lodo cumplió con los requerimientos mínimos exigidos por la ASTM (2012). Se recomienda seguir realizando este tipo de ensayos con *L. variegatus*, de manera que se pueda continuar alimentando la carta control y disminuyendo el porcentaje de variación. Además, se hace necesario desarrollar nuevas investigaciones con especies nativas del Caribe colombiano con el fin de determinar su potencial como especies indicadoras de toxicidad en lugares donde se realiza actividad petrolera, fortaleciendo los planes de manejo ambiental para identificar más riesgos en términos de la descarga de fluidos de exploración *offshore*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos al Instituto de Investigaciones Marinas (Invemar) por el apoyo para el desarrollo de esta investigación, enmarcada en el proyecto “Toxicidad de fluidos de exploración de hidrocarburos *offshore* en organismos nativos del Caribe colombiano: ecosistemas profundos y sus recursos pesqueros en los bloques de exploración RC11, RC12, Fuerte Norte y Fuerte Sur, Caribe colombiano”, financiado por el Instituto



Colombiano del Petróleo en el marco del Acuerdo de Cooperación No. 01 derivado del Convenio No. 5211329. También al equipo del Laboratorio de Bioprospección Marina del Inveimar y a la Línea de Bioprospección Marina del Programa de Valoración y Aprovechamiento de los Recursos Marinos donde se llevó a cabo el proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Martínez, G., A. Rudolph, R. Ahumada, R. Loyola y V. Medina. 2009. Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Rev. Biol. Mar. Ocean.*, 44: 725-735.
- Alea-Reyes, M. E., O. Carballo-Hondal, J. Trujillo-Hernández y M. A. Torres-Alemán. 2003. Sulfato de cobre como sustancia de referencia en ensayo de toxicidad en larvas de rana cubana *Osteopilus septentrionalis*. *Rev. Toxicol. Línea*, 24: 30-39.
- Álvarez-Larrauri, L. R. 1978. Los equinodermos de la costa atlántica de Colombia. Tesis Biol. Mar., Univ. Jorge Tadeo Lozano, Bogotá. 276 p.
- ASTM. 2012. Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos, E1563-98. American Society for Testing Materials International, West Conshohocken, EE. UU. 21 p.
- Berdyshev, E. V. 1999. Inhibition of sea urchin fertilization by fatty acid ethanolamides and cannabinoids. *Comp. Biochem. Physiol Part C.*, 122: 327-330.
- Borrero-Pérez, G. H., M. Benavides-Serrato y C. M. Díaz-Sánchez. 2012. Equinodermos del Caribe colombiano II: Echinoidea y Holothuroidea. Serie de Publicaciones Especiales de Inveimar No. 30, Santa Marta. 250 p.
- Böttger, A. S. y J. B. McClintock. 2001. The effects of organic and inorganic phosphates on fertilization and early development in the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.*, 129: 307-315.
- Bravo, E. 2007. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. http://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_esp.pdf 15/08/2014.
- Brown, G. H. y E. M. Salle. 1977. Química analítica. Reverte S. A., Barcelona. 761 p.
- Buitrago, E. y C. Lodeiros-Seijo. 2005. Producción de larvas y postlarvas del erizo verdiblanco del Caribe *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en condiciones de cultivo. *Rev. Biol. Trop.*, 53: 319-328.
- Capó-Martí, M. A. 2007. Tipos de contaminantes. 22-26. En: Capó-Martí, M. A. (Ed.). Principios de ecotoxicología, diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente. Editorial Tebar, Madrid. 320 p.
- Cerón-Benavides, S.M. 2013. Evaluación de la toxicidad aguda de un fluido de exploración *offshore* en la fecundación del erizo de mar *Lytechinus variegatus*. Tesis Ing. Produc. Acuíc., Universidad de Nariño, Pasto. 132 p.
- Cisneros-Prado, J. L. 2011. Desarrollo de un método para la determinación rápida de la concentración espermática en eyaculados de bovino, ovino y cerdo. Manual práctico de medicina veterinaria zootecnista, Univ. Veracruzana, Veracruz, México. 57 p.

- Contreras-León, G. J., S. A. Rodríguez-Satizábal, C. M. Castellanos-Romero, A. F. Herrera y M. Serrano-Gómez. 2013. Acute toxicity of drilling muds on *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) postlarve. *Cienc. Tecnol. Futuro*, 5:127-134.
- Darszon, A. 2007. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotecnología*, 14: 31-33.
- Dávila, E. y C. Forero. 2011. La innovación y el aprendizaje tecnológico en la historia de Ecopetrol. 221-271. En: Benavides, J. (Ed.). *Ecopetrol: Energía limpia para el futuro*. Villegas Editores, Bogotá. 571 p.
- Department of Mines and Petroleum. 2006. Petroleum guidelines. <http://www.dmp.wa.gov.au/documents/env-peb-188.pdf>. 21/08/2014.
- Díaz-Báez, M. C., C. Sobrero e Y. P. Granados. 2004a. Aseguramiento y control de calidad de bioensayos. 128-129. En: Castillo-Morales, G. (Ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Inst. Mex. Tecnol. Agua, Acapulco. 190 p.
- Díaz-Báez, M. C., Y. P. Granados y A. Ronco. 2004b. Protocolos de ensayo. 58-60. En: Castillo-Morales, G. (Ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Inst. Mex. Tecnol. Agua, Acapulco. 190 p.
- Díaz-Báez, M. C., G. D. Bulus-Rossini e Y. P. Granados. 2004c. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. 108. En: Castillo-Morales, G. (Ed.). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Inst. Mex. Tecnol. Agua, Acapulco. 190 p.
- Environment Canada. 1992. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). Report EPS 1/RM/27. Ottawa. 123 p.
- Environment Canada. 2011. Biological test method: Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). Report EPS 1/RM/27 Segunda edición, Ottawa. 140 p.
- EPA. 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluent sand receiving waters to freshwater organisms. http://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/tmdl/records/region_2/2008/ref2545.pdf. 15/08/2014.
- EPA. 2011. Analytic methods for the oil and gas extraction point source category. <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/upload/oilandgas2012.pdf>. 15/08/2014.
- Espinosa-Ramírez, A. J., M. C. Díaz-Báez y M. C. Bustos-López. 2004. Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 142.
- Espinoza-G., R. A., J. L. Reyes, J. H. Himmelman y C. Lodeiros. 2008. Actividad reproductiva de los erizos *Lytechinus variegatus* y *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) en relación con factores ambientales en el golfo de Cariaco, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 56: 341-350.
- Ferrante, J. G. 1981. Fate and effects of whole drilling fluids and fluid components in terrestrial and freshwater ecosystems: a literature review. Unites States Environmental Protection Agency, Washington. 50 p.
- Fuentealba, C., J. Silva, E. Bay-Schmith y A. Larrain. 2007. Standarization of the acute toxicity bioassay with *Diplodon chilenses* using a reference toxicant. *Gayana*, 71: 135-141.
- García, C. B. y M. I. Criales. 2005. Primera evaluación de la respiración de *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea) en la bahía de Chengue, Parque Nacional Tayrona, Caribe colombiano. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 29: 85-88.

- George, S. B., J. M. Lawrence, A. L. Lawrence, J. Smiley y L. Plank. 2001. Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Aquaculture*, 199: 353-369.
- Germendía, J. M., I. Menchaca, M. J. Belzunce y M. Revilla. 2009. Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Rev. Invest. Mar.*, 11: 25 p.
- Gómez-Gaspar, A. 2000. Abundancia de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en la isla de Cubagua, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 48: 125-131.
- Gómez-Gaspar, A. 2003. Relación diámetro-peso y proporción cromática del erizo *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en las islas Margarita y Cubagua, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 51: 83-86.
- Guirao-Marín, L., R. Vita, A. Marín y A. Cesar. 2002. Sensitivity of Mediterranean amphipods and sea urchins to reference toxicants. *Cienc. Mar.*, 28: 407-417.
- Jones, F. V., C. M. Moffitt, W. Bettge, R. Garrison y A. J. J. Leuterman. 1986. Drilling fluids firms respond to EPA toxicity concerns. *Oil Gas J.*, 84: 71-77.
- Lawrence, J. M., D. Lawrence, S. McBride, S. George, S. Watts y L. Plank. 2001. Development in the use of prepared feeds in sea urchin aquaculture. *World Aquac.*, 32: 34-39.
- Lawrence, J. M., L. R. Plank, A. L. Lawrence y R. M. Olvera. 2002. The effect of dietary carotenoids on gonad production and carotenoid profiles in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J. World Aquac. Soc.*, 33: 127-137.
- Lera, S., S. Macchia y D. Pellegrini. 2006. Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ. Monit. Asses.*, 122: 101-109.
- Montealegre-Quijano, S. y A. Gómez-Gaspar. 2005. Ciclo reproductivo de *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Toxopneustidae) en el sur de Isla Margarita, Venezuela. *Rev. Biol. Trop.*, 53: 305-312.
- Newmark, F., M. Santos-Acevedo, A. Chaves, J. Mora, J. Arias y S. Zea. 2005. Manual de métodos de bioactividad. <http://www.invemar.org.co/redcostera1/invemar/docs/2098MbioactividadEsponjas.pdf>. 15/08/2014.
- Ospina-Salazar, G. H., M. Santos-Acevedo, J. López-Navarro, D. I. Gómez-López, J. E. Álvarez-Barrera y J. Gómez-León. 2011. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. Serie de Publicaciones Generales del Invemar No. 46, Santa Marta. 100 p.
- Reis, M. A. y V. R. Cerqueria. 2003. Indução de desova do robalo-peva *Centropomus parallelus* Poey 1860, com diferentes doses de LHRHa. *Acta Scient. An. Sci.*, 25: 53-59.
- Ronco, A., M. C. Díaz-Báez e Y. P. Granados. 2004. Monitoreo ambiental. 26. En: Castillo-Morales, G. (Ed.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Acapulco. 190 p.
- Rudolph, A., J. Moscoso, G. Aguirre y R. Ahumada. 2005. Calidad de los sedimentos en el mar interior de Chiloé (41.5° a 43 latitud Sur) en función de pruebas de toxicidad. http://www.shoa.cl/n_cendhoc/productos/cimar10/resumenes/pdf/16_rudolph.pdf. 15/08/2014.
- Salas-Garza, A., E. Carpizo-Ituarte, G. Parés-Sierra, R. Martínez-López y R. Quintana-Rodríguez. 2005. Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) en Baja California, México. *Rev. Biol. Trop.*, 53: 345-355.

- Santos-Acevedo, M., G. H. Ospina-Salazar, J. López-Navarro, S. Sepúlveda-Cárdenas y J. Gómez-León. 2011. Contribución a la biología y mantenimiento de peces marinos ornamentales: Usos potenciales de la biodiversidad. Serie de Publicaciones Generales del Invemar No. 47, Santa Marta. 160 p.
- Scelzo, M. A. 1997. Toxicidad del cobre en larvas nauplii del camarón comercial *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Invest. Mar. Valparaíso, 25: 177-185.
- Shpigel, M., S. C. McBride, S. Marciano e I. Lupatsch. 2004. The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. Aquaculture, 232: 343-355.
- Spirlet, C., P. Grosjean y M. Jangoux. 2000. Optimization of gonad growth by manipulation of temperature and photoperiod in cultivated sea urchins, *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata). Aquaculture, 185: 85-89.
- StatPoint Technologies. 2006. Análisis probit. Manual de ayuda, Statgraphics Centurion, Virginia. 6 p.
- Torres-Campaña, A., L. R. Martínez-Córdova, H. Villarreal-Colmenares, J. Hernández-López, J. M. Ezquerro-Brauer y E. Cortés-Jacinto. 2009. Efecto de la adición del rotífero *Brachionus rotundiformis* (Tschugunoff, 1921) sobre la calidad del agua y la producción, en cultivos super-intensivos de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Rev. Biol. Mar. Oceanogr., 44: 335-342.

RECIBIDO: 04/02/2014

ACEPTADO: 30/09/2014

