

Tesis Doctoral

Efectos de la contaminación por metales pesados sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos

Giusto, Anabella

2015-04-07

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giusto, Anabella. (2015-04-07). Efectos de la contaminación por metales pesados sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giusto, Anabella. "Efectos de la contaminación por metales pesados sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en estudios de toxicidad de sedimentos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efectos de la contaminación por metales pesados
sobre anfípodos de agua dulce y su aplicación en
estudios de toxicidad de sedimentos**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Anabella Giusto

Directora de Tesis: Dra. Lucrecia Ferrari

Consejera de estudios: Dra. Irina Izaguirre

Lugar de trabajo: Laboratorio del Programa de Ecofisiología Aplicada. Dpto. de
Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján.

Buenos Aires, 2014.

Fecha de defensa: 7/4/15

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	7
DEDICATORIA	9
CAPITULO 1	
Introducción general	
1.1 Contaminación por metales (Cu y Cd)	10
1.2 El sedimento como compartimento del ecosistema	12
1.3 Bioensayos como herramienta de estudio de toxicidad de sedimentos	13
1.4 Matriz de ensayo: sedimento artificial vs ambiental	16
1.5 Anfípodos como organismos de ensayo	17
1.6 Descripción de los organismos <i>tests</i> utilizados en los bioensayos	19
1.7 Algunas consideraciones finales	23
CAPITULO 2	
Hipótesis y Objetivos	
2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivos Generales	24
2.2.1 Objetivos particulares	24
CAPITULO 3	
Materiales y Métodos general	
3.1 Organismos de ensayo	26
3.1.1 Descripción del ambiente de origen	26
3.1.2 Cría y mantenimiento de los organismos de ensayo	27
3.1.3 Edades de los organismos prueba utilizados en bioensayos	28
3.2 Tóxicos utilizados	28
3.3 Bioensayos	29
3.4 Parámetros de efecto (Puntos Finales)	30
3.4.1 Puntos finales tradicionales	30

3.4.2 Puntos finales de efecto temprano (Biomarcadores)	32
3.5 Tipo de bioensayos: diseños experimentales y detalles metodológicos	41
3.5.1 Bioensayos en medio acuoso	41
3.5.1.1 <i>Ensayos para evaluación de Parámetros Tradicionales</i>	44
3.5.1.2 <i>Ensayos para evaluación de Puntos Finales de Efecto Temprano</i>	45
3.5.2 Bioensayos con sedimentos adicionados (<i>spiked sediment</i>)	45
3.5.2.1 <i>Selección y procesamiento de sedimento para la realización de ensayos en matriz sólida</i>	45
3.5.2.2 <i>Preparación del sedimento adicionado y obtención de agua de poro</i>	46
3.5.2.3 <i>Metodología general de ensayo con sedimento adicionado</i>	49
3.5.2.4 <i>Caracterización fisicoquímica del sedimento</i>	50
3.5.2.5 <i>Metodología general de ensayo con agua de poro</i>	51
3.5.3 Ensayos con muestras de sedimentos naturales: sedimento completo y agua de poro	52
3.5.4 Ensayo de evaluación de tolerancia al nitrógeno amoniacal y Ensayo crónico de alimentación	55
3.6 Determinaciones fisicoquímicas comunes a todos los ensayos	55
3.7 Análisis estadístico de los resultados	56

CAPITULO 4

Optimización de las condiciones de cría y mantenimiento de *Hyalella curvispina* en laboratorio. Ensayo crónico de alimentación. Ensayo con N-NH₄⁺

4.1 Introducción	57
4.2 Cultivo de <i>H. curvispina</i> con fines experimentales	58
4.3 Ensayo crónico de alimentación: efecto de la dieta sobre la supervivencia y el crecimiento de <i>H. curvispina</i> bajo condiciones experimentales	63
4.3.1 Metodología	63
4.3.2 Resultados y Discusión	64
4.4 Evaluación del nitrógeno amoniacal sobre la supervivencia de <i>H. curvispina</i> bajo condiciones de ensayo	67
4.4.1 Metodología	67
4.4.2 Resultados y Discusión	68

CAPITULO 5

Toxicidad de cobre y cadmio en solución: efectos sobre la sobrevivencia, el crecimiento y concentración de metales en tejido

5.1 Introducción	71
5.2 Objetivos	72
5.3 Materiales y Métodos	72

5.3.1	Análisis estadístico	77
5.4	Resultados	77
5.4.1	Ensayos con <i>Hyaella curvispina</i>	77
5.4.1.1	<i>Evaluación de la toxicidad del Cd en solución sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-1)</i>	78
5.4.1.2	<i>Evaluación de la toxicidad del Cd en solución sobre machos jóvenes: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-2)</i>	81
5.4.1.3	<i>Evaluación de la toxicidad del Cd en solución sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-3)</i>	84
5.4.1.4	<i>Concentración de Cd en tejidos</i>	87
5.4.1.5	<i>Determinación de la concentración letal de Cu en juveniles (Ensayo Cu-1)</i>	89
5.4.1.6	<i>Evaluación de la toxicidad del Cu en solución sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia y el crecimiento (Ensayo Cu-2)</i>	90
5.4.1.7	<i>Evaluación de la toxicidad del Cu en solución sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-3)</i>	94
5.4.2	Ensayos con <i>Hyaella pseudoazteca</i>	98
5.4.2.1	<i>Determinación de las concentraciones letales de Cu en Juveniles (Ensayo J-1)</i>	98
5.5	Discusión	100
5.6	Conclusiones	111

CAPITULO 6

Toxicidad de cobre y cadmio en sedimento: efectos sobre la sobrevivencia, el crecimiento y concentración de metales en tejido

6.1	Introducción	113
6.2	Objetivos	114
6.3	Materiales y Métodos	115
6.3.1	Ensayos con sedimento procesado	115
6.3.2	Ensayos con sedimento completo adicionado	118
6.3.3	Análisis estadístico	120
6.4	Resultados	120
6.4.1	Ensayos con sedimento procesado (<i>H. curvispina</i> Cd)	121
6.4.1.1	<i>Evaluación de la toxicidad del Cd adicionado a sedimento sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-1)</i>	121
6.4.1.2	<i>Evaluación de la toxicidad del Cd adicionado a sedimento sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación</i>	

<i>del metal en tejidos (Ensayo Cd-2)</i>	125
6.4.1.3 <i>Concentración de Cd en tejidos</i>	128
6.4.2 <i>Ensayos con sedimento procesado y agua de poro (H. curvispina Cu)</i>	129
6.4.2.1 <i>Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento y agua de poro sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-1)</i>	129
6.4.2.2 <i>Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento y agua de poro sobre machos: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-2)</i>	134
6.4.2.3 <i>Concentración de Cu en tejidos</i>	139
6.4.3 <i>Ensayos con sedimento procesado adicionado (H. pseudoazteca Cu)</i>	141
6.4.3.1 <i>Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia y el crecimiento (Ensayo Cu-3)</i>	141
6.4.3.2 <i>Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento sobre machos: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-4)</i>	144
6.4.3.3 <i>Concentración de Cu en tejidos</i>	147
6.4.4 <i>Ensayos con sedimento completo (H. pseudoazteca Cu)</i>	148
6.4.4.1 <i>Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia y el crecimiento</i>	148
6.5 <i>Discusión</i>	152
6.6 <i>Conclusiones</i>	161

CAPITULO 7

Desarrollo de nuevos puntos finales para ensayos con anfípodos

7.1 <i>Introducción</i>	163
7.2 <i>Objetivos</i>	166
7.3 <i>Materiales y Métodos</i>	166
7.3.1 <i>Ensayo en matriz acuosa</i>	167
7.3.2 <i>Ensayo con sedimento adicionado</i>	167
7.3.3 <i>Análisis estadístico</i>	168
7.4 <i>Resultados</i>	169
7.4.1 <i>Ensayo en matriz acuosa</i>	169
7.4.2 <i>Ensayo con sedimento adicionado</i>	176
7.5 <i>Discusión</i>	182

CAPITULO 8

Valoración de efectos subletales como herramientas de uso en ensayos de evaluación de calidad de sedimentos

8.1	Introducción	187
8.2	Objetivos	188
8.3	Materiales y Métodos	188
8.3.1	Organismos prueba	188
8.3.2	Tratamiento del sedimento	189
8.3.3	Procedimiento de los bioensayos	189
8.4	Resultados	193
8.4.1	Ensayos estándar	193
8.4.1.1	<i>Sedimento completo</i>	193
8.4.1.2	<i>Agua de poro</i>	199
8.4.2	Ensayos biomarcadores	205
8.5	Discusión	208

CAPITULO 9

Algunas consideraciones sobre la respuesta de los organismos de ensayo en situaciones control: aportes para el establecimiento de una línea de base

9.1	Introducción	215
9.2	Objetivos	215
9.3	Materiales y Métodos	216
9.4	Resultados	216
9.4.1	Comparación del Índice de Masa Corporal entre grupos controles e Iniciales	216
9.4.1.1	<i>Ensayos en matriz acuosa</i>	216
9.4.1.2	<i>Ensayos en matriz sólida</i>	220
9.4.1.3	<i>Ensayos en matriz acuosa y sólida: incidencia del cultivo de origen</i>	224
9.4.2	Comparación de las reservas energéticas entre grupos controles luego de 10 días de exposición en medio acuoso y sedimento control	227
9.5	Conclusiones	229

CAPITULO 10

Conclusiones Generales	231
-------------------------------	-----

ANEXO I Resultados de los análisis estadísticos	235
--	-----

ANEXO II Resumen de las concentraciones de nitrógeno amoniacal	249
---	-----

ANEXO III Producción científica	254
--	-----

BIBLIOGRAFÍA	258
---------------------	-----

Indice de abreviaturas

AP: agua de poro
ARGP: arginina fosfato
AVS: sulfuros ácidos volátiles
CAT: catalasa
CE: Concentración Efectiva (= Cobre adicionado - Cobre control)
CP: concentraciones efectivas entre el tiempo inicial y final de exposición.
DE: desvío estándar
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EEM: error estándar de la media
ERL: rango bajo de efecto
ERM: rango medio de efecto
EROS: especies reactivas de oxígeno
ETS: sistema de transporte de electrones
GG: glucógeno
GOD: glucosa oxidasa
GPx: glutatión peroxidasa
Hc: *Hyalella curvispina*
Hp: *Hyalella psuedoazteca*
IMC: índice de masa corporal
J: juveniles
LEL: nivel de efecto más bajo
LT: lípidos totales
M: machos
MET: umbral de efecto mínimo
MHW: agua moderadamente dura
Mj: machos jóvenes
MLQ: miliQ
Mm: machos mayores
OW: agua sobrenadante
PEC: valor nivel de consenso (probable ocurrencia de efectos)
PEL: nivel de efecto probable
POD: peroxidasa
PT: proteínas totales
PS: peso seco

SED: sedimento

SEL: nivel de efecto severo

SOD: superóxido dismutasa

SPK: sedimento adicionado (*spiked sediment*)

SQGs: niveles guía de calidad de sedimentos SQGs

SS: sedimento seco

TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

TEC: valor nivel de consenso (rara ocurrencia de efectos)

TEL: nivel umbral de efecto

TET: umbral de efecto tóxico

Tf: tiempo final

TGL: triglicéridos

Ti: tiempo inicial

TOC: carbón orgánico total

EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS SOBRE ANFÍPODOS DE AGUA DULCE Y SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE SEDIMENTOS

Las evaluaciones ecotoxicológicas son herramientas fundamentales en las estimaciones de riesgo ambiental y la toma de decisiones de políticas de control y prevención de daños ecológicos. A nivel regional la caracterización ecotoxicológica de sedimentos se determina principalmente evaluando en ellos niveles de contaminantes considerados como prioritarios, sin tener en cuenta factores tales como biodisponibilidad, resuspensión posibles interacciones o impacto sobre estructura y funcionamiento de las comunidades asociadas a sedimentos. En ese sentido los bioensayos son herramientas esenciales para evaluar la calidad del ambiente porque responden de manera integrada a los efectos adversos de mezclas químicas complejas con las que están en contacto y cuya ecotoxicidad interesa conocer.

Los bioensayos con anfípodos tienen considerable relevancia en la evaluación toxicológica de agua dulce, siendo *Hyalella azteca*, de amplia distribución en el hemisferio norte, la especie más utilizada. Los protocolos para bioensayos estandarizados fueron diseñados en el hemisferio norte en función de los requerimientos y biología de esta especie. Además, estos protocolos se centran primordialmente en la evaluación de parámetros tradicionales (mortalidad y crecimiento) sobre los anfípodos, asumiendo que la ausencia de efecto indica que el medio de ensayo es ecotoxicológicamente aceptable. Sin embargo, hay una tendencia mundial a evaluar el impacto de los contaminantes en un sistema acuático particular a través del monitoreo ecotoxicológico con especies nativas. La necesidad de utilizar especies locales se hace evidente, entre otras razones, porque el uso de las mismas adaptadas a las características del ambiente, pueden proporcionar resultados mucho más cercanos a la realidad que los obtenidos con una especie exótica. Por lo tanto, debido a que las especies propuestas en los protocolos internacionales no son las mismas que encontramos en nuestros ecosistemas acuáticos, es muy importante evaluar el efecto de los contaminantes sobre especies autóctonas sobre la base del conocimiento biológico, ya que estas pueden mostrar requerimientos y características diferentes a las de las especies estandarizadas en dichos protocolos. Es recomendable que cada región geográfica tenga protocolizado diversos métodos de ensayo donde las especies autóctonas estén representadas.

Este trabajo presenta resultados obtenidos a partir de la evaluación de efectos de matriz acuosa y sedimentos contaminados sobre dos especies de anfípodos

dulceacuículas presentes en la región: *Hyaella curvispina* y *Hyaella pseudoazteca*, por medio de bioensayos de toxicidad en condiciones controladas de laboratorio.

Utilizando organismos de dos estadios de vida, se realizaron ensayos de exposición aguda y subcrónica a dos metales pesados, tóxicos referentes (cobre y cadmio) en matriz acuosa, sedimento procesado y agua de poro extraída del mismo, adaptando una metodología estandarizada para *H. azteca*. Los puntos finales fueron concentración de metal en tejidos, sobrevivencia y crecimiento, siendo los dos últimos parámetros tradicionales para estos protocolos experimentales. A su vez, se investigó la utilidad del Índice de Masa Corporal (IMC) como nuevo parámetro evaluador de efecto subletal.

Con el objetivo de utilizar nuevos puntos finales de evaluación de efecto temprano por exposición a metales en *H. curvispina*, se determinaron efectos sobre el contenido de glucógeno, proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos, arginina fosfato, niveles de peroxidación lipídica (TBARS) y actividad de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y Na⁺/K⁺ ATPasa, en matriz sólida y acuosa. Además se ajustó e implementó para esta especie la técnica de sistema de transporte de electrones (ETS) como biomarcador de estado metabólico.

Se llevó a cabo la evaluación de la ecotoxicidad de sedimentos ambientales realizando ensayos con sedimento completo y agua de poro, utilizando a *H. curvispina* como organismo prueba, evaluando como puntos finales parámetros tradicionales de efecto. A su vez, sobre muestras de sedimento completo se investigó la utilidad de biomarcadores de efecto temprano (niveles de lipoperoxidación y actividad de SOD, CAT y ETS).

En relación al efecto del cadmio y cobre en solución *H. curvispina* probó ser sensible a concentraciones ecológicamente relevantes de ambos metales. Los resultados reafirman su importancia como una especie adecuada para ensayos de evaluación ecotoxicológica en cuerpos de agua dentro de su área de distribución.

Con respecto a la toxicidad de ambos metales en bioensayos en matriz sólida, se demostró que ambas especies sufren efectos negativos sobre el crecimiento a concentraciones de Cd y Cu cercanas a los Niveles Guía de Calidad de Sedimentos (SQGs), desarrollados para el hemisferio norte, siendo el IMC el mejor parámetro discriminador de efecto.

En cuanto al desarrollo de nuevos puntos finales de efecto temprano para ensayos con anfípodos se confirmó que la exposición a Cu ó Cd, tanto en solución como en sedimento, afectó de manera significativa a la mayoría de los parámetros metabólicos y bioquímicos evaluados. Se postula al ETS como nuevo biomarcador de efecto en bioensayos ecotoxicológicos con *H. curvispina*.

El protocolo aplicado, los parámetros determinados y la especie *test* elegida, resultaron ser aptos para monitorear la calidad toxicológica de sedimentos ambientales. El uso de biomarcadores demostró una mayor sensibilidad y un más preciso ajuste de evaluación de efectos que el obtenido por el ensayo estándar de sobrevivencia y crecimiento, y se revelan más contundentes en relación a la evaluación de efectos proponiéndose su implementación en estudios de biomonitoreo de sedimentos.

Por último, se estableció una línea de base como contribución al incremento del conocimiento biológico de las especies de ensayo, utilizando como criterio el IMC y parámetros del metabolismo energético, comparando el estado general de los animales en medio acuoso y sedimento en situaciones control. Se concluyó que *H. curvispina* puede ser empleada en bioensayos tanto en matriz sólida como acuosa, pero la especie resulta más apropiada para la realización de bioensayos en presencia de sedimentos. Con respecto a *H. pseudoazteca* resulta una especie apropiada para su uso en bioensayos en matriz sólida, pero no es recomendada para su utilización en ensayos en matriz acuosa.

Palabras claves: *Hyalella curvispina*; *Hyalella pseudoazteca*; cobre; cadmio; bioensayos de toxicidad de sedimentos; biomarcadores.

EFFECTS OF HEAVY METAL POLLUTION ON FRESHWATER AMPHIPODS AND ITS APPLICATION IN SEDIMENT TOXICITY ASSESSMENT

Ecotoxicology assays are fundamental tools for assessing environmental risks and making political to control and prevent environmental damage. At a regional level, ecotoxicological characterization of sediments is determined mostly by analysing the toxic levels present in them that are prioritized, not taking into account variables such as bioavailability, resuspension, possible interactions or impact on the structure and functioning of the communities associated to the sediments. In this sense, bioassays are essential tools for assessing environmental quality because they respond in an integral way to adverse effects of complex chemical mixtures with which they come in contact and of which there is an interest in knowing their ecotoxicity.

Bioassays with amphipods are of remarkable relevance for toxicological assessment in freshwater, being *Hyalella azteca*, widely distributed across the northern hemisphere, the most employed species. Standardized bioassay protocols were designed in the northern hemisphere based on the requirements and biology of this species. Moreover, these protocols are focused mainly on the assessment of traditional parameters (growth and mortality) of amphipods, assuming the absence of an effect implies that the assay medium is ecotoxicologically acceptable. However, there is a worldwide trend to assess toxic impact in a particular aquatic system through ecotoxicological monitoring with native species. The need to use local species becomes evident, among other reasons, because using these adapted to the environmental characteristics can give results which are much closer to reality than those obtained using an exotic species. Therefore, considering the species proposed by international protocols are not the ones we find in our aquatic ecosystems, it is extremely important to assess the effect of pollutants on native species on the basis of biological knowledge, since native species may present requirements and characteristic that are different to those of the standardized species in said protocols. It is advisable that each geographic region have a diversity of standardized assay protocols where native species are represented.

This work presents results obtained from the assessment of the effects of polluted sediments and liquid matrix on two freshwater amphipod species present in the region: *Hyalella curvispina* and *Hyalella pseudoazteca*, through toxicity bioassays in controlled laboratory conditions.

Acute and subchronic exposure to two heavy metals, reference toxics (copper and cadmium) in liquid matrix, processed sediment and groundwater assays were performed, adapting a methodology standardized for *H. azteca*, using organisms at different life stages. Endpoints were metal tissue concentration, survival and growth, being these last two the traditional parameters for these experimental protocols. At the same time, utility of the body mass index (IMC) as a new parameter to evaluate sublethal effects was assessed.

Aiming to use new endpoints to evaluate early effects of metal exposure in *H. curvispina*, the effects on glycogen, total proteins, total lipids, triglycerides, phosphate arginine, lipids peroxidation levels (TBARS) and catalase activity (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Na⁺/K⁺ ATPase were determined in both solid and liquid matrix. In this work, the electron transportation system (ETS) technique was adjusted and implemented for this species as a metabolic state biomarker.

Environmental sediment ecotoxicity assessment was carried out with complete sediment and pore water assays using *H. curvispina* as test organism, taking as endpoint the traditional effect parameters. Utility of early effect biomarkers (lipoperoxidation levels and SOD, CAT and ETS activity) was also assessed using complete sediment samples.

With regard to the effect over cadmium and copper in solution, *H. curvispina* showed sensitivity to concentrations of both ecologically relevant metals. The results reasserted its significance as an adequate species for ecotoxicological assessment assays in water bodies inside their area of distribution.

As for the toxicity of both metals in bioassays with solid matrix, it showed that both species suffer negative effects on growth when using concentrations of Cd and Cu close to the Sediment Quality Guideline (SQG) levels (developed for the North hemisphere), with the IMC being the best parameter for effect discrimination.

With regard to developing new early effect endpoints for assays with amphipods, it was confirmed that the exposition to both metals significantly affected most of the intermediary metabolism parameters and biochemical oxidative damage evaluated, both in solution and in sediment. ETS is presented as a biomarker of effect in ecotoxicological bioassays with *H. curvispina*.

The applied protocol, the determined parameters and the test species chosen were adequate for monitoring the toxicological quality of environmental sediments. The use of biomarkers showed a higher sensitivity and a more precise effect evaluation adjustment than the one obtained through the use of the standard survival and growth assay. Since they are also more telling in regards to the effects evaluation, its implementation in sediment biomonitoring studies is proposed.

Finally, a baseline was established as contribution to the increment of biological knowledge of the test species, using the IMC and parameters from the energetic metabolism as criteria, comparing the general state of the animals in water and sediment media in control situations. It is concluded that *H. curvispina* can be used in bioassays with both solid and water matrix, but the species is more adequate for carrying out bioassays in presence of sediments. With regard to the *H. pseudoazteca*, it is an adequate species to be used in solid matrix bioassays, but it is not recommended for its use in water matrix trials.

Keywords: *Hyalella curvispina*; *Hyalella pseudoazteca*; copper; cadmium; sediment toxicity bioassays; biomarkers.

Agradecimientos

A la ANPCyT, el CONICET y la Universidad Nacional de Luján por las becas otorgadas.

A la Universidad Nacional de Luján y al Programa de Ecofisiología Aplicada donde se realizó este trabajo.

Al Departamento de Ciencias Básicas de la UNLu, la CIC y la ANPCyT por los subsidios otorgados que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mi directora, la Dra. Lucrecia Ferrari, por confiar en mí desde el primer hasta el último día, por sus consejos, su empuje y por no dejarme nunca bajar los brazos. También por apoyarme en todas mis decisiones, tanto profesionales como personales, infinitas gracias.

A todos mis compañeros del PRODEA: El Dr. Alfredo Salibián, Fer, Adonis, Patricia, Martina, Betty, Pao, Naty, Lau, Caro, Ceci y Tincho. Gracias a todos por la ayuda, los consejos, las risas, los mates, locros, asados, muestreos y por hacer que el laboratorio haya sido el mejor lugar de trabajo en el que estuve. También gracias por la ayuda a Santiago Doyle, Marcelo Ibañez, Lorena Medina, Agustín Somma, Cacho y en particular a Martina Mastrangelo y Andrés Piguin por las determinaciones de Cu y Cd.

A Bibiana Dutra y su familia, por recibirnos en su país con tanto cariño, por la ayuda y por la hermosa amistad generada.

A mi hijo Lucas, por todo su amor, paciencia y por alegrarme la vida. También por comprender, a su manera, todos los momentos que no pudimos compartir juntos.

A toda mi familia y la de mi esposo por el apoyo, el empuje y por cuidar a Lucas con tanto amor cuando lo necesite. En especial a Flor, Alda y mamá, por no fallarme nunca.

A todos mis amigos que siempre, aunque sin entender mucho lo que hago, estuvieron pendientes de este trabajo y de que las cosas me salgan bien.

A Jo, por toda la ayuda, paciencia y amor. Por quererme y estar al lado mío a lo largo de todos estos años....y por todos los domingos con Lucas.

A mis padres, por enseñarme que con esfuerzo todo en la vida se logra.

*Dedicado a Lucas e Isabella por su amor infinito
y a mis padres,
que son las personas que me brindan su apoyo incondicional
y creen en mí, más que nadie en el mundo*

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Contaminación por metales (Cu y Cd)

Los metales constituyen componentes comunes de la litosfera y forman parte de numerosos ciclos biológicos y geológicos naturales. No obstante, se ha demostrado que la creciente industrialización y actividades agrícolas suelen generar importantes modificaciones en estos ciclos, causando el incremento de las concentraciones normales en los cuerpos de agua continentales (Chen & Folt, 2000). Su presencia en el medio ambiente, incluso a bajas concentraciones, tiene un impacto negativo sobre los organismos y ecosistemas.

Algunos metales pesados como el cobre, hierro, manganeso y el cinc, entre otros, constituyen micronutrientes esenciales para animales y plantas, sin embargo, a elevadas concentraciones son tóxicos. Otros metales no esenciales son tóxicos a muy bajas concentraciones. El mayor riesgo de los metales pesados está dado por su persistencia a largo plazo en el medio ambiente. De los 59 elementos metálicos, 13 han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) (<http://www.epa.gov/>).

Ciertos metales pueden bioacumularse, biomagnificarse o ser biotransferidos en los organismos acuáticos a concentraciones suficientemente altas como para provocar efectos perjudiciales, sobre todo por la transferencia a través de la cadena alimentaria (Naimo *et al.*, 1995).

En general los metales se caracterizan por su gran afinidad con el azufre, por esta razón inactivan las enzimas ya que se unen a los grupos sulfidrilos (-SH), también se enlazan a los grupos carboxilos (-COOH) y aminos (-NH₂) de las proteínas. Por ejemplo, el Cd, Cu, Hg, Ag, Pb y Zn inhiben la acción de varias enzimas al formar enlaces covalentes con los radicales libres del sitio activo. Entre las enzimas cuya actividad es alterada por la exposición a los metales pesados, se destacan la Na⁺/K⁺ ATPasa branquial así como la lactato deshidrogenasa, las lipasas, amilasas y proteasas del hepatopáncreas de los crustáceos, de la glándula digestiva de los

moluscos y el hígado de los peces. Algunos metales inhiben los procesos de transporte a través de las membranas celulares al unirse a estas, como el Cd, Cu, Pb y Hg (Moriarty, 1988; Espina & Vanegas, 2005).

El Cobre (Cu) se encuentra presente en pequeñas concentraciones en una variedad de células y tejidos, es un metal esencial para muchos sistemas biológicos. Un gran número de enzimas que intervienen en muchos procesos biológicos necesarios para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento, requieren Cu como cofactor para sus propiedades estructurales y catalíticas (Company *et al.*, 2008). Sin embargo, el Cu en concentraciones altas puede ser tóxico. Además de su ocurrencia natural en muchos minerales y como metal no combinado, las principales fuentes antrópicas de dicho elemento son: los plaguicidas y los fertilizantes utilizados en la agricultura, los conservantes, los aditivos y los agentes colorantes empleados en la industria alimenticia, los colorantes usados en las industrias textiles y los conservantes de madera y cuero, entre otros (Eisler, 1998; Alves de Souza Grinevicius, 2006; Figueiredo Fernandes *et al.*, 2007). La toxicidad de los organismos acuáticos frente al Cu se encuentra principalmente relacionada con el ión cúprico (Cu^{2+}) disuelto. En ambientes acuáticos, la biodisponibilidad, toxicidad y bioacumulación del Cu en los organismos acuáticos depende tanto de variables abióticas como bióticas. Entre las abióticas cabe mencionar la temperatura, el pH y la salinidad del agua; la presencia de otros compuestos orgánicos e inorgánicos; el tamaño y densidad de los materiales suspendidos; la especie química; la proximidad a la fuente antropogénica de Cu y obviamente la concentración de Cu presente en el medio. Entre las variables bióticas se pueden mencionar la edad, el tamaño y el estado de desarrollo de los individuos; las adaptaciones fisiológicas o genéticas a altos contenidos de Cu; la especie; y el tejido (Hung *et al.*, 1990; Eisler, 1998).

El Cadmio (Cd) es un metal no esencial con un tiempo de residencia relativamente largo en los sistemas acuáticos, es considerado como uno de los elementos más tóxicos para los organismos (USEPA, 2007). En ambientes dulceacuícolas, está íntimamente asociado con la materia coloidal como CdCl_2 y CdSO_4 . Se lo encuentra en forma natural en el medio ambiente en concentraciones bajas (0,1 m/Kg en la corteza terrestre y por debajo de 0,1 $\mu\text{g/L}$ en los ríos y lagos (Stoeppler, 1991)), pero debido a su uso industrial intensivo puede estar presente en cantidades elevadas. Las principales fuentes de Cd son los fertilizantes fosfatados, colorantes, fábricas de electrogalvanizados, petroquímicas, baterías de níquel (Ni) y Cd, y lixiviación de

depósitos geológicos, entre otros (Eisler, 1985; Hirt & Domitrovic, 2002; Alves de Souza Grinevicius, 2006; Barrera Escorcía, 2006). Aunque en aguas superficiales es poco frecuente, el cadmio es altamente tóxico para la vida acuática. En un ensayo de toxicidad aguda comparativo de 63 metales pesados, el Cd fue claramente el metal más tóxico (Borgmann *et al.*, 2005).

La biodisponibilidad del Cd para los organismos depende de numerosos factores, incluyendo las tasas de adsorción y desorción, el pH y el potencial redox, entre otros. Los procesos de adsorción y desorción son los principales factores que controlan la concentración de iones metálicos en solución y en sedimentos y dependen tanto de la concentración del tóxico, como de la composición del sedimento (tipo de sólido, tamaño de partícula, presencia de ligandos y de material húmico) y del medio acuoso (dureza del agua, presencia de material particulado en suspensión, etc.) (Di Giulio *et al.*, 1995; Boudou *et al.*, 1998).

Pese a la existencia de un gran número de trabajos ecotoxicológicos respecto a la toxicidad de los metales, la gran mayoría se han focalizado en pocas especies, dejando áreas vacantes en el conocimiento de la sensibilidad de especies representativas de cada región en particular. Considerando la importancia biológica y ecológica de las mismas, el desarrollo de estudios en esta línea proveería información complementaria y de gran utilidad para evaluaciones de impacto ambiental y estudios integrales de los ecosistemas (Gutierrez & Gagneten, 2011).

1.2 El sedimento como compartimento del ecosistema

Cuando los tóxicos son liberados al agua superficial se distribuyen entre la fase acuosa y la particulada y se depositan durante largos períodos en los sedimentos del fondo.

Estos elementos se acumulan principalmente en los sedimentos superficiales, aunque pueden encontrarse concentraciones relativamente elevadas a una profundidad de 15 cm, y guardan una estrecha relación con el tamaño de las partículas que constituyen el sedimento y con la cantidad de materia orgánica sedimentaria, alterando el equilibrio ecológico y biogeoquímico del ecosistema (Acosta *et al.*, 2002). Por lo tanto, los sedimentos son un componente ecológicamente importante en el hábitat acuático, y son un reservorio natural de contaminación (Chapman, 1989).

La sedimentación es un proceso importante de remoción de contaminantes de la columna de agua, que acumula xenobióticos en cantidades importantes. El sedimento contaminado puede definirse como aquel que contiene sustancias químicas en exceso con respecto a criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad (Burton, 2002). Los poluentes pueden distribuirse sobre el sedimento, en el agua asociada a las partículas (agua intersticial o de poro), en la capa de agua asociada al sedimento y en la comunidad bentónica (Neff, 1984). Procesos naturales de remoción y redistribución de los sedimentos, como los vientos, ondas y corrientes, así como la remoción mecánica por dragado, provocan su resuspensión en la columna de agua y la dispersión de los tóxicos retenidos en ellos incrementando su biodisponibilidad y siendo, por lo tanto, un riesgo para toda la biota acuática (Winger *et al.*, 2000).

A su vez, los sedimentos pueden actuar como portadores y posibles fuentes de contaminantes porque los metales pesados contenidos en ellos pueden ser liberados a la columna de agua por cambios en las condiciones ambientales tales como pH, potencial redox, oxígeno disuelto y la presencia de quelatos orgánicos (Vaithyanathan *et al.*, 1993), por lo tanto, su efecto tóxico se modifica por las condiciones fisicoquímicas presentes (Lima-Cazorla *et al.*, 2005).

La concentración de metales pesados en sedimentos nos solo depende de fuentes antropogénicas y litogénicas, sino también de las características texturales, contenido de materia orgánica, composición mineralógica y ambiente deposicional de los sedimentos. En general, los metales traza están asociados con las partículas pequeñas de estos materiales. Esta tendencia es atribuida predominantemente a la adsorción, co-precipitación y complejación de metales en las capas superficiales de las partículas.

A pesar de la importancia del compartimento de los sedimentos, la evaluación y cuantificación del potencial tóxico de los metales en los sedimentos naturales es todavía muy difícil, ya que las características físicas y químicas de los metales son altamente variables, como lo son las rutas de absorción y eliminación de estos contaminantes por los organismos acuático (Edwards & Simkiss, 2005).

1.3 Bioensayos como herramienta de estudio de toxicidad de sedimentos

Históricamente la caracterización ecotoxicológica de los sedimentos se determinó evaluando en ellos los niveles de los contaminantes considerados como prioritarios,

sin tener en cuenta, otros factores tales como posibles interacciones, biodisponibilidad, resuspensión o impacto sobre la estructura y funcionamiento de las comunidades asociadas a ellos (Ferrari, 2006).

Sin embargo, la cuantificación de los contaminantes por sí sola no es suficiente para poder determinar posibles efectos adversos sobre los organismos, o la disponibilidad de los diferentes materiales (Ingersoll, 1995). Las concentraciones de compuestos químicos en los sedimentos pueden ser muy elevadas, pero no tienen una relación directa con la biodisponibilidad. Un contaminante puede presentar efectos tóxicos sólo si se encuentra en una forma biodisponible (Suter, 1993) y el compuesto puede incorporarse a la célula del animal o influir en el proceso normal del organismo.

El principio fundamental en el que se basan los bioensayos es que los organismos vivos son herramientas esenciales para evaluar la calidad del ambiente porque responden de manera integrada a los efectos adversos de las mezclas químicas complejas con las que están en contacto y cuya ecotoxicidad interesa conocer. Por lo tanto, permiten predecir los cambios actuales o potenciales que pueden ocurrir en los ecosistemas como consecuencia de la presencia de tóxicos.

Así, el objetivo primario de un bioensayo es determinar la toxicidad de una sustancia, una mezcla de ellas, o una muestra ambiental, que son objeto de examinación, los bioensayos siempre incluyen en su diseño la determinación de la toxicidad de un patrón toxicológico conocido o de referencia (Ronco *et al.*, 2004). Se considera un gran avance la incorporación de bioensayos en las evaluaciones ecotoxicológicas del medio acuático, generando un paradigma analítico más realista. De esa forma, la información fisicoquímica se complementa e integra con la biológica que es la expresión de las consecuencias de la exposición de un sistema vivo intacto en un ambiente alterado, en condiciones de estrés.

Los primeros conocimientos sobre los efectos de los metales en los organismos acuáticos se inician a principios del siglo XX (Norwood *et al.*, 2003). Éstos provienen de estudios experimentales basados en ensayos de toxicidad aguda y crónica, mediante los cuales se obtienen las concentraciones letales o efectivas para el 50% de la población analizada (LC50; EC50). La ventaja de dichos *tests* radica en su claridad, ya que los resultados obtenidos son de tipo “todo o nada”. A partir de estos valores las agencias internacionales suelen establecer los niveles guía para la protección de la biota (OECD, 1981; EPA, 1984; APHA, 1989). Sin embargo, numerosas investigaciones han cuestionado la representatividad de tales métodos (Cairns, 1986; Heugens *et al.*, 2001). Esto se debe principalmente a que las concentraciones

determinadas por este tipo de ensayos son frecuentemente mayores a las presentes en los ambientes naturales y a que no contemplan los efectos inducidos por concentraciones menores, o ambientalmente más probables, capaces de generar estrés y alterar la eficacia biológica de las especies o la estabilidad de las poblaciones a largo plazo (Sibly & Calow, 1989; Cohen & Forward, 2005). Por lo tanto, la necesidad de obtener indicadores más sensibles y representativos a bajas dosis de contaminantes (utilizando generalmente concentraciones menores a las empleadas en los ensayos de letalidad), que permita detectar efectos subtóxicos y tomar medidas eficaces para mitigar los riesgos, promovió nuevos enfoques metodológicos (De Cohen & Janssen, 1997; Barata *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2010).

Los biomarcadores se consideran indicadores sensibles a efectos de contaminación tempranos que demuestran que las sustancias tóxicas han ingresado a un organismo y se han distribuido en sus tejidos produciendo efectos deletéreos (Sherry, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003) generando daños al ADN, a diversos órganos, al sistema endócrino y cambios en la función reproductiva, así como la pérdida del crecimiento, desequilibrios en la condición biológica general y la mortalidad (Sorensen *et al.*, 2001; Battaglin & Fairchild, 2002; Van der Ven *et al.*, 2003).

Si bien en la práctica no siempre resulta claro categorizar a un biomarcador, comúnmente se los divide en tres categorías: biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Los biomarcadores de exposición permiten la detección y medición de compuestos químicos, sus metabolitos o el producto de la interacción entre un agente xenobiótico y determinada molécula que puede ser medida en un compartimiento del organismo. Los biomarcadores de efecto miden respuestas bioquímicas, fisiológicas u otras alteraciones en los tejidos o los fluidos que pueden ser reconocidas y asociadas con posibles alteraciones en la salud o enfermedad de los organismos. Los biomarcadores de susceptibilidad indican la pérdida o adquisición de las habilidades de los organismos a responder al cambio provocado por un xenobiótico específico, incluyendo factores genéticos y cambios que alteren la susceptibilidad a dicha exposición (NRC, 1987; Van der Oost *et al.*, 2003).

Independientemente del tipo de biomarcador medido es sustancial la necesidad de estudiar el efecto deletéreo que se genera en los distintos niveles de organización biológica (nivel molecular, bioquímico y fisiológico), por la exposición a xenobióticos,

presentándose éstos como alertas tempranas de efecto (Sherry, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003).

Estas metodologías aportan una visión más integral y representativa de la contaminación real del ambiente particularmente sobre individuos, siendo muchas veces un desafío la extrapolación de efecto a niveles de organización superiores. Por ello, la relevancia ecológica de la incorporación de parámetros más sensibles en evaluaciones ecotoxicológicas debe sustentarse en el profundo conocimiento biológico de las especies prueba utilizadas a fin de permitir analizar los balances energéticos de los organismos y estimar las consecuencias poblacionales a mayor plazo.

1.4 Matriz de ensayo: sedimento artificial vs ambiental

Para poder realizar controles de calidad de la herramienta de diagnóstico, se trabaja con un sedimento control, el cual debe provenir de un sitio prístino, no contaminado, que debe garantizar la supervivencia y desarrollo normal de los organismos prueba. Este sedimento puede ser también formulado artificialmente (USEPA, 1992).

Hay un amplio rango de tipos de sedimentos naturales, relacionados con su origen, distribución del tamaño de partículas y contenido orgánico, entre otros. Además un sedimento natural particular puede no estar disponible en algún periodo del año (Naylor & Rodrigues, 1995), o su calidad puede verse alterada durante el muestreo, transporte o almacenamiento. A su vez, la presencia de fauna bentónica indígena o contaminantes traza pueden potencialmente modificar los resultados de un ensayo de toxicidad (Burton, 1992; Reynoldson *et al.*, 1994).

En los últimos años, el número de reportes experimentales con sedimentos artificiales en laboratorio ha ido en aumento (Naylor & Rodrigues, 1995; Clément & Cadier, 1998; Kemble *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Verrhiest *et al.*, 2002; Feiler *et al.*, 2004; Román *et al.*, 2007) debido a que estos estudios permiten evaluar los efectos de diversos tipos de contaminantes en los organismos acuáticos bajo condiciones preestablecidas.

Hay muchas ventajas en la utilización de sedimentos artificiales, entre ellas: (i) la posibilidad de ejercer un control riguroso, con características y propiedades conocidas,

para evaluar y predecir cómo los sedimentos naturales reaccionarán en contacto con los distintos tipos de contaminantes; (ii) la ausencia de microfauna nativa y contaminantes, que permiten una buena reproducibilidad; (iii) la posibilidad de permitir la supervivencia y el crecimiento de varios organismos; (iv) la posibilidad de comparación intra e inter laboratorios, como también con estudios de campo con sedimentos naturales; (v) la capacidad de ser almacenados sin grandes dificultades (Suedel & Rodgers, 1994); y (vi) la capacidad de proporcionar información sobre el comportamiento de las sustancias de forma individual o en mezclas complejas en función de la composición del sustrato (Campagna *et al.*, 2013).

Por lo tanto, el tipo de sedimento a utilizar puede variar según el objetivo del ensayo: para monitorear la precisión de una prueba de toxicidad es necesario minimizar la variación de las características fisicoquímicas del sedimento. Esto es generalmente más fácil con el uso de un sedimento formulado. Por otra parte el sedimento control colectado en el campo ha sido tradicionalmente utilizado en las investigaciones con fines de evaluación y monitoreo. El material de esta fuente resulta más confiable para estos propósitos debido a que refleja de manera más realista las verdaderas condiciones ambientales.

En suma la condición ineludible que requiere un sedimento control es la de carecer de carga tóxica, el resto de las características son adaptables a los requerimientos particulares de cada ensayo.

1.5 Anfípodos como organismos de ensayo

En la evaluación ecotoxicológica es crucial el uso de bioensayos estandarizados. Esto permite determinar que la respuesta generada en el grupo expuesto al tóxico se debe al efecto de la sustancia y no, entre otras posibilidades, a variaciones de la susceptibilidad propia de los organismos o a las condiciones de experimentación. También posibilita la comparación de resultados entre diferentes laboratorios o dentro del mismo laboratorio, a diferentes tiempos, camadas, operadores, etc. Varias organizaciones internacionales (OECD, 1993; ASTM, 1995; EC, 1997; USEPA, 1994, 2000), desde hace tiempo han estandarizado las metodologías para la realización de bioensayos con distintos organismos, basándose la gran mayoría en especies del hemisferio norte.

En la evaluación de ecotoxicidad de sedimentos se han desarrollado diversos ensayos con especies bentónicas, siendo los anfípodos usualmente elegidos como organismos

prueba. Esto se debe a que cumplen con muchos de los criterios utilizados para la selección de los organismos *test* (ASTM, 2003): son abundantes y un componente ecológicamente importante de las comunidades bentónicas marinas, de estuario y de agua dulce, se encuentran ampliamente distribuidos, viven en contacto directo con el sedimento, son fáciles de manipular y cultivar en el laboratorio, son tolerantes a diferentes características físico-químicas del sedimento y del agua, y tienen relativamente alta sensibilidad a los sedimentos contaminados en comparación con otros organismos bentónicos (Ingersoll *et al.*, 1997; ASTM, 2003).

Hyalella azteca es el anfípodo de agua dulce más utilizado en ecotoxicología. Su uso como organismo prueba se basa en el conocimiento tanto de su biología como de su respuesta a varias sustancias tóxicas en diferentes medios y condiciones de ensayo. Esta información es el resultado de décadas de estudio (Borgmann & Munawar, 1989; Ingersoll, 1995; Ingersoll *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004; Bartlett *et al.*, 2005; Borgmann *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008). *H. azteca* se encuentra generalmente en hábitats lénticos, como estanques, y ocasionalmente en hábitats lóticos, tales como arroyos, especialmente en aquellos con fondos de sedimentos finos (EC, 1997). Esta especie se distribuye en el hemisferio norte desde México Central hasta el límite con Canadá y Alaska. Los protocolos estandarizados para la realización de bioensayos con sedimentos fueron diseñados en función de los requerimientos y biología de *Hyalella azteca*. Sin embargo, hay una tendencia mundial a evaluar el impacto de los contaminantes en un sistema acuático particular a través del monitoreo ecotoxicológico con especies nativas (Rand *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2008). La necesidad de la utilización de especies nativas se hace evidente porque entre otras razones, estas especies, adaptadas a las características ambientales, pueden proporcionar resultados más realistas que los obtenidos a partir de especies exóticas.

Por lo tanto, debido a que las especies propuestas en los protocolos internacionales no son las mismas que encontramos en nuestros ecosistemas acuáticos, es muy importante evaluar el efecto de los contaminantes sobre especies autóctonas ya que estas pueden mostrar requerimientos y características diferentes a las de las especies recomendadas en dichos protocolos. Es recomendable que cada región geográfica tenga estandarizado diversos métodos de ensayo donde las especies autóctonas estén representadas (Silva *et al.*, 2007). En este estudio se han utilizado como organismos de ensayo dos especie de anfípodos nativos: *Hyalella curvispina* y *Hyalella pseudoazteca*.

1.6 Descripción de los organismos *tests* utilizados en los bioensayos

Organismos prueba: *Hyaella curvispina* (Figura 1.1) y *Hyaella pseudoazteca* (Figura 2.1).

Posición taxonómica

Clase	Crustacea
Orden	Anfípoda
Suborden	Gammaridea
Familia	Hyaellidae
Género	<i>Hyaella</i> Smith
Especie	<i>Hyaella curvispina</i> (Shoemaker, 1942) <i>Hyaella pseudoazteca</i> (Gonzalez & Watling, 2003)



Figura 1.1: Ejemplares adultos de *Hyaella curvispina*.



Figura 1.2: Ejemplares adultos de *Hyalella pseudoazteca*.

En esta tesis se identifica a las especies de anfípodos utilizadas en base a la clave taxonómica aportada por Peralta & Grosso (2009). A continuación se indican las características morfológicas identificadoras:

- Con el último pereómero y pleómeros con carena dorsal: *H. pseudoazteca*.
- Sin carena dorsal. Con espinas curvas en la rama interna del urópodo 1 del macho: complejo curvispina.
- Gnatopodo 2 del macho con propodo de forma triangular, margen palmar de contorno regular, palpo de la maxila 1 bien desarrollado, artejo distal del urópodo 3 igual o más corto que el pedúnculo. Rama interna del urópodo 1 del macho con setas curvas en la zona media de la cara lateral; artejo distal alargado y de largo similar al pedúnculo: *Hyalella curvispina*.

Hyalella curvispina

La zona de distribución de *H. curvispina* se extiende desde Cangallo y Río de Janeiro, en el norte, hasta Punta Arena e Islas Malvinas, en el límite sur. Es un anfípodo representativo del complejo zoobentónico de Sudamérica Austral y se encuentra en diversos hábitats de agua dulce tales como lagos, charcas y arroyos. Se alimenta principalmente de detritos, algas y bacterias asociados al sedimento y a las plantas vasculares acuáticas (macrófitas) (Grosso & Peralta, 1999).

Varios autores han aportado descripciones sistemáticas y de la distribución sudamericana de las especies del género. En nuestro país, Cavallieri (1955) realizó una extensa investigación sobre anfípodos de agua dulce de la República Argentina y

se refirió al género *Hyaella* Smith. I. 1874 como el más representativo entre los anfípodos dulceacuícolas que pueblan el continente americano.

H. curvispina, como el resto de los anfípodos, presenta un cuerpo comprimido, con apéndices natatorios en el pleon, y pereopodos divididos en dos grupos, los anteriores con funciones alimentarias y los posteriores ambulatorios. Se trata de pequeños crustáceos de agua dulce, normalmente epibentónicos y asociados a macrófitas.

La especie fue descrita originalmente por Shoemaker en 1942. La diagnosis de la especie según González (2001) es la siguiente: "Superficie del cuerpo lisa. Coxa 4 excavada posteriormente. Ojos pigmentados. Antena 1 más corta que la antena 2. Antena 2 igual a la mitad de la longitud del cuerpo. Incisivo de la mandíbula dentado. Palpo de la maxila 1 corto, lóbulo interno delgado, con dos setas apicales. Lóbulo interno de la maxila 2 con una gran seta en el margen interno. Longitud del propodo del gnatópodo 1 menor a dos veces la de su ancho máximo (cuadrangular), con forma de martillo, cara interna con cinco setas, espinas setosas en el borde disto-posterior y disto-anterior. Propodo del gnatópodo 2 ovalado, palma más larga que el margen posterior, pendiente ligeramente oblicua, borde anterior liso. Margen posterior del mero y carpo de pereiópodos 3 y 4 con cinco grupos marginales traseros de setas cortas; margen del propodo posterior con dos a cuatro grupos de setas. Pedúnculo del urópodo 3 con cinco setas grandes distales; rama externa más larga que el pedúnculo, ancho basal 2 veces o menos que el extremo de la rama. Telson más largo que ancho, redondeado apicalmente, con más de dos setas simples, largas y cortas, simétricamente distribuidas, ocasionalmente con setas más cortas cerca de las setas principales. Branquias esternas en los segmentos 2 al 7."

Es escasa la información bibliográfica sobre los aspectos poblacionales de *H. curvispina*. García González & Souto (1987) realizaron observaciones sobre la reproducción, identificando un apareamiento específico entre machos y hembras caracterizadas por un amplexo de varios días. Casset *et al.* (2001) estudiaron una población de *H. curvispina* en el arroyo Las Flores (Pcia. de Bs. As.) y señalaron que la mayor abundancia coincide con la mayor fecundidad en el mes de septiembre y que la biomasa máxima se observa en octubre, dado el crecimiento de las crías nacidas y de los juveniles. También informaron una fecundidad de entre 8 y 15 huevos por hembra.

En un estudio preliminar sobre la composición nutricional de la población en el mismo arroyo, Poretti *et al.* (2003) observaron una mayor proporción de lípidos y menor proporción de proteínas, coincidente con la época de mayor reproducción (septiembre

y octubre), principalmente en machos adultos. Dutra *et al.* (2008) reportaron variaciones estacionales en la composición bioquímica de esta especie.

Es muy escasa también la información sobre las etapas de crecimiento y desarrollo de *H. curvispina*. García (2009) identificó 3 edades en función de la longitud del cuerpo y estimó el tiempo aproximado en que los animales llegan a cada estadio y permanecen en él. Recientemente Peluso (2011) indicó intervalos de tamaño mayores que los reportados por García (2009) para el estado de desarrollo correspondiente a juveniles, en tanto que Doyle (2007) consideró para individuos de *H. curvispina* provenientes de cultivo de laboratorio otros rangos de tamaño para definir edades.

H. curvispina es taxonómicamente cercana a *H. azteca* y abundante en cuerpos de agua dulce de la región pampásica. Teniendo esto en consideración, desde hace algunos años en Argentina se vienen realizando esfuerzos para evaluar efectos de contaminación de agua y sedimentos sobre *H. curvispina* (Di Marzio *et al.*, 1999; 2005; Jergentz *et al.*, 2004; Doyle, 2007; García, 2009; García *et al.*, 2010; Peluso, 2011; Peluso *et al.*, 2011; Mugni *et al.*, 2011). Por lo tanto, por varias razones, incluyendo su amplia distribución geográfica, fácil cría en laboratorio y por ser parte de la fauna nativa en el área, hay una creciente preocupación por ampliar el conocimiento tanto de su biología como su respuesta a diferentes agentes tóxicos.

Hyaella pseudoazteca

H. pseudoazteca fue descrita por González & Watling (2003). Los autores reportaron que esta especie presenta una morfología similar a *H. azteca* (Saussure, 1858). Sin embargo, *H. pseudoazteca* tiene carena en el pereomero 7 y pleomeros 1 y 2, dos setas distales en la placa interna de la maxila 1, y una seta en el margen interno de la maxila 2. Esta especie se ha citado para la Reserva Ecológica de Taim, Estado de Rio Grande do Sul, Brasil (32° 27' S; 52° 38' W) (González & Watling, 2003) y el arroyo las Flores (Pcia. de Buenos Aires) (Peralta & Grosso, 2009). Recientemente, De Los Ríos-Escalante *et al.* (2010) estudiaron el patrón de distribución de especies Sudamericanas del género *Hyaella* mediante una aproximación panbiogeográfica, e incluyeron a *H. pseudoazteca* en el trazo generalizado Pampas. Este trazo comprende aguas interiores (continentales) cercanas a la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires (35 °S) en el centro de Argentina a Uruguay y sur de Brasil (19 °S). Puesto que ambas especies coexisten en el sitio de colecta de animales y de sedimento control se evaluó el potencial de *H. pseudoazteca* como organismo prueba con fines comparativos.

1.7 Algunas consideraciones finales

En nuestro país los resultados de los bioensayos son incorporados en la evaluación de calidad de aguas a partir de la Ley Nacional 24051 de Residuos Peligrosos, decreto Reglamentario 831/93 y la Resolución Interna de la Secretaría de Recursos Naturales y de Ambiente Humano, faltando aún la adaptación de los mismos a las características particulares de los cuerpos de agua de nuestro territorio (Porta, 1996). Por lo tanto, la incorporación de bioensayos en el monitoreo biológico de sustancias tóxicas en Argentina requiere del desarrollo e instrumentación de diversos temas, que cubran aspectos tales como generación de metodologías adecuadas adaptadas a nuestras necesidades, aprovechamiento de la experiencia existente en otros países tanto en lo metodológico como en la información en banco de datos, selección de ensayos según las especies a utilizar, efectos a evaluar, niveles de organización, localización biogeográfica, objetivo de la evaluación, entre otros aspectos (Ronco *et al.*, 1995). La tendencia a nivel nacional es la implementación de bioensayos con especies autóctonas con protocolos desarrollados para especies y ecosistemas del hemisferio norte por agencias de control como US-EPA, Environmental Canada, OECD, entre otros. Si bien esta práctica ha suplido hasta ahora la ausencia de información y desarrollo experimental regional, no contempla las características particulares de nuestros ambientes. Por otra parte el desarrollo del campo disciplinar ecotoxicológico nacional se ha enriquecido notablemente en los últimos 20 años, aportando un bagaje de información y experiencia que advierten sobre la necesidad de adaptar la protocolización experimental original para su uso en la evaluación de riesgo de nuestros ecosistemas. En este sentido se registran importantes avances en cuanto a la evaluación de calidad de aguas superficiales, no así para evaluación de sedimentos. El presente trabajo busca el desarrollo, adaptación de protocolos de bioensayo y la incorporación de nuevos parámetros de efecto temprano para su uso con especies bentónicas autóctonas, de amplia distribución en los cuerpos de agua de la Argentina, tanto lóticos como lénticos. Desarrollando esos protocolos el significado ecológico del bioensayo se ve favorecido y su calidad como herramienta de gestión y control mejora sustancialmente.

CAPITULO 2

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La Hipótesis de trabajo de esta Tesis se basa en que contaminantes de origen antrópico repercutirán en la calidad de los sedimentos y columna de agua asociada a los mismos y por lo tanto en la biota allí presente, pudiendo provocar cambios de algunos de sus parámetros funcionales basales, superando los límites de sus capacidades homeostáticas. De modo tal que el estudio de los parámetros de efecto en los organismos bentónicos propuestos permitirá evaluar la calidad toxicológica de los sedimentos.

2.2 Objetivos Generales

El estudio tiene por objetivo básico evaluar los efectos de sedimentos contaminados con metales pesados (como tóxicos referentes) sobre los anfípodos dulceacuícolas *Hyalella curvispina* y *Hyalella pseudoazteca* y utilizar esa información para desarrollar protocolos de bioensayos que utilicen esas especies bentónicas autóctonas para la evaluación de ecotoxicidad de muestras ambientales. Dicho objetivo se alcanzará mediante la caracterización de sus respuestas a los tóxicos seleccionados en bioensayos de laboratorio evaluando parámetros tradicionales e indicadores tempranos de efecto. Se pretende de esta forma contribuir al estudio y a la evaluación de la calidad ambiental mediante la aplicación de metodologías y técnicas que permitan el monitoreo de la contaminación de los ambientes acuáticos regionales.

2.2.1 Objetivos particulares

- Ajustar una metodología de cultivo de *H. curvispina* en condiciones de laboratorio para su uso en experimentación.

- Adaptar e incorporar ensayos ecotoxicológicos estandarizados para las especies del hemisferio norte a las particularidades de las especies autóctonas para su uso en la evaluación del riesgo ambiental por sedimentos contaminados.
- Evaluar efectos letales y subletales en *H. curvispina* y *H. pseudoazteca* por medio de bioensayos de toxicidad agudos y subcrónicos en matriz acuosa y sólida con tóxicos de referencia (Cd y Cu), utilizando parámetros de efecto tradicionales (supervivencia y crecimiento).
- Investigar la utilidad del Índice de Masa Corporal (IMC) como nuevo parámetro evaluador de efecto subletal.
- Desarrollar nuevos puntos finales de efecto temprano para ensayos con anfípodos en matriz sólida y acuosa.
- Valoración de puntos finales tradicionales y de efecto temprano como herramientas de uso en ensayos de evaluación de calidad de sedimentos ambientales de la región.
- Contribuir al establecimiento de líneas de base para los distintos parámetros de evaluación propuestos en *H. curvispina*.

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS GENERAL

En este capítulo se describe la metodología común seguida durante el desarrollo experimental de la tesis así como lo referente a los organismos de ensayo. En la sección Materiales y Métodos de cada capítulo se detallarán las metodologías específicas.

3.1 Organismos de ensayo

Los animales utilizados en esta tesis, de ambas especies, procedieron inicialmente de las poblaciones del arroyo Las Flores, donde se los halla asociados a las macrófitas *Egeria densa* y *Ceratophyllum demersum* (Casset *et al.*, 2001). La optimización de la cría y mantenimiento de los organismos de ensayo forma parte de este trabajo y se describe en el capítulo 4.

3.1.1 Descripción del ambiente de origen

El arroyo Las Flores (59°07'O y 34°29'S) pertenece a la cuenca del río Luján, que atraviesa la zona noreste de la Provincia de Buenos Aires (Fig. 3.5). El clima de la zona es templado-húmedo; el mes más frío del año es julio con una temperatura media inferior a los 10 °C y el más cálido es enero con una media de 22°C (Fidalgo, 1983).

Este arroyo presenta un curso permanente; es afluente de segundo orden del río Luján, con un recorrido aproximado de 20 km. Regionalmente se lo considera un arroyo de un nivel intermedio de eutrofia (Feijoó *et al.*, 1999; Giorgi *et al.*, 2000; Casset *et al.*, 2001). El cauce, casi léntico, presenta algunas zonas más rápidas; su ancho varía entre 0,6 y 11 m y su profundidad no excede los 2 m, aún en momentos de creciente. Registra velocidades de corriente de hasta 1 m/s dependiendo de la cantidad de lluvia caída (Gantes & Tur, 1995).

El arroyo La Flores recibe escasa influencia humana ya que no existen industrias ni centros urbanos importantes sobre su cuenca de drenaje y la mayoría de los terrenos que lo rodean se dedican a la cría de caballos; sus aguas son utilizadas como potables por algunos habitantes de la zona (Poretti *et al.*, 2003). Por lo tanto, este arroyo es considerado un cuerpo de agua no poluido, adecuado como provisión de organismos para su utilización en ensayos de toxicidad en laboratorio.

3.1.2 Cría y mantenimiento de los organismos de ensayo

Los animales utilizados en los ensayos provinieron de tres fuentes diferentes, cultivos de laboratorio *indoor* y *outdoor* y animales recolectados en campo.

Cultivos indoor

Los individuos de *H. curvispina* fueron colocados en un estanque de polipropileno de 80 L, mientras que los ejemplares de *H. pseudoazteca* se dispusieron en dos estanques de 40 L del mismo material. En todos los casos se utilizó como medio de cultivo agua de red no clorada (caracterización ítem 4.2, capítulo 4) y se colocó como sustrato y refugio un fondo de arena autoclavada y plantas colectadas en el sitio de muestreo, previamente lavadas. Para mayor detalle ver ítem 4.2, capítulo 4.

Cultivos outdoor

Una fracción de los individuos traídos del campo y separados en laboratorio, se colocó en piletas plásticas (2,6m x 1,6m x 0,65m) dispuestas a la intemperie (una para cada especie), conteniendo agua de cultivo y plantas recolectadas en el sitio de muestreo. También se colocó una media sombra para evitar la insolación directa y periódicamente se agregó agua a fin de reponer la que se pierde por evaporación. Se estableció en este ambiente una situación intermedia entre campo y laboratorio. Para mayor detalle ver ítem 4.2, capítulo 4.

Animales recolectados en campo

Cuando se utilizaron anfípodos silvestres para experimentación éstos fueron recolectados del arroyo Las Flores y aclimatados a las condiciones de laboratorio (ítem 4.2, capítulo 4). Una vez acondicionados fueron colocados en contenedores plásticos con plantas locales y mantenidos bajo condiciones de cultivo *indoor* durante 10 días. Posteriormente por tamizado se separaron los animales a utilizar en los ensayos,

machos (>5mm) que fueron aclimatados bajo las condiciones generales de ensayo (ítem 3.3 del presente capítulo) durante una semana, previa al inicio de los experimentos correspondientes.

3.1.3 Edades de los organismos prueba utilizados en bioensayos

Hyaella curvispina

Con el objetivo de evaluar una posible respuesta diferencial entre distintos estadios del ciclo de vida de esta especie se realizaron ensayos con juveniles (2-4,5 mm) y machos (individuos mayores a 5 mm). La selección de tamaño se realizó en función de los resultados obtenidos durante este estudio (capítulos 5 a 8) y los reportados por Doyle (2007) y García (2009).

La selección de juveniles como edad de ensayo se basó en su facilidad de manipulación y las recomendaciones de García (2009). En relación a los adultos se planteó como deseable evitar actividad reproductiva durante los experimentos razón por la cual se utilizaron machos evitando así potencial sexual durante los ensayos (Sornom *et al.*, 2010; Vellinger *et al.*, 2013), disminución de variabilidad de respuesta o posibles diferencias en la sensibilidad entre géneros, y en particular la variabilidad debida a las diferentes etapas de maduración gonadal y/o gestacional en las hembras, de muy difícil determinación en vivo.

Hyaella pseudoazteca

Con el objetivo de realizar comparaciones entre ambas especies, se utilizaron los mismos estadios del ciclo de vida evaluados en *H. curvispina*: juveniles (2-3,5 mm) y machos (individuos mayores a 4,5 mm). La selección de tamaño se realizó en función de resultados preliminares obtenidos a partir de observaciones realizadas en el laboratorio.

3.2 Tóxicos utilizados

Se seleccionaron dos metales pesados: Cadmio y Cobre.

La selección se fundamentó en su relevancia ambiental, en su uso como tóxicos referentes (Borgman *et al.*, 1989; ASTM 1991, 1993, 1995; USEPA, 1991 a, b, c, 1994;

EC, 1995) y en la probada sensibilidad de *H. curvispina* a metales pesados (García, 2009).

Los reactivos utilizados (calidad pro análisis) fueron:

-Cloruro de cadmio, (Cd), J.T. Baker, Número CAS 10108-64-2, Fórmula molecular $\text{Cl}_2\text{Cd}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

-Sulfato de cobre, (Cu), Mallinckrodt, Número CAS 7758-98-7, Fórmula molecular CuSO_4 .

3.3 Bioensayos

Las matrices de exposición ensayadas fueron: matriz acuosa, sedimento adicionado, agua de poro y muestras ambientales (sedimento natural completo y agua de poro obtenida del mismo).

El diseño de los ensayos siguió los lineamientos para bioensayos de toxicidad con especies estandarizadas (EC, 1994; EC, 1997 y USEPA, 2000).

En los capítulos correspondientes se detallaran las particularidades metodológicas. A continuación se enumeran las condiciones generales de ensayo, comunes a todos los bioensayos realizados.

- Temperatura: $23^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- Fotoperíodo: 16h luz, 8 h oscuridad.
- Medio de dilución: agua reconstituida moderadamente dura (MHW) de la siguiente composición química: NaHCO_3 , 96mg/L; $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60mg/L; MgSO_4 , 60 mg/L; KCl, 4mg/L; pH, 7,4-7,8; dureza, 80-100mg CO_3Ca /L) (Weber, 1993).
- Renovación del medio: sin renovación (ensayos estáticos de 96h, 10 y 28 días).
- Densidad: 10 animales cada 200ml (bioensayos en matriz acuosa); 10 animales cada 175 ml de agua sobrenadante (OW) y 100 ml de sedimento (bioensayos en matriz sólida)
- Aireación: continua.

- Alimento comercial para peces “TetraFin®” compuesto por (%): carbohidratos 30,0; proteínas 42,7; grasas 10,5; cenizas 10,5; humedad 6,3; y valor de energía bruta de 14,316 J.g-1.
- Alimentación: la ración de alimento se determinó en función de experimentos previos (ítem 4.3, capítulo 4) y observaciones realizadas en laboratorio. La frecuencia de alimentación varió de acuerdo al tipo de ensayo realizado, pero manteniendo siempre la proporción mg alimento/individuo.
- Aclimatación: una semana previa al inicio del ensayo en MHW; TetraFin® molido *ad libitum*; fotoperíodo 16L-8O; temperatura $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$; tul como sustrato (EC, 1997).
- Determinaciones fisicoquímicas en agua y OW a tiempo inicial y final de ensayo: pH; Dureza; Oxígeno Disuelto; Conductividad y Concentración de N-NH_4^+ . Los métodos se encuentran detallados en el ítem 3.6 del presente capítulo.

3.4 Parámetros de efecto (Puntos Finales)

En función de los objetivos planteados, los puntos finales seleccionados se dividen en dos categorías:

- Puntos finales tradicionales
- Puntos finales de efecto temprano

A continuación se detalla la metodología utilizada en la determinación de cada uno.

3.4.1 Puntos finales tradicionales

Sobrevivencia

Se consideró la sobrevivencia relativa al tiempo inicial, realizando el recuento de individuos en el control y en cada tratamiento. En los ensayos con sedimento sólo se contabilizó el número de animales a tiempo final de exposición, en tanto que en medio acuoso, según el objetivo planteado, se realizaron controles de sobrevivencia a tiempos intermedios.

Crecimiento

El crecimiento fue considerado como el incremento en longitud y biomasa/peso corporal en relación al grupo inicial (tiempo de exposición cero/tiempo inicial).

La longitud, definida como la distancia desde el primer par de antenas hasta el final del telson, fue medida con un calibre digital (0,01 mm) bajo microscopio estereoscópico, colocando al individuo en posición estirada (Doyle & Momo, 2009).

Luego de ser medidos, los animales fueron individualmente secados a 60°C hasta obtener peso constante en una balanza analítica Mettler (precisión < 0,01 mg). La biomasa fue expresada como peso seco.

Índice de masa corporal (IMC)

Se calculó como:

$$\left(\frac{\text{peso seco}}{\text{longitud}^2}\right) * 100$$

Se incorporó a los parámetros medidos como indicador del *fitness* de los animales.

Concentración de metales en tejidos

Se siguió el protocolo de Borgmann *et al.* (1991), con algunas modificaciones. Al final del periodo de exposición los animales fueron colocados en EDTA (50 µM) durante 24 hs, a fin de eliminar contenido intestinal. Luego de ser medidos, secados y pesados (con el fin de obtener datos sobre los parámetros de crecimiento) *pool*es de individuos de una misma réplica (aproximadamente 4 mg de masa) fueron colocados en 100 ml de HNO₃ durante una semana. Posteriormente se adicionaron 65,5 ml de H₂O₂ (Merck), luego de 24 h la solución fue llevada a un volumen de 5 ml con agua miliQ (MLQ) y destinada para procedimiento analítico. La carga corporal de Cu o Cd se expresó como: µg metal/g PS (peso seco). Todas las determinaciones fueron realizadas mediante espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (Equipo: Analyst 200 de Perkin Elmer; límite de detección de <5 µg/L para Cu y <1 µg/L para Cd).

Concentración Letal 50 (CL50)

Se evaluó la mortalidad acumulada a diferentes tiempos. La estimación de las CL50 y los intervalos de confianza 95% se realizaron mediante el método Probit utilizando la versión EPA 1.5 (Norberg-King 1993).

3.4.2 Puntos finales de efecto temprano (Biomarcadores)

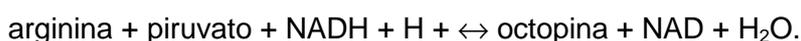
Al final del periodo de exposición, los animales destinados para la determinación de parámetros bioquímicos fueron inmediatamente crioconservados a -80°C .

A excepción de la actividad del Sistema de Transporte de Electrones (ETS), las determinaciones metabólicas fueron realizadas en homogenatos totales, en *pooles* de individuos.

En los capítulos correspondientes (7 y 8) se detalla la cantidad de *pooles* empleados, el número de individuos por *pool* y las determinaciones realizadas sobre cada uno de ellos.

Arginina fosfato

El método utilizado para la determinación de arginina fosfato fue el descrito por Bergmeyer (1985). La arginina se determina por el cambio en la absorbancia a 339 nm en la reacción catalizada por la octopina deshidrogenasa:



La hidrólisis de arginina fosfato se produce a pH ácido. Para la reacción se agregan a 100 μl de homogenato, 100 μl de HCl 1 M y 200 μL de agua MLQ. Se incuba a 100°C por 90 segundos. El hidrolizado se enfría, se neutraliza con 100 μl de NaOH 1 M. Se repite la determinación de arginina y al valor obtenido se le resta el valor inicial. Este equivale al valor de arginina fosfato. Los resultados se expresan en mmol/g.

Glucógeno

El glucógeno fue extraído acorde al método descrito por Van Handel (1965). Los niveles de glucógeno se determinaron como equivalentes de glucosa, después de una hidrólisis ácida y neutralización como describen Geary *et al.* (1981).

Extracción del glucógeno:

Los animales crioconservados fueron colocados en *pooles*, cada *pool* fue pesado (precisión 0,01 mg) y transferido a un eppendorf, en el que se realizó la digestión básica mediante agregado de 400 µl de KOH al 30%, luego se colocaron en baño a 100°C durante un tiempo no inferior a 4 h, o hasta observar a los animales transparentes. Luego de retirar los tubos del baño se agregaron a cada uno de ellos 2 gotas de Na₂SO₄, se agitaron, se agregaron 900 µl de etanol absoluto y se mezcló nuevamente, se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se realizó el lavado, disolviendo el precipitado en 400 µl de agua destilada en ebullición y agitando para favorecer la resuspensión del material. Nuevamente se agregaron 900 µl de etanol absoluto, se agitó, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Esta etapa de lavado se repitió tres veces.

Dosaje del glucógeno:

El precipitado se resuspendió en 300 µl de agua destilada en ebullición, se tomaron 100 µl de muestra y se realizó una hidrólisis ácida agregando 100 µl de HCl 4N y calentando a 100°C por 60 minutos. Luego las muestras se neutralizaron agregando 100 µl de Na₂CO₃ 2M. Cada eppendorf fue agitado cuidadosamente en vortex hasta observar la liberación de la totalidad del CO₂ formado (cese de burbujeo).

Curva de calibración:

La curva de calibración se realizó utilizando como patrón una solución de 1mg/ml de glucógeno de hígado de conejo (Sigma). Se procedió de la siguiente manera:

Patrón	Glucógeno (ml)	HCl (4N)
P1	0,10	0,40
P2	0,15	0,35
P3	0,20	0,30

Al igual que las muestras, los patrones (P1, P2 y P3) se colocaron a 100°C por 60 minutos. Luego se agregaron 500 µl de Na₂CO₃ 2M y se procedió del modo previamente mencionado para liberar el CO₂.

La glucosa fue cuantificada utilizando un *kit* Labtest-glucosa-oxidasa (N° de catálogo: 84-1/500).

Blanco (kit)	1ml de Reactivo 1(*)
Patrones de glucosa (kit)	0,06ml del Patrón de glucosa (**)+1ml de Reactivo 1
Patrones de glucógeno	0,06ml de Patrón de glucógeno+1ml de Reactivo 1
Muestras	0,06ml de muestra+1ml de Reactivo 1

Los tubos se colocaron en baño a 37°C por 15 minutos y se leyó a 500nm.

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa:



El peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminoantipirina y fenol, bajo acción catalizadora de la peroxidasa (POD), a través de una reacción oxidativa de acoplamiento, formando una antipirilquinonimina roja cuya intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.



Reactivo 1(*): Contiene solución tampón 50 mmol, pH 7,5; fenol ≥ 1 mmol/L; glucosa oxidasa ≥ 11000 U/L; peroxidasa ≥ 700 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 $\mu\text{mol/L}$; azida sódica 0,05%; estabilizadores y surfactantes.

Patrón de glucosa(**): Contiene glucosa 100mg/dL y biocida no tóxico.

Cálculos:

1- Se realizó una regresión lineal entre las curvas de glucosa y glucógeno.

$$2- \text{Factor de calibración (FC)} = \sum\left(\frac{E}{Q}\right)/3$$

Donde: E es la concentración de glucosa esperada en el patrón de glucógeno (g/100ml) y Q es la concentración de glucosa obtenida (mg/dL).

$$3- \text{Glucógeno} = (\text{mg glucosa/dL} * \text{FC} * \text{dilución})/100 * \text{Peso(g)} * 10$$

Proteínas totales

Las proteínas fueron medidas utilizando el *kit* comercial Labtest (N° de catálogo: 99), basado en el método de Biuret. Los iones (Cu^{2+}) en medio alcalino (Reactivo de Biuret)

reaccionan con los enlaces peptídicos de las proteínas séricas formando un color púrpura, que tiene absorbancia máxima a 545 nm, proporcional a la concentración de proteínas en la muestra. Los resultados fueron expresados en mg/ml.

	Reativo Biuret (*) (ml)	Agua destilada (μl)	Solución patrón (**) (μl)	Muestra (μl)
Blanco	1	10	----	----
Patrón	1	----	10	----
Muestra	1	----	----	10

Se colocó en baño a 37°C por 10 minutos.

(*) Reactivo Biuret: contiene hidróxido de sodio 600 mmol/L, sulfato de cobre 12 mmol/L, estabilizador y antioxidante.

(**) Patrón: contiene albúmina bovina 4g/dL y azida sódica 14,6 mmol/L.

Cálculos:

$$\text{Proteínas Totales} = \text{lectura muestra} * \text{factor de calibración} * 10$$

$$\text{Factor de calibración} = \left(\frac{4}{\text{lectura patrón}} \right)$$

Lípidos totales

Extracción:

Los lípidos totales fueron extraídos usando el método de cloroformo:metanol (2:1), descrito por Folch *et al.* (1957)

Los animales se pesaron por grupo en eppendorfs. Se llevó a cabo una dilución de la masa con la mezcla cloroformo:metanol (2:1) al 40%. Se realizó el homogenato y se colocó en tubos de vidrio cerrados con tapa esmerilada que fueron conservados en heladera por 24h.

Para eliminar restos de exoesqueleto, las muestras se filtraron y se transvasaron a tubos de vidrio cónicos graduados, se registró el volumen. Se agregó NaCl 0,9% siguiendo una relación 10 ml homogenato:2 ml solución fisiológica fría. Se centrifugó a temperatura ambiente a 2000 rpm por 10 minutos. Se forman 2 fases, se retiró el sobrenadante y el material que quedó en la interfase. Se registró el volumen

remanente y en función del mismo se agregó nuevamente solución fisiológica y se centrifugó. Se conservó la fase inferior y se colocó en heladera por 24 h. Esta fracción fue utilizada para el dosaje de lípidos totales triglicéridos.

Dosaje de Lípidos Totales:

Los lípidos totales fueron determinados por el método de la sulfovanilina (Meyer & Walter, 1980). Este método consiste en la oxidación de lípidos celulares a pequeños fragmentos después de una digestión química con ácido sulfúrico concentrado caliente. Luego de la adición de una solución de vanilina (0,016M) y ácido fosfórico (0,44M), se forma un complejo rojo que es medido con espectrofotómetro (530 nm). Los resultados fueron expresados en mg/g.

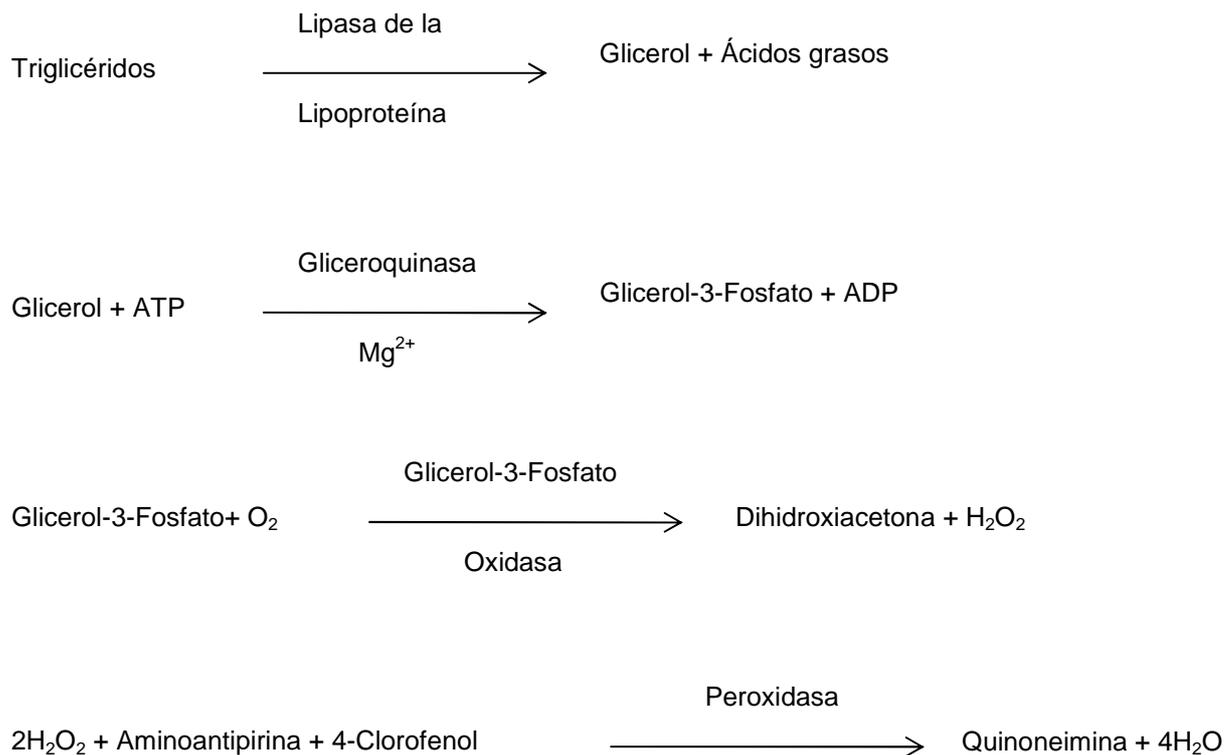
	Ácido sulfúrico (ml)	Solución patrón (μ l)	Muestra (μ l)		Vanilina (ml)
Blanco	1	----	----	Mezclar Baño 100°C 10 minutos	2,5
Patrón	1	20	----		2,5
Muestra	1	----	20		2,5

Cálculo:

$$\text{Lípidos Totales} = \frac{\left(\text{lectura} \frac{\text{muestras}}{\text{patrón}} \right) * 10 * \text{dilución}}{100 * \text{peso (g)}}$$

Triglicéridos

Los triglicéridos fueron medidos por la reacción de la lipasa, glicerokinasa, glicerolfosfato oxidasa y enzimas peroxidasas (*kit* Labtest, N° de catálogo: 87-2/100). La lipasa de la lipoproteína promueve la hidrólisis de los triglicéridos liberando glicerol, que es convertido por la acción de la glicerokinasa en glicerol-3-fosfato. Este es oxidado a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno en presencia de la glicerolfosfato oxidasa. A continuación, ocurre una reacción de ligazón entre peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y 4-clorofenol, catalizada por la peroxidasa y produciendo la quinoneimina, que tiene un máximo de absorbancia en 505 nm. La intensidad del color formado es directamente proporcional a la concentración de los triglicéridos en la muestra. Los resultados se expresaron como mg/g de animales.



	Reativo 1 (*) (ml)	Solución patrón (**) (μl)	Muestra (μl)
Blanco	1	----	----
Patrón	1	5	----
Muestra	1	----	5

Se mezcló y dejó 30 minutos a temperatura ambiente.

(*)Reactivo 1: contiene buffer 50 mmol/L; pH 7,0; iones de magnesio 4 mmol/L; 4-clorofenol 2,70 mmol/L; 4 aminoantipirina μmol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipasa de la lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinasa ≥ 1000 U/L; glicerolfosfato oxidasa ≥ 1500 U/L; peroxidasa ≥ 900 U/L y azida sódica 0,095%.

(**) Patrón: contiene triglicéridos 200 mg/dL y azida sódica 0,045%.

Cálculo:

$$\text{Triglicéridos} = \frac{\left(\text{lectura} \frac{\text{muestras}}{\text{patrón}} \right) * 2 * \text{dilución}}{100 * \text{peso (g)}}$$

Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de superóxido dismutasa fue determinada midiendo la autooxidación de la adrenalina como es descrito por Misra & Fridovich (1972).

Para la reacción en la cubeta se colocan 1000 μL de buffer glicina 50 mM, se lee a 480 nm y se lleva a cero, luego se agregan 17 μL de adrenalina 1 mM y se realizan ocho lecturas (esto equivale a lectura basal y es el término "a"). Para cada muestra se incuban 3 volúmenes diferentes (50, 25 y 10 μL de homogenato) llevando a 1000 μL con buffer. En cada caso, las lecturas se inician luego de agregar 17 μL 1 mM de adrenalina (estas lecturas corresponden al término "b").

Para el cálculo se registran las pendientes obtenidas y para cada muestra se calcula $\log b/a$. Se grafica $\log b/a$ vs volumen de homogenato y por interpolación se estiman μL de homogenato que producen el 50% ($b/a = 0,5$).

La actividad de SOD se reportó como la capacidad de producir el 50% de inhibición. Los resultados se expresaron como Unidades de SOD/mg de proteína; una unidad se define como la tasa de inhibición del 50%.

Catalasa (CAT)

La actividad de catalasa se determinó midiendo la desaparición exponencial de H_2O_2 a 240 nm, y fue expresada como pmoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ de proteína/min de acuerdo con Boveris & Chance (1972). Para la reacción (en cubeta de cuarzo) se colocan 1000 μL de buffer fosfato, se lee y lleva a cero. Para cada muestra se colocan 10 μL de homogenato, se lleva a 1000 μL con buffer, se lee y luego se agregan 35 μL de H_2O_2 , se lee 8 veces. CAT se calcula como: $\text{pendiente}/4,6 \times 10^{-7} \times \mu\text{L de muestra} \times [\text{proteínas}]$.

Lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación fueron cuantificados por el método de Buege & Aust (1978), midiendo sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando el método de extracción de Llesuy *et al.* (1985). Los resultados fueron expresados en nmol of TBARS/mg de proteína.

Preparación de homogenatos:

Se siguió la relación 1 g de tejido húmedo/7 ml de KCl 1,15% y 1ml de KCl 1,15%/ 10 μl de y fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

Procedimiento experimental:

Se colocaron en eppendorf 150 μ l de ácido tricloroacético (TCA-10%), 50 μ l de homogenato, 100 μ l de ácido tiobarbitúrico (TBA-0,67%) y 50 μ l de agua destilada. El blanco se realizó del mismo modo pero sustituyendo la muestra por agua. La mezcla fue calentada a 100°C por 15 minutos.

Luego de enfriar se adicionó 300 μ l de alcohol n-butílico y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. Se forman dos fases, la lectura se realizó sobre la fase superior a 535 nm.

Cálculo:

$$C = \frac{A * \left(\frac{\text{dilución}}{\epsilon}\right)}{\text{concentración de proteínas}}$$

Donde:

C: concentración de TBARS en nmol/mg de proteína

A: absorbancia de la muestra

ϵ : 1,5X10 M cm

Dilución/ ϵ = 38,46

Na⁺/K⁺ ATPasa

Para la determinación de la actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa, la membrana fue extraída acorde a Barnes *et al.* (1993). El *pool* de individuos fue homogeneizado (10% P/V) en buffer Tris frío (40 mM) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (1 mM; Sigma) con pH ajustado a 7,4. El homogenato fue centrifugado a 10000 g (4°C) y el sobrenadante fue colectado y centrifugado nuevamente a 40000 g (4°C). El pellet fue resuspendido en el mismo buffer y centrifugado nuevamente a 40000 g (4°C). Este último sobrenadante fue utilizado como la fuente de Na⁺/K⁺ ATPasa. La actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa fue medida acorde a Esmann (1988). El medio de incubación **A** contiene ATP (5 mM; Sigma), NaCl (60 mM), KCl (10 mM) y MgCl (40 mM), con pH ajustado a 7,4. En el medio de incubación **B**, el KCl fue reemplazado por ouabaina (1mM; Sigma). Alícuotas de homogenato fueron incubados a 30°C en medio A y B por 30 minutos. La reacción enzimática fue finalizada adhiriendo ácido tricloroacético 10%. El fósforo inorgánico fue

determinado utilizando el método de Chan & Swaminathan (1986). Los resultados fueron expresados en μmol de Pi/mg proteína/min.

Sistema de transporte de electrones (ETS)

La energía consumida a nivel mitocondrial fue medida como la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS), basada sobre la determinación espectrofotométrica del INT (p-IodoNitroTetrazolium Violeta; Sigma, USA). La técnica original fue modificada basada en las técnicas de Owens & King (1975); Kenner & Ahmed (1975) y De Coen & Janssen (2003). Los animales crioconservados fueron pesados individualmente (precisión 0,01 mg). Luego fueron homogeneizados en buffer de homogeneización frío [0.1M Tris-HCl buffer pH 8,5, 15% (p/v) polivinilpirrolidona, 153 μM MgSO_4 , 0.2% (v/v) Triton-X- 100] en una proporción 5 mg/ml buffer. Los homogenatos de las muestras se centrifugaron a 4 °C, 3000 g por 10 min. La reacción se realizó en tubos de vidrio: se colocaron 100 μl del extracto sobrenadante junto con 300 μl de buffer sustrato (0,13 M Tris-HCl pH 8,5 y 0,3% (p/v) Triton X-100, pH 8,5) y 100 μl de solución NADPH (1,7 mM NADH y 250 μl NADPH). La reacción fue inducida agregando 100 μl INT (p-IodoNitroTetrazolium 8 mM, pH 7,5) y los tubos se incubaron a 30°C por 20 minutos. La reacción fue finalizada con 100 μL de solución stop [formalina (conc): H_3PO_4 (conc.) = 1:1]. El formazan producido fue determinado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la muestra a 490 nm contra el blanco. La actividad de ETS fue calculada como=

$$ETS = \frac{\text{Abs } 490 \text{ nm} * V_r * V_h * 60}{V_a * S * t * 1,42}$$

donde Abs 490 nm es la absorción de la muestra; V_r es el volumen final de la mezcla de reacción (mL); V_h es el volumen del homogenato original (mL); V_a es el volumen de la alícuota del homogenato (mL); S es el tamaño de la muestra (mg masa húmeda); t es el tiempo de incubación (min); 1,42 es el factor de conversión a volumen de O_2 . La actividad del ETS fue expresada como μl de O_2 /mg peso húmedo.

Las determinaciones de todas las actividades enzimáticas se realizaron por duplicado o triplicado, en un Espectrofotómetro Metrolab 1700 UV-Vis; los cálculos se realizaron con valores promedios de las determinaciones. Todos los reactivos utilizados en las técnicas mencionadas fueron de grado analítico.

3.5 Tipo de bioensayos: diseños experimentales y detalles metodológicos

3.5.1 Bioensayos en medio acuoso

Se realizaron un total de 9 bioensayos de exposición a Cu o Cd, de 96 h o 10 días de duración (Tabla 3.1).

Los ensayos de toxicidad se realizaron adaptando la metodología estandarizada propuesta por US EPA (2000) para ensayos en matriz acuosa con *H. azteca*.

Las diferentes concentraciones de exposición de Cu se prepararon por series de diluciones en MHW de una solución *stock* de 1000 mg/L. En el caso del Cd, se siguió el mismo procedimiento a partir de una solución hija de 10 mg/L preparada a partir de una solución *stock* de 1000 mg/L. Las soluciones *stock* se prepararon con agua MLQ.

Los grupos control fueron establecidos como blancos o controles negativos utilizando como medio de dilución MHW.

El criterio de aceptabilidad fue una sobrevivencia superior al 90% en el control.

Se realizaron experimentos con individuos provenientes del cultivo *indoor* (juveniles y machos) o silvestres (machos).

En las Figuras 3.1 y 3.2 se resumen esquemáticamente los ensayos realizados en matriz acuosa con ambas especies.

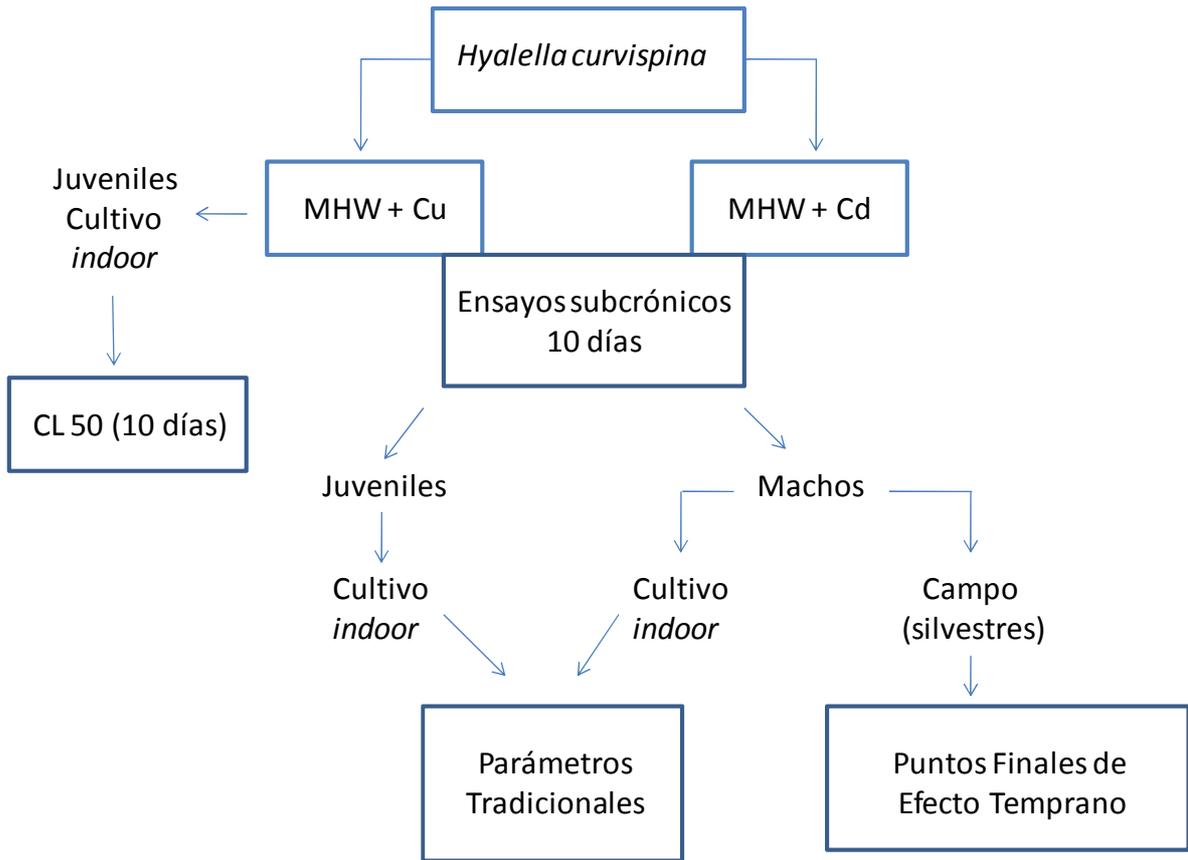


Figura 3.1: Esquema de los bioensayos realizados con la especie *H. curvispina* en medio acuoso.

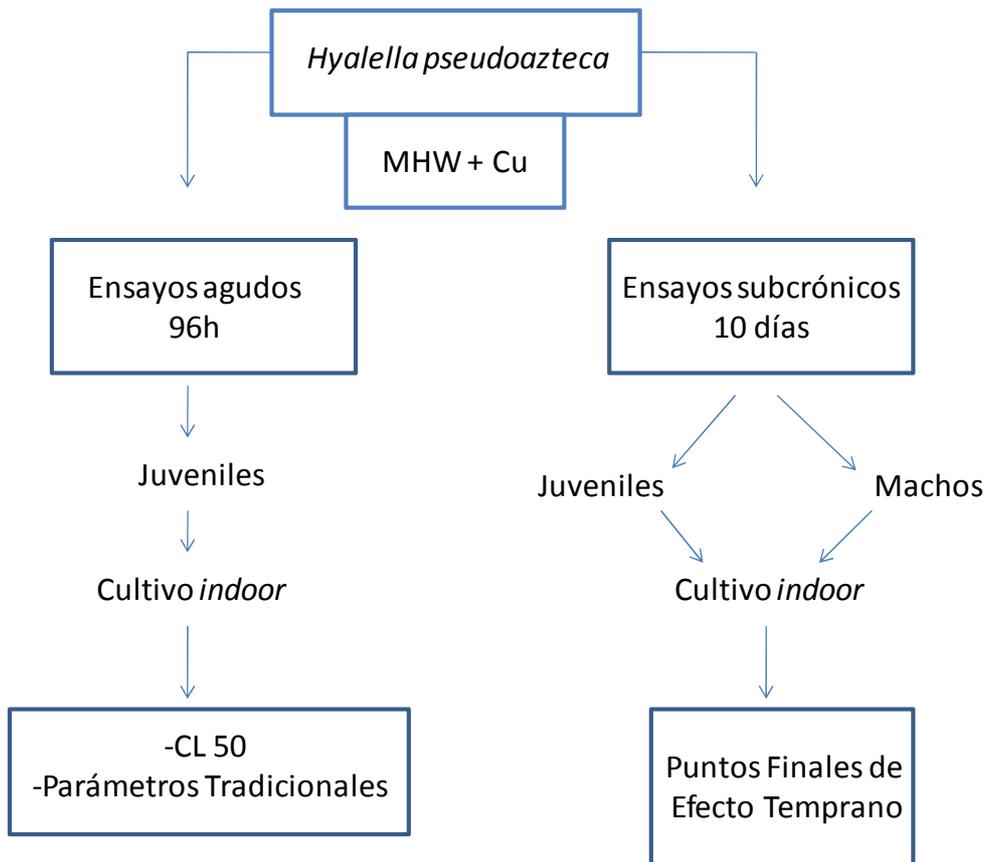


Figura 3.2: Esquema de los bioensayos realizados con la especie *H. pseudoazteca* en medio acuoso.

<i>Ensayo</i>	<i>Especie</i>	<i>Estadio</i>	<i>Punto final</i>	<i>Capítulo de pertenencia</i>
Cd-1	<i>H. curvispina</i>	Juveniles	Parámetros Tradicionales	5
Cd-2	<i>H. curvispina</i>	Machos jóvenes	Parámetros Tradicionales	5
Cd-3	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Parámetros Tradicionales	5
Cd	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Puntos Finales de Efecto Temprano	7
Cu-1	<i>H. curvispina</i>	Juveniles	CL 50	5
Cu-2	<i>H. curvispina</i>	Juveniles	Parámetros Tradicionales	5
Cu-3	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Parámetros Tradicionales	5
Cu	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Puntos Finales de Efecto Temprano	7
J1	<i>H. pseudoazteca</i>	Juveniles	CL 50 y Parámetros Tradicionales	5

Tabla 3.1: Detalles de las exposiciones a cobre y cadmio de *H. curvispina* y *H. pseudoazteca*. Se indica para cada ensayo el estadio de los organismos utilizados, puntos finales determinados y capítulo de la Tesis donde se describen los resultados.

3.5.1.1. Ensayos para evaluación de Parámetros Tradicionales

Como recipientes de ensayo se utilizaron envases transparentes de polipropileno de 400 ml de capacidad y tapa del mismo material. Se realizaron 3-5 réplicas por concentración en cada una de las cuales se colocaron 200 ml de solución y 10 organismos y una gaza (tul) de 5x5 cm como sustrato.

Para cada ensayo, a tiempo cero experimental se separó al azar un grupo de los individuos que se encontraba en aclimatación (entre 15 y 20) a los cuales se les determinó la longitud y el peso seco (grupo inicial). Una vez finalizada la incorporación de los organismos a los recipientes de ensayo se verificó el número y el estado de los

mismos. Se determinó en la matriz acuosa tanto a tiempo inicial como final de exposición el pH, oxígeno disuelto, conductividad, dureza y nitrógeno amoniacal. Para realizar las mediciones se utilizó el instrumental detallado en el ítem 3.6 del presente capítulo.

En cada réplica se suministró alimento en los días 4 y 8 de exposición. Concluido el tiempo de experimentación se realizó el recuento de animales sobrevivientes por réplica. Los mismos fueron colocados durante 24 hs en EDTA 50 mM preparada en MHW. Luego se fijaron por congelación a - 20 °C y se almacenaron hasta su procesamiento.

3.5.1.2 Ensayos para evaluación de Puntos Finales de Efecto Temprano

Se utilizaron envases transparentes de polipropileno de 1000 ml de capacidad y tapa del mismo material. Se realizaron 3 réplicas por concentración manteniendo una relación de 200 ml de solución cada 10 organismos. Una vez finalizada la incorporación de los individuos se verificó el número y el estado de los mismos en todos los recipientes. En cada réplica se suministró alimento los días 3, 5 y 8 de exposición. El detalle de las raciones ofrecidas se explicará en los capítulos correspondientes. A tiempo inicial y final de exposición se determinaron los parámetros fisicoquímicos mencionados en el ítem 3.5.1.1.

Concluido el ensayo, se realizó el recuento de animales sobrevivientes por réplica y los mismos fueron inmediatamente crioconservados a -80°C hasta el momento de las determinaciones.

3.5.2 Bioensayos con sedimentos adicionados (*spiked sediment*)

3.5.2.1 Selección y procesamiento de sedimento para la realización de ensayos en matriz sólida

Se seleccionó como matriz sólida sedimento proveniente del arroyo Las Flores (Fig. 3.5). Su aptitud como sedimento control fue corroborada por la determinación del nivel de metales pesados e hidrocarburos, los que se encontraron por debajo de los Niveles Guía de Calidad de Sedimentos (SQGs) (Mac Donald *et al.*, 2000). También fue caracterizado en función de componentes mayoritarios y minoritarios (EC, 1995) (ver Tabla 6.3, capítulo 6).

Para su uso en la serie de ensayos con sedimentos adicionados se utilizó la modalidad de sedimento procesado. Esto se llevó a cabo con el fin de mantener homogeneidad de composición del material entre ensayos. Para ello se colectó sedimento del arroyo mediante draga (hasta 15 cm de profundidad), se homogeneizó y se transportó al laboratorio en condiciones de frío y oscuridad. Posteriormente se tamizó a través de una red con el objetivo de separar hojarasca y macrofauna. Luego, el material se homogeneizó nuevamente y se colocó en bandejas donde se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez que el material estuvo completamente seco, se trituroó, se tamizó (mediante tamiz de malla 1000 μm) y se homogeneizó nuevamente. El sedimento se conservó en estas condiciones hasta su uso en los correspondientes bioensayos.

3.5.2.2 Preparación del sedimento adicionado y obtención de agua de poro

Para la preparación de cada sedimento adicionado, una parte del sedimento almacenado en seco se rehidrató (relación 1L MHW:1Kg sedimento seco) y se lo dejó asentar por 24 h. Luego se removió el agua sobrenadante y se calculó la relación peso seco/peso húmedo (Pasteris *et al.*, 2003), contenido de materia orgánica y composición granulométrica (previa remoción de la materia orgánica) mediante el método de la pipeta (Depetris, 1995) (ver ítem 3.5.2.4).

La adición del tóxico al sedimento se realizó siguiendo el protocolo de Pasteris *et al.* (2003), mezclando el peso requerido de sedimento húmedo con MHW (relación 1,5 L:2 L) y el volumen necesario de solución *stock* de cobre o cadmio, en baldes de 4 L ó 10 L, según la cantidad de sedimento requerido para el ensayo. En el caso del control, se procedió del mismo modo pero sin el agregado del tóxico.

El contenido de cada balde se mezcló manualmente por 5 minutos, utilizando una cuchara de acero inoxidable. Los baldes se colocaron en heladera a 4°C por 14 días, la homogeneización del sedimento se repitió cada 3 días. Posteriormente el sobrenadante fue descartado y el sedimento control ó el adicionado fue dividido en las réplicas correspondientes. Para dos de los ensayos con cobre en los que se evaluaron como puntos finales Parámetros Tradicionales (Cu-1 y Cu-2, Tabla 3.2), a partir del sedimento adicionado de mayor concentración (200mg/Kg, concentración nominal) se obtuvo agua de poro. Para la obtención de ésta matriz, el sedimento completo se centrifugó a 10000 rpm (4°C) por 30 minuto, el sobrenadante puro representa el agua de poro 100% (EC, 1994).

Se ejecutaron experimentos con individuos provenientes de cultivos *indoor* (juveniles y machos) o anfípodos provenientes de campo (machos). Se realizaron un total de 8 ensayos con sedimento adicionado. El detalle de los mismos se indica en la Tabla 3.2. En las Figuras 3.3 y 3.4 se resumen de manera esquemática los ensayos realizados con *H. curvispina* y *H. pseudoazteca*, respectivamente.

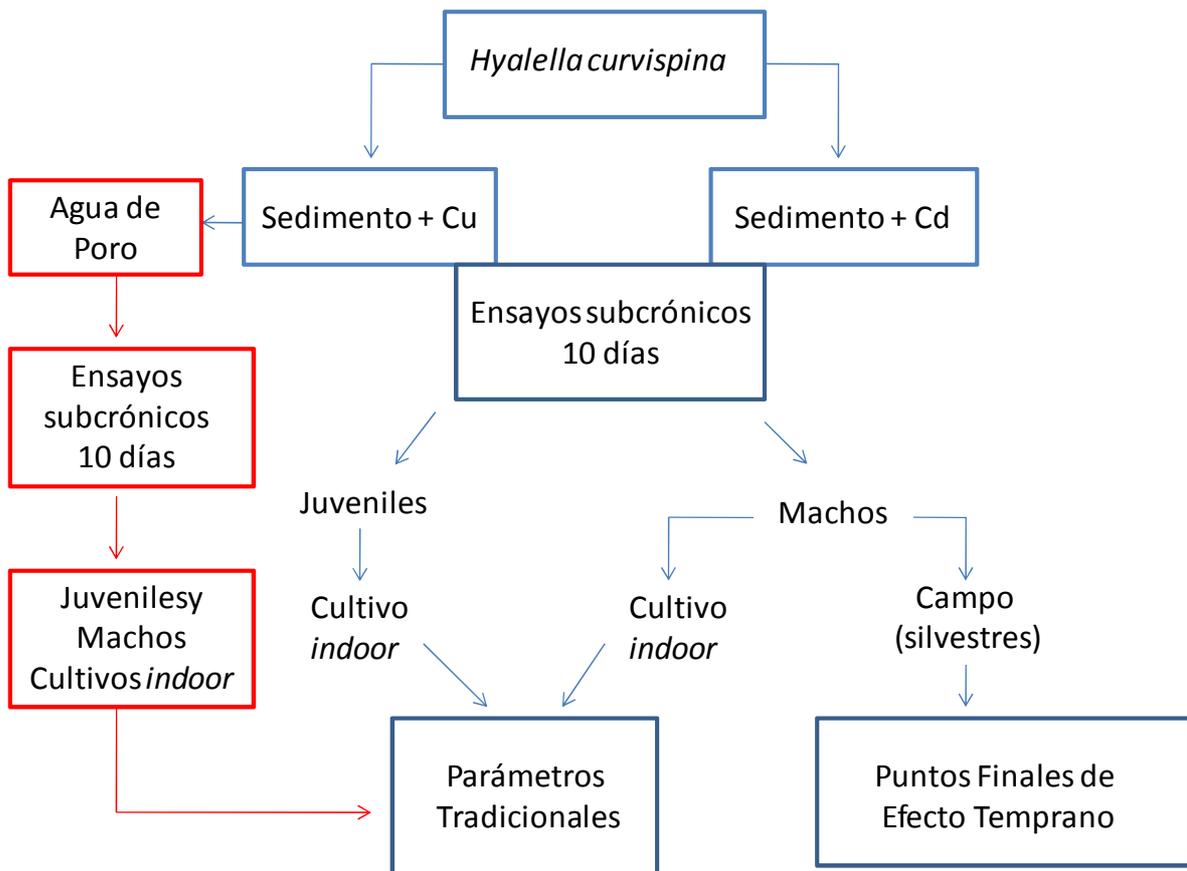


Figura 3.3: Esquema de los bioensayos realizados con individuos de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado y agua de poro.

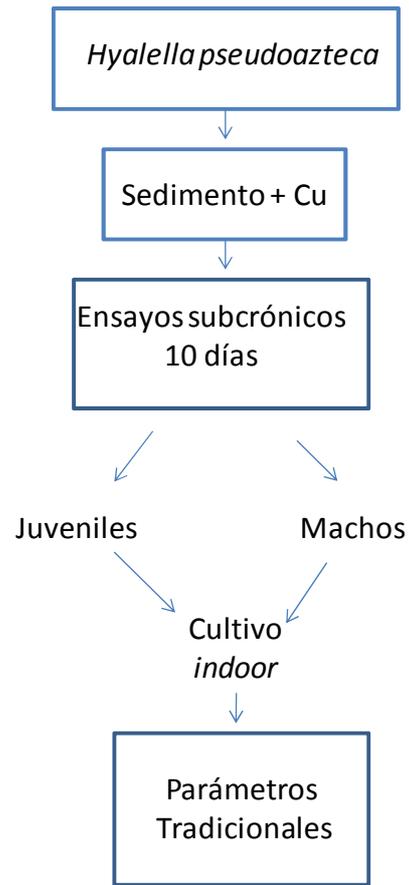


Figura 3.4: Esquema de los bioensayos realizados con individuos de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimento adicionado.

Ensayo	Especie	Estadio	Punto final	Capítulo de pertenencia
Cd-1 (SPK)	<i>H. curvispina</i>	Juveniles	Parámetros Tradicionales	6
Cd-2 (SPK)	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Parámetros Tradicionales	6
Cd	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Puntos Finales de Efecto Temprano	7
Cu-1 (SPK)	<i>H. curvispina</i>	Juveniles	Parámetros Tradicionales	6
Cu-2 (SPK)	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Parámetros Tradicionales	6
Cu	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Puntos Finales de Efecto Temprano	7
Cu-3 (SPK)	<i>H. pseudoazteca</i>	Juveniles	Parámetros Tradicionales	6
Cu-4 (SPK)	<i>H. pseudoazteca</i>	Machos	Parámetros Tradicionales	6

Tabla 3.2: Detalles de las exposiciones a cobre y cadmio de *H. curvispina* y *H. pseudoazteca*. Se indica para cada ensayo el estadio de los organismos, puntos finales determinados y capítulo de la Tesis donde se describen los resultados. SPK: sedimento adicionado.

Cabe destacar que además se realizaron dos bioensayos con juveniles de *H. pseudoazteca* colectados en el campo, expuestos a sedimento completo (fresco) del arroyo Las Flores adicionado con Cu. Los detalles particulares del procesamiento del sedimento y de los experimentos se desarrollarán en el capítulo 6.

3.5.2.3 Metodología general de ensayo con sedimento adicionado

En todos los ensayos con sedimento completo procesado, las réplicas se dejaron equilibrar durante una semana previa a la siembra de animales (Simpson *et al.*, 2004). El criterio de aceptabilidad del bioensayo fue una sobrevivencia superior al 80% en el control.

En los ensayos para evaluación de Parámetros Tradicionales se utilizaron envases transparentes de polipropileno de 400 ml de capacidad. Se realizaron 3-5 replicas por

concentración, en cada uno de las cuales se colocó 100 ml de sedimento húmedo, 175 ml de MHW y 10 anfípodos. La metodología empleada para la realización de los bioensayos fue la desarrollada en el ítem 3.5.1.1 para ensayos en medio acuoso.

En los ensayos para evaluación de Puntos Finales de Efecto Temprano se utilizaron envases transparentes de polipropileno de 1000 ml de capacidad y tapa del mismo material. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento manteniendo la relación 100 ml de sedimento, 175 ml de OW y 10 animales.

La metodología empleada para la realización de los bioensayos fue la desarrollada en el ítem 3.5.1.2 para ensayos en medio acuoso.

3.5.2.4 Caracterización fisicoquímica del sedimento

Sobre el sedimento de ensayo se determinó la composición granulométrica, contenido de humedad, porcentaje de materia orgánica y concentración de Cu o Cd. A continuación se describe la metodología empleada:

Granulometría

Se la determinó por tamizado y método de la pipeta para finos (Depetris, 1995). La metodología realizada fue la siguiente:

- a) Degradación de materia orgánica presente en el sedimento mediante mufla (550°C por 4h).
- b) Pesado de 50 g de sedimento muflado.
- c) Agregado de 100 ml de dispersante (hexametafosfato de sodio, solución de Calgón 5%).
- c) Agitación, máximo 24 h.
- e) Separación de la arena en su conjunto de la fracción limo-arcillosa mediante tamiz de 62 µm (malla #230 ASTM), la fracción fina se recolectó en probeta de 1000 ml.
- f) La fracción limo-arcillosa se separó mediante el método de pipeteo, basado en la velocidad de asentamiento de las partículas en medio acuoso (Ley de Stokes), el cual consiste en tomar sucesivamente una cantidad fija de suspensión por medio de una pipeta graduada, a una profundidad “h” determinada para cada extracción y a distintos tiempos.
- g) Cada extracción fue vertida en cápsulas (previamente secadas y pesadas), secadas en estufa y llevadas a peso constante.

h) Los cálculos se realizaron mediante las siguientes fórmulas:

<ul style="list-style-type: none"> • ARENA (A en g) = Peso seco total • FINOS (Limo + arcilla en g) = (peso total alícuota 1 – 0,02) x 50 • ARCILLAS (a en g) = (peso total alícuota 2 – 0,02) x 50 • LIMOS (L en g) = FINOS – ARCILLA
$\% A = A \times 100 / (A+L+a) \qquad \%L = L \times 100 / (A+L+a) \qquad \%a = a \times 100 / (A+L+a)$

Contenido de humedad y materia orgánica

Los porcentajes de humedad y de materia orgánica se determinaron por cálculo a través de técnica gravimétrica: pérdida de masa por secado en estufa a 105 °C e ignición en mufla a 550 °C, respectivamente.

3.5.2.5 Metodología general de ensayo con agua de poro

Se realizaron 2 ensayos (Tabla 3.3). En ambos casos los animales fueron expuestos al medio control (MHW) y al agua de poro (AP) extraída a partir del sedimento adicionado de mayor concentración, provenientes de los ensayos Cu-1 (SPK) y Cu-2 (SPK).

<i>Ensayo</i>	<i>Especie</i>	<i>Estadio</i>	<i>Punto final</i>	<i>Capítulo de pertenencia</i>
Cu-1 (AP)	<i>H. curvispina</i>	Juveniles	Parámetros Tradicionales	6
Cu-2 (AP)	<i>H. curvispina</i>	Machos mayores	Parámetros Tradicionales	6

Tabla 3.3: Detalles de las exposiciones a cobre en agua de poro en *H. curvispina*. Se indica para cada ensayo estadio de los organismos, puntos finales determinados y capítulo de la Tesis donde se desarrolla el bioensayo.

Se realizaron 2-3 réplicas por concentración, en cada una de las cuales se colocaron 200 ml de agua de poro o MHW (control). La metodología empleada para la realización de los bioensayos fue semejante a la empleada en los ensayos en medio acuoso (ítem 3.5.1.1). El criterio de aceptabilidad del bioensayo fue una sobrevivencia superior al 90% en el control.

3.5.3 Ensayos con muestras de sedimentos naturales: sedimento completo y agua de poro

Para la evaluación del perfil ecotoxicológico de sedimentos naturales, inicialmente se realizaron muestreos en diferentes sitios:

-Desembocadura del Arroyo La Chozza: 34°40071''S; 58°53798''O

-Embalse Roggero: 34°41086''S; 58°51250''O

-Estación de muestreo Merlo (Río Reconquista): 34°60870''S; 58°71714''O

Para cada uno de ellos se caracterizó el sedimento y se realizaron bioensayos de ecotoxicidad de sedimento completo y de agua de poro.

En función de los resultados preliminares se resolvió seguir estacionalmente el sitio La Chozza. Esto se debió fundamentalmente a que en el Embalse Roggero no se observó toxicidad, mientras que en los sitios de La Chozza y Merlo se observaron efectos de carácter subletal. En Merlo, a pesar de haber indagado sobre posibles efectos subletales, debido a la dificultad para acceder al sitio y la escasa cantidad de sedimento muestreable especialmente para la extracción de la agua de poro, se decidió no continuar con los muestreos. Además las características particulares de este sitio hacen muy difícil la sistematización de ensayos.

Por lo tanto, se decidió incrementar el esfuerzo en el arroyo La Chozza mediante la determinación de biomarcadores de efecto temprano. Esto implicó la utilización de una numerosa cantidad de animales para su uso experimental. Puesto que los mismos provinieron de cultivos de laboratorio, la productividad de estos cultivos resultó un factor limitante para la cantidad y tipo de bioensayos.

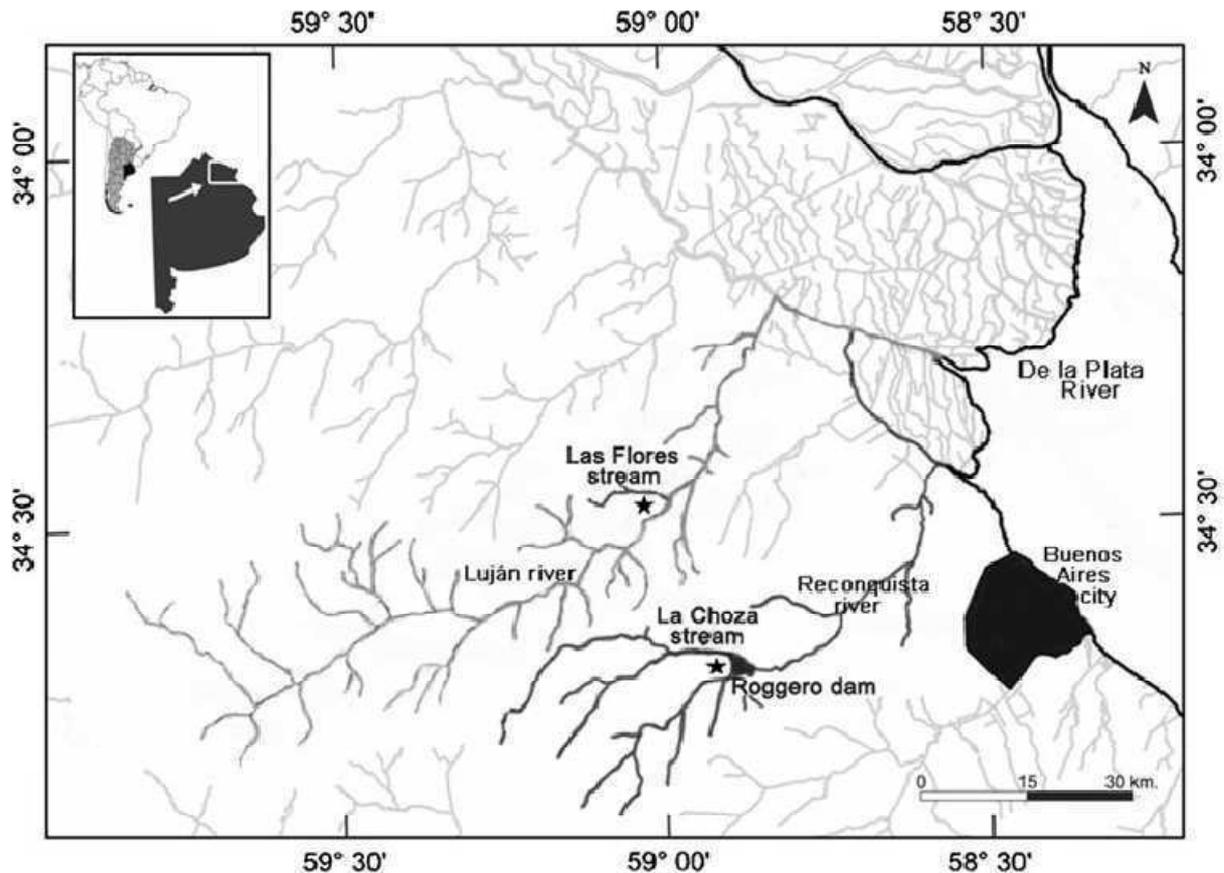


Figura 3.5: Localización geográfica de la cuenca del río Reconquista. Los asteriscos indican los sitios de muestreo: el sedimento control del arroyo Las Flores (afluente del río Luján) y el sedimento poluido en la desembocadura del arroyo La Choza, afluente de la represa dique Roggero.

Toma y preservación de muestras de sedimento

Los muestreos se realizaron en Verano 2010, Invierno 2010, Primavera 2010, Verano 2011, Otoño 2011 y Primavera 2011.

El sedimento utilizado fue dragado del fondo (a 10 cm de profundidad) de la desembocadura del arroyo La Choza (Fig. 3.5). Cada muestra se conformó al menos con 10 submuestras recolectadas de la capa superficial de sedimentos de fondo utilizando draga, las mismas fueron integradas manteniéndose refrigeradas y en oscuridad durante el trayecto al laboratorio.

Una vez en el laboratorio el sedimento fue tamizado a través de una red de poro amplio (1000 μ m) con el objetivo de remover restos de material de gran tamaño. Luego fue manualmente homogeneizado y almacenado a 4°C por 24 h. Posteriormente se removió el agua sobrenadante y el sedimento se homogeneizó nuevamente. Parte del material fue centrifugado para la extracción de agua de poro procediendo de acuerdo a la metodología indicada en el ítem 3.5.2.2. El resto del

sedimento se empleó para la realización de los bioensayos de sedimento completo y para la caracterización del mismo. Para ello, se tomaron submuestras de sedimento sobre las que se determinó el porcentaje de humedad, contenido de materia orgánica, composición granulométrica (ver ítem 3.5.2.4) y concentración de metales pesados (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn, Fe, Mn). En algunos de los muestreos se realizaron análisis microbiológicos de las muestras de sedimento, llevados a cabo por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Luján. En ellas se determinaron: Coliformes, Coliformes termotolerantes, *Streptococos* fecales, esporas anaerobias sulfito reductoras y presencia de *Salmonella* (López *et al.*, 2013). Las muestras para las determinaciones microbiológicas se tomaron en frascos de vidrio esterilizados y se conservaron en frío. Sobre submuestras de agua de poro se determinó concentración de Cd, Z, Cu, Cr, Pg, Fe y Mn.

El sedimento control fue el del arroyo Las Flores procesado utilizado en los ensayo de sedimento adicionado. El mismo fue procesado como se detalló en el ítem 3.5.2.1. Para los ensayos, el sedimento control almacenado fue rehidratado (1 Kg sedimento/L MHW) y luego se dejó asentar durante 3 h. Se descartó el agua sobrenadante y el sedimento rehidratado fue utilizado como control. Aunque se ha reportado que la manipulación de sedimento afecta la respuesta de los invertebrados bentónicos (Day *et al.*, 1995) en pruebas de toxicidad de sedimento completo, en este trabajo no se registró efecto sobre la supervivencia ni el crecimiento de *H. curvispina* en bioensayos con sedimento control rehidratado.

Ensayos de toxicidad con sedimento completo

Se realizaron ensayos estandarizados de 10 días de duración, con sedimento completo utilizando la especie *H. curvispina* como organismo prueba y las recomendaciones de los protocolos USEPA para *H. azteca* con modificaciones (USEPA, 2000).

Los recipientes empleados fueron de polipropileno translúcidos, de 400 ml de capacidad cubiertos con tapas plásticas transparentes. Los organismos fueron expuestos al sedimento completo de cada muestra a las 48 h de haberse realizado la recolección del material.

Se realizaron 3-5 réplicas por cada muestra ensayada. En cada recipiente se dispusieron 100 ml de sedimento, 175 ml de agua sobrenadante (MHW) y se colocaron 10 individuos juveniles. Cada ensayo contó con controles concurrentes. Los puntos finales fueron: supervivencia, longitud, biomasa e IMC.

Para los muestreos de verano 2010 y primavera 2010, se agregaron 5 réplicas por tratamiento, conteniendo cada una de ellas 500 ml de sedimento, 875 ml MHW y 50 individuos. Al finalizar los ensayos los animales sobrevivientes se crioconservaron para su posterior utilización en la determinación de los siguientes parámetros bioquímicos: actividad del sistema de transporte de electrones (ETS), actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y niveles de lipoperoxidación (TBARS). El criterio de aceptabilidad del bioensayo fue una sobrevivencia superior al 80% en el control.

Ensayos de toxicidad con agua de poro

Se realizaron 3-5 réplicas por concentración, en cada una de las cuales se colocaron 200 ml de agua de poro o MHW (control). Los recipientes se mantuvieron con aireación 48 h previas al inicio de los bioensayos. La metodología empleada para la realización de los experimentos fue semejante a la empleada en los ensayos en medio acuoso (ítem 3.5.1.1). El criterio de aceptabilidad del bioensayo fue una sobrevivencia superior al 90% en el control.

3.5.4 Ensayo de evaluación de tolerancia al nitrógeno amoniacal y Ensayo crónico de alimentación

Ensayo de tolerancia al N-NH₄⁺

Se realizaron ensayos de 7 o 14 días de duración con juveniles y machos de *H. curvispina* provenientes de cultivos *indoor*.

Ensayo crónico de alimentación

Se realizó un bioensayo en matriz sólida de 28 días de duración con individuos de *H. curvispina* de 1 a 7 días de edad provenientes de cultivos *indoor*.

Los detalles particulares de estos experimentos se desarrollarán en el capítulo 4.

3.6 Determinaciones fisicoquímicas comunes a todos los ensayos

- pH: mediante pehachímetro Mettler MP 220 (sensibilidad 0,01).

- Dureza: utilizando un *kit* de reactivos Merck Aquamerck (sensibilidad 1 mgCaCO₃/L).
- Oxígeno Disuelto: mediante sensor de campo Hanna (sensibilidad 0,1 mg OD/L).
- Conductividad: mediante sensor Consort C532 (sensibilidad 0,1 µS/cm).
- Concentración de N-NH₄⁺: utilizando un *kit* de reactivos Merck Spectroquant (rango de medición 0,03-3 mgNH₄⁺/L).
- Para la determinación de las concentraciones efectivas de los metales pesados en matriz acuosa y OW las muestras fueron preservadas en 0,15% de ácido nítrico y refrigeradas hasta su procesamiento. Las muestras de sedimento fueron sujetas a ataque multi ácido previamente a la determinación de la concentración analítica de metales. Todas las determinaciones fueron realizadas mediante Espectroscopía de Absorción Atómica con atomización electrotérmica o con atomización por llama (Equipo: Analyst 200 de Perkin Elmer). Límite de detección <1 µgCd/L en agua y <0,25 mg/kg en sedimento para cadmio, y <5 µgCu/L en agua y 2 mgCu/kg en sedimento para cobre.

3.7 Análisis estadístico de los resultados

Se aplicaron diferentes análisis de acuerdo al paquete de datos considerado. Para la aplicación de métodos paramétricos se constató normalidad y homocedasticidad de los datos. Se aplicaron *test* de Student para comparaciones de a pares, y ANOVAs de una vía con comparaciones múltiples. Entre los métodos no paramétricos se aplicaron el *test* de Wilcoxon y la prueba de Kruskal Wallis. Se utilizó el Programa Infostat (Di Rienzo, 2012) y SPSS 11.5 para Windows.

CAPITULO 4

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRÍA Y MANTENIMIENTO DE *Hyaella curvispina* EN LABORATORIO ENSAYO CRÓNICO DE ALIMENTACIÓN ENSAYO CON N-NH₄⁺

4.1 Introducción

Los Protocolos Internacionales para la realización de bioensayos proveen una guía de recomendaciones que incluye una lista de especies elegidas, entre otras cosas, por su comprobada sensibilidad, su amplia distribución y su fácil manipulación en laboratorio. Entre las especies de invertebrados acuáticos recomendadas por dichos Protocolos se encuentra *Hyaella azteca*, sobre la cual existe un profundo conocimiento biológico.

A nivel regional *Hyaella curvispina* es el anfípodo más utilizado en investigación, sobre el que sin embargo aún existe escasa información biológica.

En general para la realización de bioensayos, si bien se exige rigurosidad en la protocolización para las etapas experimentales, no es igual en cuanto al origen de los animales que se utilizan, y se desestima la fuente de variación que ello aporta en la etapa experimental. En vista de que *H. curvispina* es una especie con características propias la aplicación del protocolo de cría de otra especie, como es el caso de *H. azteca*, debe ser acondicionada a las particularidades de la especie que se requiere cultivar.

En este capítulo se aporta información para la cría de *H. curvispina* en laboratorio, a partir de la experiencia adquirida en nuestro ámbito de trabajo. Se detallan los procedimientos seguidos para la obtención y la producción de *H. curvispina* para obtener animales aptos para la experimentación. Se pretende contribuir a normar el cultivo de esta especie en laboratorio, con el objetivo de disminuir la variabilidad de respuestas intra e inter laboratorios.

4.2 Cultivo de *Hyalella curvispina* con fines experimentales

Para generar un buen cultivo es preciso cumplir con dos objetivos principales: sembrar un gran número de individuos y lograr mantener las condiciones ambientales de modo tal que la población tenga un crecimiento constante y por encima de la tasa de extracción, logrando la cantidad necesaria de individuos aptos para su utilización en ensayos y posteriores resiembras en otros cultivos.

Inicio del cultivo: obtención de ejemplares en campo

Para lograr el cultivo inicial, se recurrió a la extracción de individuos del campo siguiendo una metodología no invasiva y no destructiva del medio.

Antes de seleccionar el sitio de colecta se realizó un muestreo preliminar para verificar abundancia y diversidad de anfípodos.

Se seleccionó el arroyo Las Flores, y se muestreo en sectores de escasa profundidad (50-60 cm) y con abundante vegetación ya que generalmente las poblaciones de anfípodos se encuentran muy relacionadas a macrófitas. Para la colecta de los animales se extrajeron las plantas y se realizaron dos o tres lavados sobre tamiz con agua del mismo arroyo para remover los organismos indeseados y sedimento. Luego los organismos colectados se colocaron en un balde y se transportaron al laboratorio. Las macrófitas también fueron llevadas al laboratorio ya que se utilizaron como refugio y alimento para los animales durante los días de aclimatación. Ya que existe la posibilidad de que *H. curvispina* coexista con otras especies del mismo género, particularmente *H. pseudoazteca*, es importante la identificación y separación de *H. curvispina* en campo/laboratorio.



Figura: 4.1: Sitio de colecta de anfípodos en el arroyo Las Flores.

Aclimatación y primer manejo en laboratorio

Una vez en el laboratorio el contenido del balde con agua del sitio de origen se colocó en bateas. Los anfípodos fueron separados utilizando una pipeta Pasteur de boca ancha por medio de la cual se evitó dañar a los animales durante el procedimiento. Los anfípodos se traspasaron a recipientes plásticos de 4 L con agua del sitio de colecta, que luego fue paulatinamente reemplazada por la empleada en el cultivo (agua de red no clorada: pH: 8,07-8,54; conductividad : 920-1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$; dureza: 60-85 mgCaCO_3/L , amonio: 0,38-1,63 ($\text{mg N-NH}_4/\text{L}$); nitritos: 0,02-0,1 ($\text{mg N-NH}_4/\text{L}$); nitratos: 3,65-3,86 ($\text{mg N-NH}_4/\text{L}$); fosforo reactivo soluble ($\text{mg P-PO}_4^{3-}/\text{L}$); metales pesados ($\mu\text{g}/\text{L}$) Mn y Ni :no detectable ; Zn: 33; Cu < 10; Cr <10; Pb 23; Cd < 10).

En el primer paso de la aclimatación es muy importante proceder de manera adecuada, ya que aumenta notablemente la supervivencia de los animales colectados. Una vez hecho el procedimiento, los anfípodos se traspasaron al estanque definitivo con el agua de cultivo. También se incorporaron plantas acuáticas del sitio de colecta (de ser posible *Egeria densa*), previamente lavadas, ya que sirven de apoyo y refugio a los anfípodos. Al día siguiente se suministró alimento para peces (TetraFin®) con un contenido proteico > al 40% *ad libitum*.

Se implementaron dos modelos de producción:

-El primero es la producción de animales *outdoor*. Se realiza a la intemperie, en un espacio relativamente protegido de las inclemencias climáticas estableciéndose así

una situación intermedia entre campo y laboratorio. Los animales se utilizan principalmente para la reposición de los estanques que se encuentran dentro del laboratorio. Se trata de un sistema útil para la extracción extensiva debido a que no se controla la alimentación ni las variables ambientales.

-El segundo modelo, *indoor*, se instala dentro del laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo, pH y alimentación asimilables a primavera. Proporciona animales aptos para ensayos estandarizados. Se trata de un modelo de extracción intensiva, que aporta la cantidad necesaria de hyalellas para cada ensayo.

Cría y mantenimiento outdoor

Materiales requeridos para el cultivo:

-Pool de Hyalellas (aproximadamente 100 parejas).

-Plantines de *Egeria densa*.

-Media sombra o similar que se coloca sobre el estanque a fin de evitar la insolación directa.

-Estanque o Pileta de lona (aproximadamente: 2,6m x 1,6m x 0,65m).

-Arena preferentemente autoclavada (500 °C y a 10 atm por 1 h) o lavada y secada en estufa durante 24 h.

Procedimiento

Este modelo se inició con aproximadamente 100 parejas. El mismo no presenta exigencias particulares en cuanto a la alimentación y el control de las variables fisicoquímicas.

Los piletones se establecieron al aire libre (preferentemente con un nivel de insolación bajo a medio, reparados de la lluvia y el viento). Se acondicionaron con agua de red no clorada, de preferencia moderadamente dura, arena como sustrato y macrófitas (mayormente *Egeria densa*). Luego se sembraron los ejemplares de *H. curvispina* recolectados en campo y previamente aclimatados. En este tipo de cultivos no se controla la densidad de la población de anfípodos.

Periódicamente se agregó agua a fin de reponer la que se pierde por evaporación. Debido a que el cultivo se encontró influenciado por las condiciones climáticas, en el estanque se produjo naturalmente el crecimiento de algas, que sirvieron como fuente de alimento para los anfípodos. Durante el período invernal se agregó alimento a fin de evitar que la población se extinga por falta del mismo. El cultivo es periódicamente

enriquecido con nuevos ejemplares recolectados en campo y previamente aclimatados.

Cría y mantenimiento indoor

Materiales requeridos para el cultivo:

- Dos estanques de 80 L.
- Un aireador, con capacidad para cinco salidas.
- Arena preferentemente autoclavada (500 °C y a 10 atm por 1 h) o lavada y secada en estufa durante 24 h.
- Difusores cilíndricos de piedra pómez
- Manguera para aireación de acuarios.
- Reguladores de flujo de aire.

Condiciones ambientales:

- Temperatura: $23 \pm 1^\circ\text{C}$.
- pH del agua: 7,5-8,5.
- Dureza: moderada (80-100 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$).
- Iluminación: media, 1 wat cada 2 litros.
- Fotoperíodo: 16 h Luz/ 8 h Oscuridad.
- Recambio de agua: cada 15 días (sin remover el sustrato del fondo).
- Fondo con arena autoclavada.
- Plantines de *Egeria densa*.

Procedimiento

En los estanques se colocaron los individuos preaclimatados sin distinción de sexo y edad, en abundancia, sin control estricto de la densidad.

Este modelo permitió la extracción mensual de aproximadamente 1000 juveniles o 500 a 600 adultos cada dos meses. Cabe destacar que este modelo resulta exitoso si sólo se utilizan para los ensayos machos adultos y juveniles, dejando en el cultivo a las hembras en estado reproductivo. Una vez al año el cultivo fue enriquecido con la entrada de nuevos individuos procedentes de los cultivos *outdoor*, a fin de recomponer la población.

La alimentación resultó un punto clave para lograr un cultivo abundante. La cantidad de alimento está relacionada con la densidad de anfípodos. Puesto que conocer el

número de individuos en el cultivo es extremadamente difícil, se suministró alimento “*ad libitum*”. La mejor forma de determinar la cantidad de alimento a suministrar fue realizar observaciones diarias del cultivo, agregando una nueva ración cuando se observó un escaso excedente de alimento en el fondo del estanque. Además del alimento balanceado, los animales ingirieron hojas de *Egeria densa* y algas provenientes de cultivo mantenidos en laboratorio (ver ensayo de alimentación, ítem 4.2 del presente capítulo).

Modelo de obtención de neonatos

Se partió de parejas en amplexo separadas del cultivo *indoor*. Las mismas se colocaron en recipientes de 3 L a razón de 10 parejas por frasco. En cada recipiente se colocaron 2 L de agua de red no clorada y un retazo de 10cm x 10cm de tul en el fondo como sustrato y refugio de los organismos.

Semanalmente se realizó un recambio parcial del agua de cultivo y se registró presencia de neonatos. Cuando estos fueron visualizados (con una edad entre <1 y 7 días) se transfirieron con una pipeta a un recipiente de 1 L, con agua de cultivo y alimento.

Con esta metodología el número promedio de crías esperado por hembra fue entre 8 y 15. El tiempo estimado para obtener la primera camada a partir de adultos en amplexo fue entre 25 y 30 días.

Los parámetros ambientales fueron los mismos que los indicados para el cultivo *indoor*. Se suministró diariamente alimento balanceado para peces en escamas (TetraFin®).

Control de plagas

Para evitar la propagación de plagas se aplicó la siguiente metodología:

- 1) Luego de recolectar a los organismos en el campo, al llegar al laboratorio se realizó una búsqueda exhaustiva de anfípodos, separándolos de organismos indeseables para este tipo de cultivo.
- 2) Se repitió periódicamente la búsqueda y extracción de organismos no deseados en los estanques de cría.

Además de los organismos plagas los cultivos se protegieron de posibles patógenos, como hongos y bacterias.

La aparición de bacterias patógenas se previno manteniendo condiciones de limpieza y oxigenación adecuadas. Un indicio de su presencia fue el aumento excesivo de la turbidez del agua de cultivo. En ese caso se procedió a cambiar inmediatamente $\frac{3}{4}$ partes del agua del recipiente, previo paso por el tamiz, evitando la pérdida de *hyalellas*. En ese proceso además se limpió el fondo de los recipientes por aspiración (sifoneo).

Para las micosis no hay tratamientos eficaces. En los casos en que sólo se vieron afectados algunos anfípodos, se realizó un cambio completo del agua de cultivo y se eliminaron los muertos y los débiles. Luego se limpió con cloro 0,1% todo el material utilizado durante la manipulación, incluido el empleado para la provisión de aire. Cuando la proporción de individuos afectados fue mayor al 40% se descartó el cultivo y se inició uno nuevo, a partir de ejemplares provenientes de cultivo *outdoor*.

4.3 Ensayo crónico de alimentación: efecto de la dieta sobre la supervivencia y el crecimiento de *Hyalella curvispina* bajo condiciones experimentales

El ensayo se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes tipos de dietas, en condiciones de raciones periódicas establecidas, sobre el crecimiento de los animales.

4.3.1 Metodología

Las fuentes de alimento suministradas fueron:

- i) Alimento para peces molido (TetraFin®) + Algas (clorofitas)
- ii) Alimento para peces molido (TetraFin®)
- iii) Algas (clorofitas)

Las algas provinieron de cultivos mantenidos en laboratorio. Se realizaron 8 réplicas/tratamiento. Los individuos fueron expuestos durante 28 días en contacto con sedimento. Como sustrato experimental se utilizó sedimento del arroyo Las Flores procesado, que fue el empleado como sedimento control en todos los ensayos de este trabajo de investigación. En cada réplica de 400 ml de capacidad, se colocaron 100 ml

del sedimento y 175 ml de MHW. Los mismos fueron dispuestas en cámara de ensayo bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo (23°C; 16L:8O). Se agregó aire en la totalidad de los tratamientos. Los recipientes se dejaron estabilizar por una semana previa al inicio del ensayo.

A tiempo inicial en cada recipiente se colocaron 10 organismos de 1 a 7 días de edad provenientes de cultivos *indoor*. Además, a cada réplica se le suministró: 2,5 mg de TetraFin® molido (tratamientos i y ii) y 1 ml de algas (tratamientos i y iii). Esta ración de alimento se proporcionó dos veces por semana, durante las tres primeras semanas de ensayo. En la cuarta semana de exposición se duplicó la ración de alimento ofrecida, manteniendo la frecuencia semanal.

La totalidad de los recipientes fue revisada diariamente con el objetivo de corroborar que no existieran restos de alimento que afecten la calidad del agua. Como puntos finales se evaluó sobrevivencia y crecimiento (longitud y biomasa, ver ítem 3.4.1 capítulo 3).

Finalizado el período de ensayo los anfípodos fueron separados del sedimento, se realizó su recuento y determinó el porcentaje de sobrevivencia. Posteriormente fueron fijados por congelamiento a -20°C para determinaciones de crecimiento.

Se determinó OD, pH, conductividad, N-NH₄⁺ y dureza a tiempo inicial y final de ensayo.

Los datos de sobrevivencia y crecimiento se analizaron utilizando ANOVA de una vía con las variables longitud y peso seco transformadas a logaritmo, se trabajó con un nivel de significancia de 5%.

4.3.2 Resultados y Discusión

La Tabla 4.1 muestra los parámetros fisicoquímicos registrados a tiempo inicial y final de ensayo. El OD, el pH y la conductividad no mostraron variaciones significativas entre los distintos tiempos y las diferentes dietas. La dureza fue más elevada a tiempo inicial de ensayo en relación al tiempo final, pero se mantuvo constante entre tratamientos. El N-NH₄⁺ a tiempo inicial se encontró en valores cercanos a 4 mg/L, disminuyendo a concentraciones cercanas a cero a tiempo final de ensayo. Cabe

destacar que los valores de N-NH_4^+ determinados no afectan a la supervivencia de la especie en estudio (ver ítem 4.4).

Tratamiento		OD (mg/L)	pH	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Dureza (mgCaCO_3/L)	N-NH_4^+ (mg/L)
I	Ti	$7,2 \pm 0,2$	$8,6 \pm 0,0$	1443 ± 26	180 ± 0	$3,7 \pm 0,4$
	Tf	$6,1 \pm 0,4$	$8,6 \pm 0,0$	1183 ± 27	120 ± 0	$0,2 \pm 0,1$
ii	Ti	$7,5 \pm 0,2$	$8,7 \pm 0,0$	1428 ± 39	170 ± 20	$3,9 \pm 0,3$
	Tf	$6,2 \pm 0,6$	$8,6 \pm 0,1$	1166 ± 41	110 ± 10	$0,1 \pm 0,0$
iii	Ti	$7,5 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,1$	1423 ± 40	170 ± 20	$4,2 \pm 0,2$
	Tf	$6,7 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,0$	1179 ± 38	120 ± 10	$0,1 \pm 0,0$

Tabla 4.1: Parámetros fisicoquímicos (n=8), a tiempo inicial y final de exposición para las diferentes dietas evaluadas. Valores expresados como media \pm DS. Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

Los resultados de sobrevivencia y crecimiento para las diferentes dietas evaluadas luego de la exposición durante 28 días a sedimento se muestran en las Tablas 4.2 y 4.3.

Tratamiento	i	ii	iii
Sobrevivencia	$93,8 \pm 11,9$	$80 \pm 13,1$	$92,5 \pm 11,6$

Tabla 4.2: Sobrevivencia promedio \pm DS (%) luego de 28 días de exposición para las tres dietas evaluadas. i) Alimento para peces molido (TetraFin®) + Algas (clorofitas); ii) Alimento para peces molido (TetraFin®); iii) Algas (clorofitas).

Los resultados indicaron que la sobrevivencia al día 28 fue superior al 90% en i y iii, y del 80% en ii. No hubo diferencias significativas en la supervivencia de *H. curvispina* para las distintas dietas evaluadas.

Tratamientos	i	ii	iii
Longitud (mm)	$4,11 \pm 0,59$	$3,83 \pm 0,46^*$	$3,58 \pm 0,46^{* \#}$
Peso seco (mg/ind.)	$0,67 \pm 0,27$	$0,51 \pm 0,16^*$	$0,32 \pm 0,13^{* \#}$
n	40	40	40

Tabla 4.3: Longitud y peso seco a tiempo final para las tres dietas evaluadas. i) Alimento para peces molido (TetraFin®) + Algas (clorofitas); ii) Alimento para peces molido (TetraFin®); iii) Algas (clorofitas). Valores expresados como media \pm DS. (*) indica diferencias significativas de i; (#) indica diferencias significativas de ii; n: número de individuos.

Los parámetros de crecimiento se determinaron sobre 40 anfípodos seleccionados al azar entre los sobrevivientes a tiempo final de cada tratamiento, ya que se consideró un número de animales representativo para el análisis de los resultados. Se observó un mayor incremento tanto en longitud como en peso seco en los individuos alimentados con la dieta i, seguidos por los anfípodos alimentados con la dieta ii, mientras que el menor incremento se determinó en los animales alimentados con la dieta iii.

En un estudio realizado con *Hyaella curvispina* expuesta a 5 clases diferentes de dietas (placa con perifiton; lechuga; lechuga + alimento balanceado para peces; placa con perifiton + alimento balanceado para peces y placa con perifiton + lechuga), Peluso (2011) reportó que los porcentajes de supervivencia de los anfípodos variaron entre 60 y 90%, siendo mayor en el tratamiento correspondiente a la dieta con placa de perifiton. La autora concluyó que las diferentes clases y combinaciones de alimentos no influyeron de manera significativa en la supervivencia de *H. curvispina* y, por lo tanto, para la realización de sus ensayos optó por la dieta correspondiente a lechuga (76% de supervivencia). Dutra *et al.* (2011a), realizaron ensayos bajo condiciones controladas de laboratorio exponiendo individuos de las especies *H. curvispina* y *H. pleoacuta* durante 30 días a dos tipos de dietas, (macrófitas y macrófitas + alimento balanceado comercial para peces). Los autores reportaron que los requerimientos calóricos de ambas especies fueron sólo suministrados con la dieta combinada, la cual proporcionó más carbohidratos, proteínas y lípidos. A su vez observaron que los animales alimentados con la dieta combinada presentaron un mayor porcentaje de amplexos, una mayor proporción de hembras ovígeras y de huevos por hembra. Sin embargo, la tasa de supervivencia fue similar para ambas dietas. En un estudio realizado por Silva Castiglione *et al.* (2010) ejemplares de *Hyaella bonariensis* fueron alimentados durante 45 días con cuatro tipos diferentes de dietas, las que consistieron en: macrófitas; macrófitas asociadas a una ración con alto contenido de proteínas; macrófitas asociadas a una ración con bajo contenido de proteínas y por último macrófitas durante 30 días y los 15 restantes macrófitas asociadas a una ración con alto contenido de proteínas. Los animales que recibieron macrófitas asociadas a una ración con alto contenido de proteínas durante 45 días presentaron una mayor tasa de supervivencia. Este estudio demostró la importancia de las proteínas en la dieta de esta especie.

Si bien tanto en la bibliografía como en nuestros resultados se observó que en general las dietas combinadas proporcionaron las mejores condiciones para los animales, en

el presente trabajo de Tesis, durante el mantenimiento y cultivo de los animales se optó por la dieta i “*ad libitum*” y para los ensayos desde el periodo de aclimatación se optó por la dieta ii. La elección se fundamentó en el hecho que con la dieta ii la sobrevivencia y crecimiento de los animales se encuentra dentro de valores aceptables para anfípodos (USEPA, 2000) y ofrece la ventaja de poder estandarizarse fácilmente durante el periodo de ensayo, siendo ésta última una condición importante para el proceso de protocolización del mismo. Además debe considerarse que si bien la dieta i fue con la que se obtuvieron las mejores condiciones para los animales, en los cultivos de algas mantenidos en laboratorio se observaron diferencias en el contenido de las mismas a lo largo del tiempo, no pudiendo asegurar de este modo ofrecer exactamente la misma dieta a los animales a lo largo de los diferentes ensayos realizados.

4.4 Evaluación del nitrógeno amoniacal sobre la supervivencia de *Hyalella curvispina* bajo condiciones de ensayo

El objetivo de estos experimentos fue evaluar el grado de tolerancia de *H. curvispina* al nitrógeno amoniacal. Se pretende considerar la sensibilidad del organismo prueba a este compuesto a fin de no sobreestimar la toxicidad de los diferentes tratamientos aplicados.

4.4.1 Metodología

Se realizaron dos ensayos, uno utilizando ejemplares adultos (machos) con 2 réplicas por tratamiento y 5 individuos/réplica; y el segundo empleando anfípodos juveniles con 2 réplicas por tratamiento y 10 individuos/réplica.

El rango de concentraciones nominales ensayadas fue de 0 a 20 mgN-NH₄⁺/L. Las mismas fueron obtenidas por dilución a partir de una solución madre de 0,1M NH₄⁺ que fue preparada disolviendo CINH₄ en agua bidestilada. Como fuente de alimento se suministró 1,25 mg y 2,5 mg de TetraFin® molido 2 veces por semana, para juveniles y adultos, respectivamente.

El ensayo con anfípodos adultos se prolongó durante 14 días con renovación del medio el día 7 de ensayo. En el caso de los juveniles, la extensión del bioensayo fue

de una semana sin renovación del medio de exposición. El punto final evaluado en ambos ensayos fue la sobrevivencia.

Para las determinaciones de la concentración de amonio NH_4^+ en agua se utilizó un *kit* de reactivos Merck Spectroquant (sensibilidad de 0,03 mg NH_4^+ /L) (ver ítem 3.6, capítulo 3).

4.4.2 Resultados y Discusión

Bioensayo con adultos

El rango de longitud del grupo inicial de los animales ensayados fue 5,5-6,0 mm.

La Tabla 4.4 muestra las concentraciones nominales y efectivas de nitrógeno amoniacal y el porcentaje de sobrevivencia a tiempo final de cada semana para cada tratamiento.

Tratamiento	Primer semana			Segunda semana		
	CE (Ti)	CE (Tf)	Sobrevivencia (%)	CE (Ti)	CE (Tf)	Sobrevivencia (%)
CN						
0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	100 ± 0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	95 ± 7
5	5,0 ± 0,3	5,4 ± 0,2	100 ± 0	5,5 ± 0,2	5,8 ± 0,3	100 ± 0
10	9,2 ± 0,2	9,8 ± 0,4	80 ± 0	9,0 ± 0,3	10,0 ± 0,4	80 ± 0

Tabla 4.4: Concentraciones de N-NH_4^+ (mg/L) nominales (CN) y efectivas (CE; n=2) y porcentaje de sobrevivencia (n=2) para cada semana de ensayo. Ti: Tiempo inicial; Tf: tiempo final. Valores expresados como medio ± DS.

Bioensayo con juveniles

El rango de longitud del grupo inicial de los animales ensayados fue 2-3 mm.

La Tabla 4.5 muestra las concentraciones nominales y efectivas de nitrógeno amoniacal y el porcentaje de sobrevivencia a tiempo final para cada tratamiento.

CN	CE (Ti)	CE (Tf)	Sobrevivencia (%)
0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	100 ± 0
10	11,5 ± 0,3	11,8 ± 0,3	90 ± 0
15	16,3 ± 0,0	16,9 ± 0,0	70 ± 14
20	21,4 ± 0,6	22,0 ± 0,5	60 ± 14

Tabla 4.5: Concentraciones de N-NH₄⁺ (mg/L) nominales (CN), efectivas (CE) y porcentaje de sobrevivencia para cada tratamiento (n=2). Ti: Tiempo inicial; Tf: tiempo final. Valores expresados como medio ± DS.

La sobrevivencia de adultos de *H. curvispina* luego de dos semanas de exposición a una concentración de nitrógeno amoniacal promedio de 9,5 mgN-NH₄⁺/L, fue del 80%. En el caso de juveniles se observó que luego de una semana de ensayo, para concentraciones promedio de N-NH₄⁺ de 11,6; 16,6 y 21,7, la sobrevivencia fue del 90%, 70% y 60%, respectivamente.

Los resultados indican que la especie en estudio es tolerante a elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal en MHW. Peluso (2011) realizó bioensayos con juveniles de *H. curvispina*, exponiendo a los anfípodos a diferentes muestras de sedimento del río Luján durante 10 días. La autora informó para algunas de las muestras ensayadas concentraciones entre 3,8 y 6 mgN-NH₄⁺/L en el agua sobrenadante de los recipientes de experimentación. A estas concentraciones no observó efectos sobre la sobrevivencia ni la longitud de los animales.

Particularmente en uno de los bioensayos determino niveles de 16 mgN-NH₄⁺/L en el agua sobrenadante. En este caso si bien reportó una sobrevivencia del los anfípodos del 56%, la misma no se diferenció significativamente del grupo control. A su vez, la mortalidad observada no fue asociada a la concentración de nitrógeno amoniacal. En ensayos de 10 semanas de duración realizados con individuos de *Hyaella azteca* expuestos a diferentes concentraciones de amonio, Borgmann (1994) reportó una CL50 (10 semanas) de 11 mgN/L, tanto para juveniles como para adultos. El crecimiento no se vio afectado a concentraciones por debajo de aquella que causó mortalidad crónica, pero la reproducción fue reducida a concentraciones marcadamente más bajas (4,5 mgN/L). En el mismo trabajo el autor reportó una CL50 (96h) para amonio total de 26 mgN/L. Ankley *et al.* (1991) obtuvo valores de toxicidad aguda (CL50-96h) similares a los reportados por Borgmann (1994) informando

concentraciones de 20 mgN/L a pH 6-6,5; 23 mgN/L a pH 7-7,5 y 21 mgN/L a pH 8-8,5.

Los resultados informados en el presente capítulo sobre la supervivencia de *H. curvispina* expuesta a diferentes concentraciones de nitrógeno amoniacal, si bien resultan de carácter preliminar, constituyen un primer aporte al conocimiento del efecto de este parámetro sobre nuestra especie autóctona. A su vez, validan los resultados de los bioensayos presentados a lo largo de este trabajo de Tesis. Esto se debe a que permiten asociar los efectos observados a los tratamientos aplicados y no a los niveles de N-NH_4^+ determinados, que resultaron elevados en varios de los experimentos realizados. En el Anexo II se puede observar un resumen del rango de concentraciones de N-NH_4^+ determinadas en todos los experimentos de esta Tesis, asociando dichos valores a los resultados obtenidos en los ensayos realizados en el presente capítulo.

En resumen, los resultados informados en el presente capítulo permitieron:

- Ajustar una metodología de cultivo de *H. curvispina* en condiciones de laboratorio y la obtención de organismos aptos para bioensayos.
- Definir la dieta ofrecida a los anfípodos tanto para el mantenimiento de los cultivos como para los ensayos, desde el período de aclimatación.
- Realizar el primer aporte al conocimiento del efecto del nitrógeno amoniacal sobre *H. curvispina*.

CAPITULO 5

TOXICIDAD DE COBRE Y CADMIO EN SOLUCION: EFECTOS SOBRE LA SOBREVIVENCIA, EL CRECIMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE METALES EN TEJIDO

5.1 Introducción

En la evaluación ecotoxicológica es crucial el uso de bioensayos estandarizados que posibiliten comparaciones entre diferentes ambientes, para un mismo ambiente a diferentes tiempos, entre regiones geográficas, etc. La estandarización de bioensayos demanda no solo la protocolización de la metodología sino también la selección de la especie prueba, la etapa del ciclo de vida más conveniente, la matriz de ensayo y el/los tóxicos de referencia adecuados entre otros (García, 2009).

La evaluación ecotoxicológica mediante realización de bioensayos, requiere usar especies validadas, esto es, deben estar establecidas las diferencias y semejanzas en las respuestas a tóxicos de referencia de la especie utilizada en relación a la estandarizada, bajo un diseño experimental lo más cercano posible al normado. La agencia ambiental canadiense (EC, 1990) sugiere ciertos compuestos para su utilización en controles de calidad, dentro de los cuales se encuentra el cobre (CuSO_4), y el cadmio (CdCl_2) como compuestos inorgánicos.

Como se mencionó en el capítulo 1, existe una tendencia global a evaluar el impacto de poluentes sobre un sistema acuático particular a través del monitoreo ecotoxicológico con especies nativas (Rand *et al.*, 1995; Ferrari *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2006; King *et al.*, 2006; Dutra *et al.*, 2008).

En relación a las especies utilizadas en esta Tesis, la información existente sobre la sensibilidad de *H. curvispina* a compuestos tóxicos aún es escasa, y se basa

mayormente en la determinación de parámetros de letalidad, en tanto que para *H. pseudoazteca* es inexistente.

Para Cd, los criterios de calidad para protección de la biota en agua dulce permiten para aguas superficiales un rango de concentraciones ente 0,2 y 4 $\mu\text{gCd/L}$, para durezas menores a 60 y superiores a 180 mgCaCO_3/L respectivamente, en tanto que para Cu los niveles permitidos se encuentran entre 2 y 4 $\mu\text{g/L}$ para durezas menores a 80 mg/L y mayores a 180 mgCaCO_3/L , respectivamente (Ley Nacional N° 24051 de Residuos Peligrosos, 1991). A su vez, en cuerpos de agua poluídos de áreas periurbanas de Argentina se han registrado concentraciones de Cd tan altas como 700-1700 $\mu\text{gCd/L}$ (Salibián, 2006). En el trabajo realizado por Gariboldi (2010) en el Arroyo Gutiérrez, cuenca del río Luján, los valores de Cd (10 $\mu\text{g/L}$) y Cu (760-990 $\mu\text{g/L}$) determinados en la columna de agua excedieron los límites establecidos por la Ley 24.051 y la Guía de Calidad de Medio Ambiente de Canadá (CEQG). A su vez, Ossana (2011) informó concentraciones de Cu de 180 $\mu\text{g/L}$ en el río Luján.

Por lo tanto, los estudios realizados en el presente capítulo pretenden contribuir a incrementar el conocimiento de la sensibilidad de diferentes estadios de *H. curvispina* y *H. pseudoazteca* a cadmio y cobre (tóxicos referentes) en medio acuoso, en concentraciones esperadas en los cuerpos de agua regionales.

5.2 Objetivos

- Evaluar supervivencia, crecimiento (como longitud y bioamasa) y carga corporal de Cd o Cu en dos estadios de *Hyalella curvispina* en matriz acuosa, bajo condiciones experimentales fijadas.
- Investigar la utilidad del Índice de Masa Corporal (IMC) como nuevo parámetro evaluador de efecto subletal, por exposición a Cu y Cd.
- Evaluar la sensibilidad al Cu en *H. pseudoazteca* y la utilidad de la especie como organismo prueba en bioensayos de toxicidad en medio acuoso.

5.3 Materiales y Métodos

Se realizaron ensayos estáticos de exposición a Cd o Cu de 4 ó 10 días de duración con juveniles y machos de *H. curvispina* y *H. pseudoazteca*. El medio de dilución fue agua moderadamente dura (MHW). Los bioensayos se llevaron a cabo bajo las condiciones detalladas en el ítem 3.3 del capítulo 3.

Las concentraciones de ambos metales empleadas en los experimentos se seleccionaron en base a ensayos preliminares realizados en el laboratorio. Además, las mismas se encontraron dentro del rango de concentraciones detectadas en diferentes cuerpos de agua regionales.

Los anfípodos de ambas especies fueron seleccionados por tamizado a partir de cultivos de laboratorio (*indoor*). El proceso de aclimatación de los mismos se encuentra descrito en el ítem 3.3 del capítulo 3.

En la Tabla 5.1 se indican los detalles de los experimentos realizados con *H. curvispina*.

Ensayo	Estadio	N° Organismos	N° Tratamientos	Réplicas/ Tratamiento	Rango de concentraciones (µg/L)	Duración del Ensayo	Puntos Finales
Cd-1 (*)	Juveniles	240	4	6	0-20	10	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación Cd en tejido
Cd-2	Machos Jóvenes	130	4	3-4	0-20	10	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación Cd en tejido
Cd-3	Machos Mayores	120	4	3	0-20	10	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación Cd en tejido
Cu-1	Juveniles	150	5	3	0-400	10	CL50
Cu-2	Juveniles	200	4	5	0-150	10	Sobrevivencia Crecimiento IMC
Cu-3	Machos Mayores	60	3	2	0-150	10	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación Cu en tejido

Tabla 5.1: Experimentos realizados con *H. curvispina* expuestas a cadmio (Cd) o cobre (Cu). Se detalla el **Estadio** de la especie utilizada, el **N° total de organismos** empleados en cada ensayo, el **N° de Tratamientos**, el número de **Réplicas por Tratamiento**, el **Rango de Concentraciones** ensayadas, **Duración del Ensayo** (días) y los **Puntos Finales** evaluados. (*): dos ensayos.

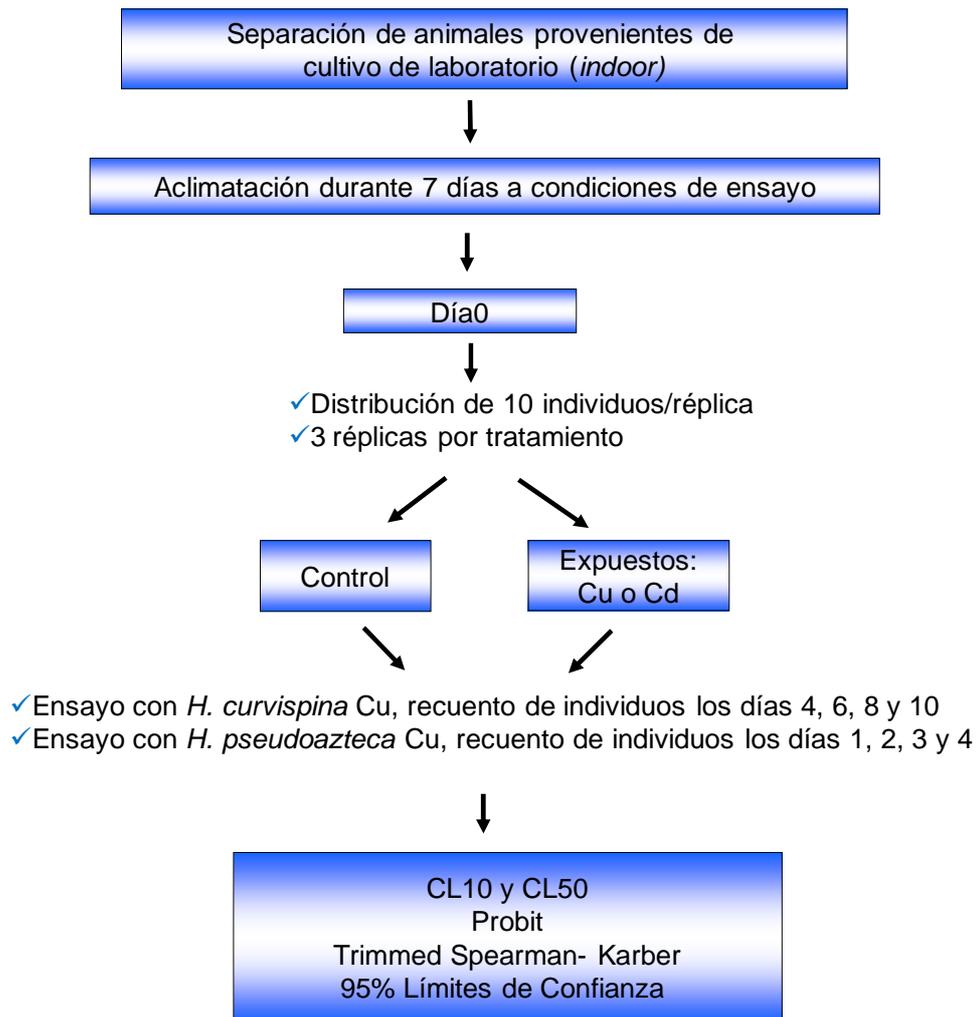
En la Tabla 5.2 se indican los detalles de los experimentos realizados con *H. pseudoazteca*.

Ensayo	Estadio	N° organismos	N° Tratamientos	Réplicas/ Tratamiento	Rango de Concentraciones (µg/L)	Duración del Ensayo	Puntos Finales
J1	Juveniles	210	7	3	0-800	96 hs	CL 50 Acumulación Cu en tejidos
J2	Juveniles	180	6	3	0-150	10 días	ND
J3	Juveniles	150	3	5	0-100	10 días	ND
M1	Machos	150	3	5	0-100	10 días	ND
M2	Machos	360	3	12	0-100	10 días	ND
M3	Machos	240	3	8	0-100	10 días	ND
M4	Machos	150	3	5	0-100	10 días	ND

Tabla 5.2: Experiencias realizadas con *H. pseudoazteca* expuestas a cobre (Cu). Se detalla el **Estadio** de la especie utilizada, el **N° total de organismos** empleados en el ensayo, el **N° de Tratamientos**, el número de **Réplicas por Tratamiento**, el **Rango de Concentraciones** ensayadas, **Duración del Ensayo** y los **Puntos Finales**. ND: no determinado (ver sección 5.4, Resultados).

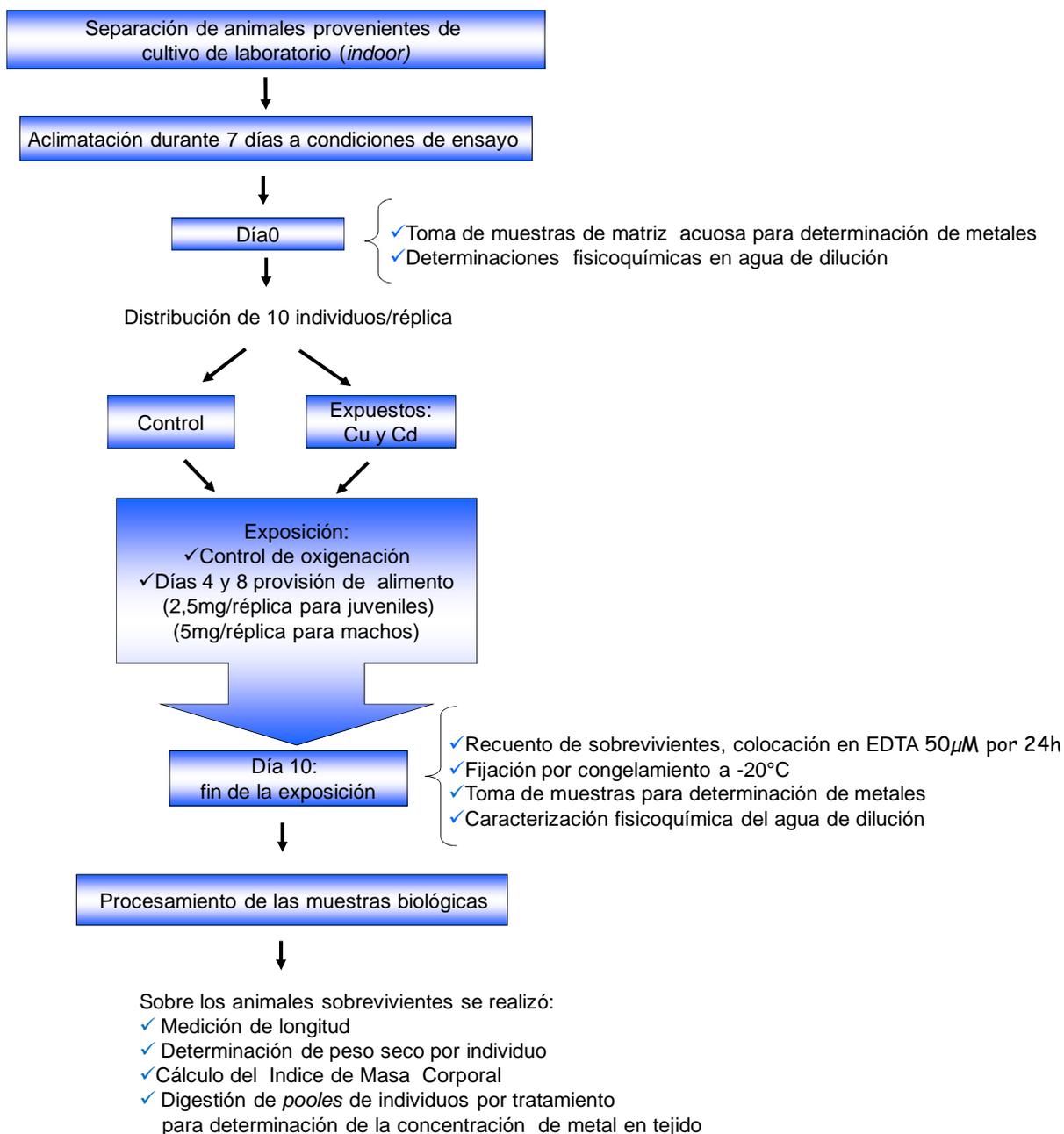
En las figuras 5.1 y 5.2 se esquematiza el diseño y procedimiento experimental seguido en los ensayos aquí descriptos para ambas especies.

Figura 5.1: Procedimiento experimental para ensayos de letalidad (C L50).



En el ensayo realizado con *H. curvispina* se suministró alimento los días 4 y 8 de exposición, en tanto que en el experimento con *H. pseudoazteca* el alimento fue adicionado a las 48h de ensayo.

Figura 5.2: Procedimiento experimental para ensayos de crecimiento y concentración de metal en tejido.



Las determinaciones de longitud, peso seco, concentración de metales en tejidos y en solución, así como el cálculo del Índice de Masa Corporal se describen en el ítem 3.4.1 del capítulo 3. A su vez, en los ítems 3.6 y 3.7 del mismo capítulo se detallan las determinaciones de los parámetros de calidad de agua y análisis estadístico.

5.3.1 Análisis estadístico

Las concentraciones letales (CL) fueron calculadas con el programa EPA Probit Versión 1.5 (Norberg-King, 1993). En el ensayo con *H. curvispina* se utilizaron concentraciones efectivas, en tanto que en el ensayo con *H. pseudoazteca* se utilizaron concentraciones nominales.

En los restantes ensayos, los resultados fueron expresados como media \pm error estándar. Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizaron las pruebas de Shapiro–Wilks y Levene, respectivamente. Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se realizaron Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba a posteriori de Tukey. En los casos en que no se cumplieron los supuestos se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 2010). Se trabajó con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

5.4 Resultados

5.4.1 Ensayos con *Hyaella curvispina*

En la mayoría de los ensayos los valores analíticos de cadmio o cobre en solución presentaron una disminución a tiempo final de exposición, respecto del tiempo inicial (Tablas 5.3, 5.4, 5.5, 5.9 y 5.10). Esta pérdida es esperable en sistemas estáticos y está probablemente relacionada tanto a la absorción de los metales por parte de los animales como también a la adsorción de los mismos sobre el sustrato y/o material particulado. Además, en el caso del Cd también puede deberse a su precipitación como otavite (CdCO_3) (Mastrangelo *et al.*, 2011). El mismo efecto fue observado por King *et al.* (2005; 2006) en bioensayos estáticos realizados con anfípodos en medio acuoso, expuestos a Cu y Zn. Cuando la concentración de un tóxico disminuye con la duración del experimento, las concentraciones de efecto (por ejemplo, CL50) pueden ser sobreestimadas si para la realización de los cálculos se utilizan únicamente las concentraciones iniciales. Por lo tanto, utilizar las concentraciones medias resulta mucho más apropiado que el uso de concentraciones nominales o medidas sólo inicialmente en agua (Simpson *et al.*, 2003). En función de lo expuesto, en todos los experimentos se siguió el criterio empleado por King *et al.* (2005, 2006), y los valores de las concentraciones de Cd y Cu en solución se informaron como el promedio de las concentraciones efectivas entre el tiempo inicial y final de exposición (CP).

5.4.1.1 Evaluación de la toxicidad del Cd en solución sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-1)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $3,81 \pm 0,34$ (\pm DE; $n=49$).

Los parámetros físico-químicos y concentraciones medidas de cadmio a tiempo inicial y final en los medios de ensayo se muestran en la Tabla 5.3.

Los valores medidos de cadmio, de menor a mayor concentración fueron, 60, 70 y 80% de los valores nominales en el tiempo de experimentación inicial y presentaron una disminución de 1,5, 2 y 2,5 veces a tiempo final de exposición. En consecuencia las concentraciones nominales 5, 10 y 20 $\mu\text{gCd/L}$, fueron expresadas como 2,5, 5,25 y 11,25 $\mu\text{gCd/L}$, respectivamente. El resto de los parámetros no registraron cambios significativos entre ambos tiempos.

Se observó una disminución significativa de la supervivencia sólo en la mayor concentración ensayada (11,25 $\mu\text{gCd/L}$) en relación al resto de los tratamientos (Tabla 5.3 y Anexo I, Tabla 2).

Concentración Nominal	Control		5 $\mu\text{gCd/L}$		10 $\mu\text{gCd/L}$		20 $\mu\text{gCd/L}$	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Tiempo								
pH	8,2 \pm 0,0	8,0 \pm 0,3	8,1 \pm 0,0	8,1 \pm 0,3	8,1 \pm 0,0	8,1 \pm 0,2	8,1 \pm 0,0	8,0 \pm 0,3
OD (mg/L)	8,3 \pm 0,5	6,6 \pm 1,2	8,3 \pm 0,4	6,7 \pm 1,3	8,2 \pm 0,4	6,9 \pm 0,9	8,3 \pm 0,3	6,7 \pm 1,3
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 10	100 \pm 0
Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	508 \pm 15	538 \pm 30	505 \pm 15	530 \pm 36	500 \pm 9	535 \pm 32	501 \pm 9	540 \pm 29
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	0,2 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,0
CE ($\mu\text{g/L}$)	<1,0 \pm 0,0	<1,0 \pm 0,0	3,0 \pm 0,2	2 \pm 0,1	7,0 \pm 1,0	3,5 \pm 0,7	16 \pm 1,0	6,5 \pm 0,7
CP ($\mu\text{g/L}$)	<1		2,5		5,25		11,25	
Supervivencia (%)	--	94 \pm 7	--	90 \pm 9	--	95 \pm 5	--	55 \pm 12(*)

Tabla 5.3: Parámetros fisicoquímicos ($n=2-6$), concentraciones efectivas de cadmio (CE, $n=2$) y porcentaje de supervivencia de juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones del metal en MHW. Valores expresados como media \pm DS. CP: concentración promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición; Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final. (*): indica diferencias significativas con el grupo control, 2,5 $\mu\text{gCd/L}$ y 5,25 $\mu\text{gCd/L}$.

Los animales aumentaron su biomasa y longitud en todos los tratamientos respecto del grupo inicial, pero el incremento fue significativamente menor en el grupo expuesto a la mayor concentración de Cd. A su vez, los animales ensayados a 11,25 $\mu\text{gCd/L}$ se diferenciaron del grupo control y de los expuestos a 2,5 $\mu\text{gCd/L}$ (Fig. 5.3. A y B).

Mientras que en el grupo control y en el expuesto a 2,5 $\mu\text{gCd/L}$ los individuos aumentaron su peso seco entre un 71 y un 80% con respecto al grupo de tiempo inicial, los expuestos a 5,25 y 11,25 $\mu\text{gCd/L}$ lo hicieron un 56% y un 24% respectivamente (Fig. 5.3.A).

En relación al grupo inicial, el grupo control y el expuesto a 2,5 $\mu\text{gCd/L}$ incrementaron su longitud un 20%, en tanto que los expuestos a 5,25 y a 11,25 $\mu\text{gCd/L}$ lo hicieron en un 13% y 9% respectivamente (Fig. 5.3.B).

El Índice de Masa Corporal (IMC) mostró diferencias significativas entre el grupo expuesto a 11,25 $\mu\text{gCd/L}$ y el resto de los tratamientos. Pero en contraste a lo observado con la longitud y biomasa evaluadas por separado, indicó diferencias significativas también con el grupo expuesto a 5,25 $\mu\text{gCd/L}$ (Fig. 5.3.C) permitiendo una mejor discriminación entre tratamientos. Por lo tanto, el índice refleja que el estado general de los animales fue comparable entre el grupo control y los expuestos a las dos concentraciones menores de Cd, y que el estado general de los animales expuestos a 11,25 $\mu\text{gCd/L}$ se vio afectado en relación al resto de los tratamientos.

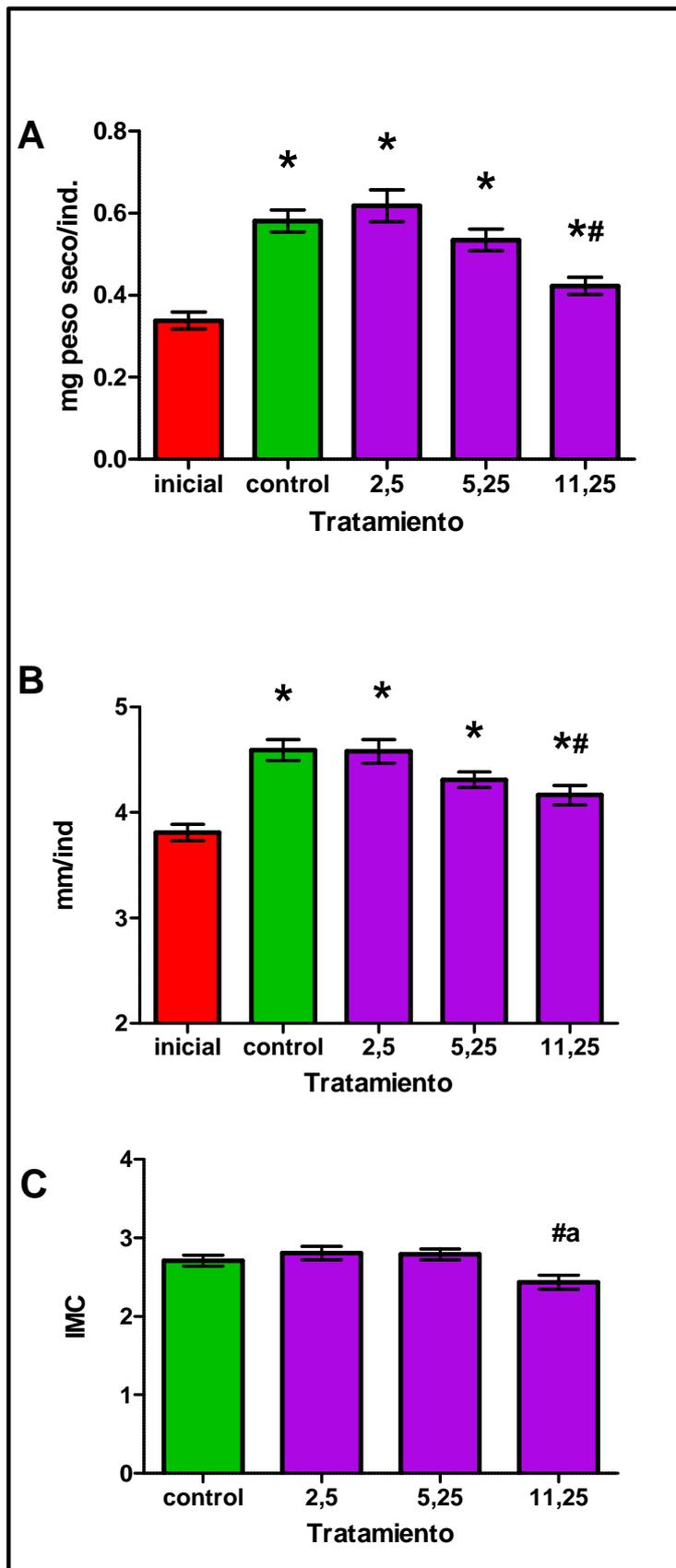


Fig. 5.3. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cd en MHW.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con el grupo control y 2,5 μ g/L.

a: indica diferencias significativas con 5,25 μ g/L.

Nivel de significancia $p < 0,05$.

5.4.1.2 Evaluación de la toxicidad del Cd en solución sobre machos jóvenes: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-2)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $4,39 \pm 0,49$ (\pm DE; $n=15$).

Los parámetros físico-químicos y concentraciones medidas de cadmio a tiempo inicial y final en los medios de ensayo se muestran en la Tabla 5.4.

Las medidas de cadmio de menor a mayor concentración fueron, 60, 80 y 100% de los valores nominales en el tiempo de experimentación inicial y presentaron una disminución de 2 y 3 veces, a tiempo final de exposición. En consecuencia las concentraciones nominales 5, 10 y 20 $\mu\text{gCd/L}$, fueron expresadas como 2,25, 5,35 y 13,5 $\mu\text{gCd/L}$, respectivamente. El resto de los parámetros fisicoquímicos medidos no varió significativamente de las condiciones iniciales en ninguno de los tratamientos.

En estas condiciones experimentales, se observó una disminución significativa de la supervivencia sólo en la concentración más alta probada (13,5 $\mu\text{gCd/L}$) en relación al resto de los tratamientos (Tabla 5.4 y Anexo I, Tabla 6).

Concentración Nominal	Control		5 $\mu\text{gCd/L}$		10 $\mu\text{gCd/L}$		20 $\mu\text{gCd/L}$	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Tiempo								
pH	8,0	7,6 \pm 0,1	8,1	7,5 \pm 0,0	8,2	7,5 \pm 0,0	8,1	7,5 \pm 0,0
OD (mg/L)	8,6	5,5 \pm 0,2	8,6	5,5 \pm 0,1	8,5	6,1 \pm 0,2	8,5	5,6 \pm 0,2
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	100 \pm 10	90	110 \pm 10	90	110 \pm 10	90	110 \pm 0
Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	497	560 \pm 27	495	560 \pm 25	494	563 \pm 13	495	565 \pm 13
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	0,2 \pm 0,1	0	0,1 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,1	0	0,2 \pm 0,0
CE ($\mu\text{g/L}$)	<1	<1	3	1,5	8	2,7	20	7
CP ($\mu\text{g/L}$)		<1		2,25		5,35		13,5
Supervivencia (%)	--	95 \pm 10	--	90 \pm 10	--	93 \pm 6	--	53 \pm 15(*)

Tabla 5.4: Parámetros fisicoquímicos ($n=1-4$), concentraciones efectivas de cadmio (CE, $n=1$) y porcentaje de supervivencia de machos jóvenes de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones del metal en MHW. Valores expresados como media \pm DS. CP: concentración promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición. (*): indica diferencias significativas con el grupo control, 2,25 $\mu\text{gCd/L}$ y 5,35 $\mu\text{gCd/L}$.

En relación al grupo inicial, se registró un incremento significativo en biomasa y longitud en los animales del grupo control y de los tratamientos de 2,25 y 5,35 $\mu\text{gCd/L}$; mientras que para el grupo expuesto a 13,5 $\mu\text{gCd/L}$ no se observaron diferencias significativas con respecto a dicho grupo (Fig. 5.4. A y B).

En comparación con el grupo inicial, el incremento en peso seco del grupo control y de los expuestos a 2,25 y 5,35 $\mu\text{gCd/L}$ fue entre un 45 y un 70%, mientras que los animales expuestos a 13,5 $\mu\text{gCd/L}$ no incrementaron su peso. En relación a la longitud el incremento en los grupos control y expuestos a 2,25 $\mu\text{gCd/L}$ fue de un 20 y un 24%, y de un 10% y 4% en 5,35 $\mu\text{gCd/L}$ y 13,5 $\mu\text{gCd/L}$, respectivamente.

Los animales expuestos a 13,5 $\mu\text{gCd/L}$ mostraron diferencias significativas en biomasa con el grupo control y con los expuestos a 2,25 y 5,35 $\mu\text{g/L}$; mientras que en longitud se diferenciaron significativamente sólo del control y de los expuestos a 2,25 $\mu\text{g/L}$.

A tiempo final de ensayo la longitud y biomasa de los animales sobrevivientes expuestos a 2,25 $\mu\text{gCd/L}$ no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (Fig. 5.4. A y B); en tanto que los expuestos a 5,35 $\mu\text{g/L}$ solo se diferenciaron del control en longitud (Fig. 5.4.B).

Al igual que en el ensayo con juveniles, el IMC mostró diferencias significativas entre los anfípodos ensayados a la mayor concentración (13,5 $\mu\text{gCd/L}$) y los animales del grupo control y los expuestos a las dos concentraciones más bajas de Cd (2,25 y 5,35 $\mu\text{g/L}$) (Fig. 5.4.C).

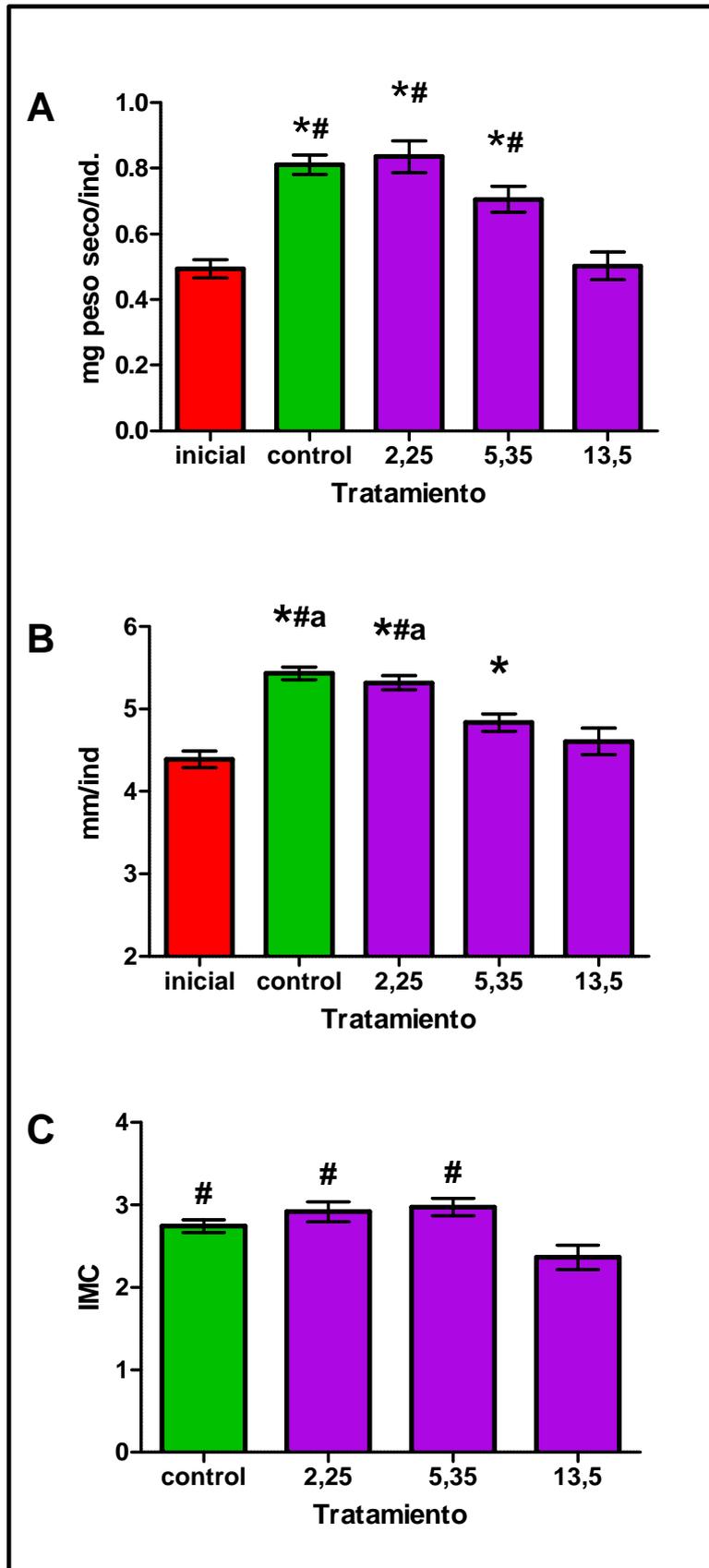


Fig. 5.4. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos jóvenes de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cd en MHW.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con 13,5 μ g/L.

a: indica diferencias significativas con 5,35 μ g/L.

Nivel de significancia $p < 0,05$.

5.4.1.3 Evaluación de la toxicidad del Cd en solución sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-3)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $7,05 \pm 0,77$ (\pm DE; $n=20$).

Los parámetros físico-químicos y concentraciones medidas de cadmio a tiempo inicial y final en los medios de ensayo se muestran en la Tabla 5.5.

Las medidas de cadmio de menor a mayor concentración fueron, 60, 90 y 95% de los valores nominales al tiempo inicial y presentaron una disminución de 3, 4,5 y 3,2 veces, respectivamente, a tiempo final de exposición. En consecuencia las concentraciones nominales 5, 10 y 20 $\mu\text{gCd/L}$, expresadas como 2,5, 5 y 12,5 $\mu\text{gCd/L}$, respectivamente.

En estas condiciones experimentales, si bien se observó una disminución de la supervivencia en la concentración más alta probada (12,5 $\mu\text{gCd/L}$), esta no fue significativa (Tabla 5.5 y Anexo I Tabla 10).

Concentración Nominal	Control		5 $\mu\text{gCd/L}$		10 $\mu\text{gCd/L}$		20 $\mu\text{gCd/L}$	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Tiempo								
pH	7,8	7,6 \pm 0,1	7,8	7,5 \pm 0,0	7,9	7,5 \pm 0,0	7,9	7,5 \pm 0,0
OD (mg/L)	8,3	6,9 \pm 0,2	8,2	6,6 \pm 0,2	8,2	6,8 \pm 0,3	8,2	6,5 \pm 0,1
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	90 \pm 0	90	100 \pm 10	90	90 \pm 0	90	100 \pm 0
Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	385	--	387	--	384	--	384	--
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	2,3 \pm 0,4	0	3,0 \pm 0,3	0	2,5 \pm 0,8	0	3,3 \pm 0,6
CE ($\mu\text{g/L}$)	<1	<1	3	1	9	2	19	6
CP ($\mu\text{g/L}$)		<1		2		5,5		12,5
Supervivencia (%)	--	90 \pm 8	--	80 \pm 14	--	80 \pm 10	--	67 \pm 21

Tabla 5.5: Parámetros fisicoquímicos ($n=1-4$), concentraciones efectivas de cadmio (CE, $n=1$) y porcentaje de supervivencia de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones del metal en MHW. Valores expresados como media \pm DS. CP: concentración promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición.

En ninguno de los tres parámetros analizados se observaron diferencias significativas entre el grupo inicial, el control y los animales expuestos a las diferentes concentraciones de Cd (Fig. 5.5. A, B y C).

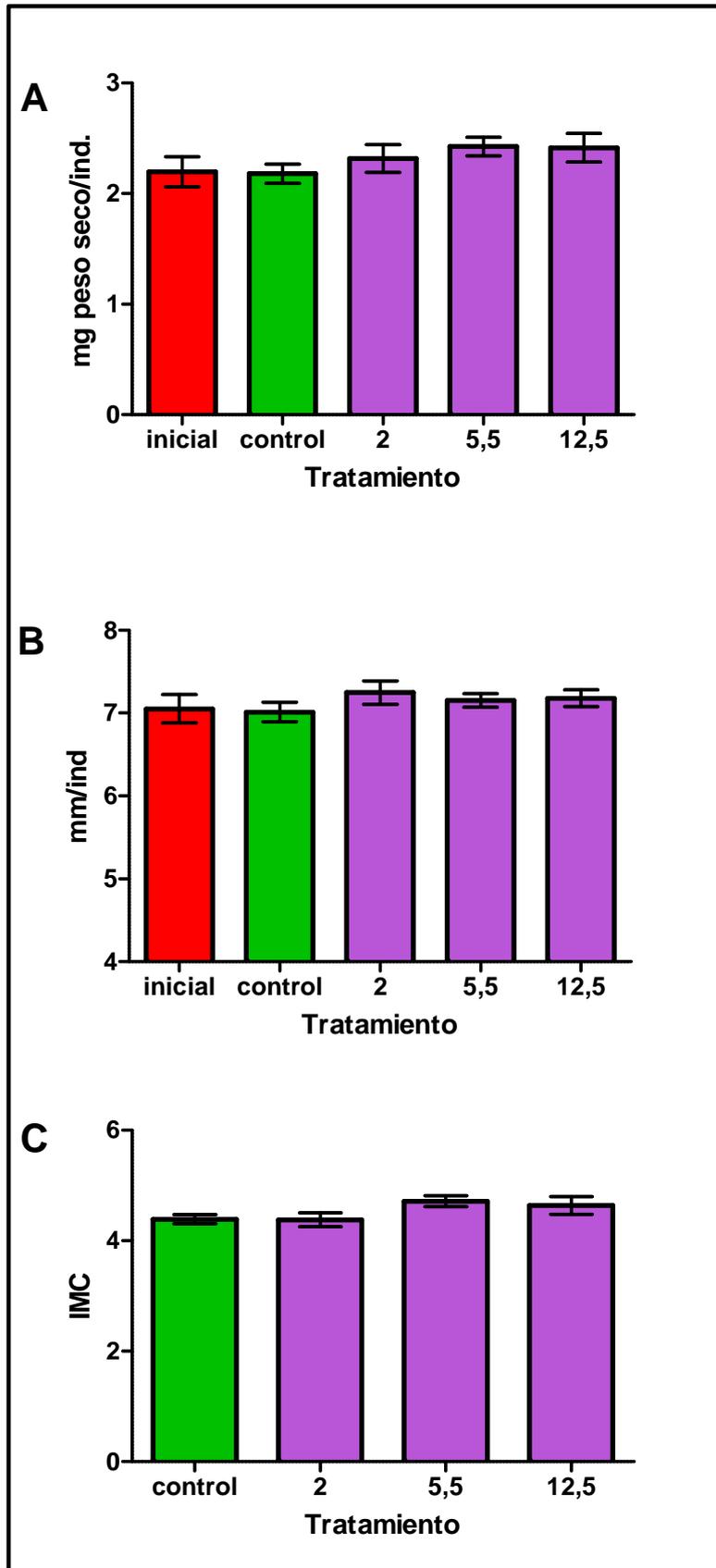


Fig. 5.5. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cd en MHW.

5.4.1.4 Concentración de Cd en tejidos

Los resultados que se muestran a continuación agrupan los obtenidos en los siguientes ensayos:

- Cd-1; juveniles (J)
- Cd-2; machos jóvenes (Mj)
- Cd-3; machos mayores (Mm)

El contenido de cadmio en el tejido de los animales expuestos por 10 días a Cd en MHW se muestra en la Tabla 5.6 y Fig. 5.6.

CN	Control	5 µgCd/L	10 µgCd/L	20 µgCd/L
J	nd	80±20	140±40 (*)	219±40 (*#)
	n=6 (0)	n=6 (2,5)	n=6 (5,25)	n=3 (11,25)
Mj	nd	48±4	90±0	180
	n=2 (0)	n=2 (2,25)	n=2 (5,35)	n=1 (13,5)
Mm	nd	37±2	60±15	114±30(*)
	n=4 (0)	n=2 (2)	n=3 (5,5)	n=3 (12,5)

Tabla 5.6: Contenido de Cd en tejido (µgCd/g PS) en juveniles (J), machos jóvenes (Mj) y machos mayores (Mm) de *H. curvispina*. Valores expresados como promedio ± DE. CN: concentración nominal; n: número de réplicas; entre paréntesis: concentración efectiva promedio; nd: no detectado. Límite de detección 1µgCd/L. (*): indica diferencias significativas con el control; (#): indica diferencias significativas con 2,5 µgCd/L (J).

Los resultados de la carga corporal de cadmio revelaron que el período de exposición fue lo suficientemente largo para acumular cadmio en el tejido de los animales en concentraciones detectables. En todos los casos, la incorporación de cadmio incrementó con la concentración de exposición, y disminuyó con el incremento de la talla y edad (Fig. 5.6). En los ensayos correspondientes a juveniles y machos jóvenes, en la mayor concentración de exposición, la carga corporal registrada (219 y 180 µgCd/g de PS, respectivamente) representa la carga de Cd del 55% y del 53% de los animales sobrevivientes (Fig. 5.7), lo cual podría equipararse para estas condiciones experimentales, a la carga de Cd esperada para la CL50 de esta especie en estos estadios.

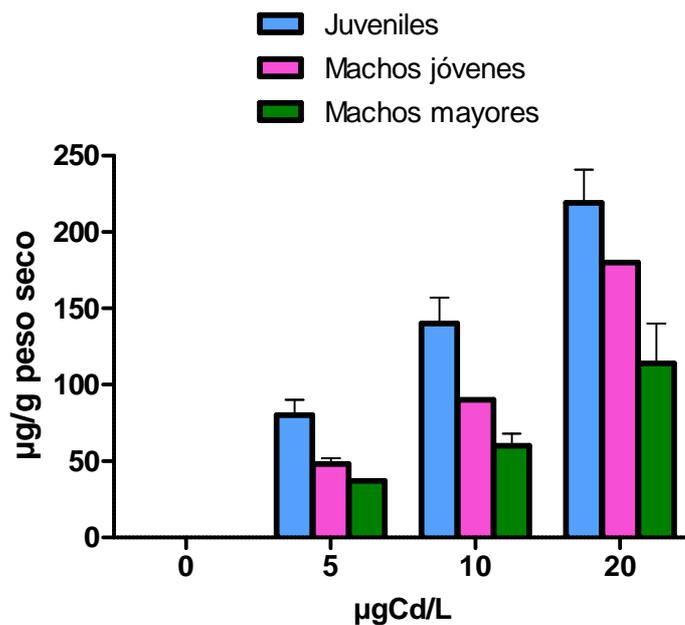


Figura 5.6: Comparación del Cd acumulado en tejido en juveniles, machos jóvenes y machos mayores de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a diferentes concentraciones de Cd en medio acuoso (concentraciones nominales). Valores expresados como promedio \pm EEM.

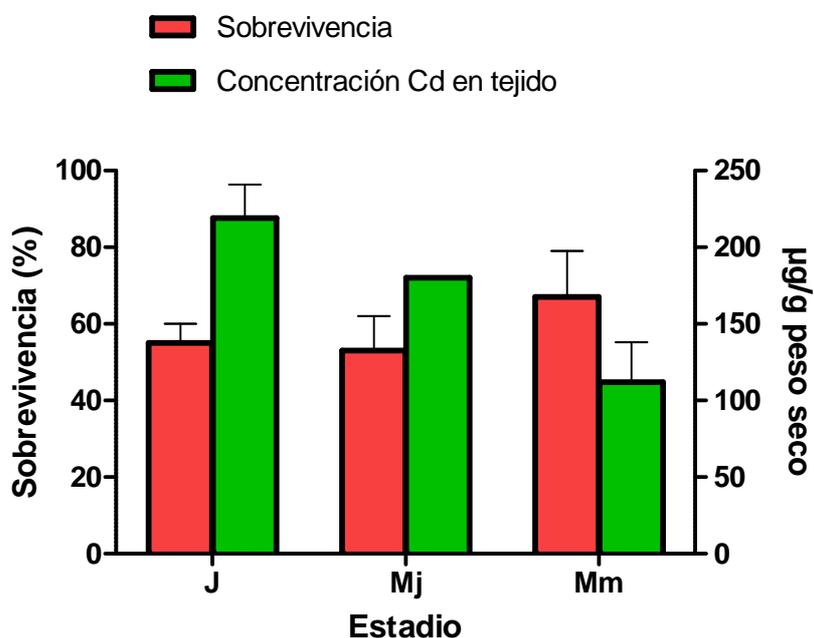


Figura 5.7: Efecto del Cd sobre la sobrevivencia y acumulación del metal en tejido en juveniles (J), machos jóvenes (Mj) y machos mayores (Mm) de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a 20 µgCd/L (concentración nominal). Valores expresados como media \pm EE.

5.4.1.5 Determinación de la concentración letal de Cu en juveniles (Ensayo Cu-1)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $2,88 \pm 0,32$ (\pm DE; $n=15$).

Los parámetros físico-químicos y concentraciones medidas de cobre a tiempo inicial y final en los medios de ensayo se muestran en la Tabla 5.7. A diferencia de lo observado en los ensayos previos, el control mostró valores detectables de Cu y un aumento de la concentración del metal a tiempo final en relación al inicial. Dicho incremento también se determinó en las tres concentraciones menores ensayadas. A pesar de este efecto, se siguió el mismo criterio y se utilizaron las CP para los cálculos de CL50.

Concentración Nominal	Tiempo	pH	OD (mg/L)	Dureza (mgCaCO ₃ /L)	Conduct. (μS/cm)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	CE (μg/L)	CP (μg/L)
0 μgCu/L	Inicial	7,7	8,4	90	363	0	49,5	53,0
	Final	8,1±0,0	8,2±0,0	110±10	398±17	0,6±0,0	56,4	
37,5 μgCu/L	Inicial	7,7	8,4	90	361	0	67,8	78,4
	Final	8,1±0,0	8,1±0,0	110±10	400±17	0,6±0,1	88,9	
75 μgCu/L	Inicial	7,7	8,3	90	362	0	101,1	110,1
	Final	8,1±0,0	8,2±0,0	110±10	392±4	0,6±0,0	119	
150 μgCu/L	Inicial	7,7	8,4	90	362	0	166,2	170,6
	Final	8,1±0,0	8,2±0,0	100±0	384±2	0,6±0,0	175	
300 μgCu/L	Inicial	7,7	8,4	90	362	0	299,2	266,7
	Final	8,1±0,0	8,2±0,0	110±10	383±1	0,3±0,1	234,1	
400 μgCu/L	Inicial	7,7	8,4	90	362	0	394	359,3
	Final	8,2±0,0	8,2±0,1	130±10	381±2	0,3±0,1	324,5	

Tabla 5.7: Ensayo realizado con juveniles de *H. curvispina* en MHW. Parámetros fisicoquímicos ($n=2-3$) y concentraciones de cobre efectivas (CE; $n=1$) determinados a tiempo inicial y final de exposición. Valores expresados como media \pm DS. CP concentración promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición.

En la Tabla 5.8 se observan los valores de las concentraciones letales de cobre (CL10 y CL50 en μgCu/L) los días 4, 6, 8 y 10 de exposición en agua moderadamente dura (MHW) para juveniles de *H. curvispina*.

Días	CL10	LCI-LCS	CL50	LCI-LCS	Pendiente	Ordenada al Origen	Chi ²
4	223,0	142,6-256,3	300,5	265,4-330,2	9,9	-19,5	0,9
6	143,0	84,9-178,7	248,5	208,6-286,0	5,3	-7,8	5,0
8	124,0	70,6-159,2	225,1	183,5-261,5	5,0	-6,6	6,7
10	121,8	74,1-153,0	199,9	161,9-229,5	6,0	-8,7	6,2

Tabla 5.8: Concentraciones letales (CL10 y CL50) en µgCu/L a diferentes tiempos de exposición de juveniles de *H. curvispina* en agua moderadamente dura (MHW). LCI, LCS: límites de confianza inferior y superior (N total=150).

Las curvas de supervivencia en función del tiempo para cada concentración de Cu se observan en la Figura 5.8.

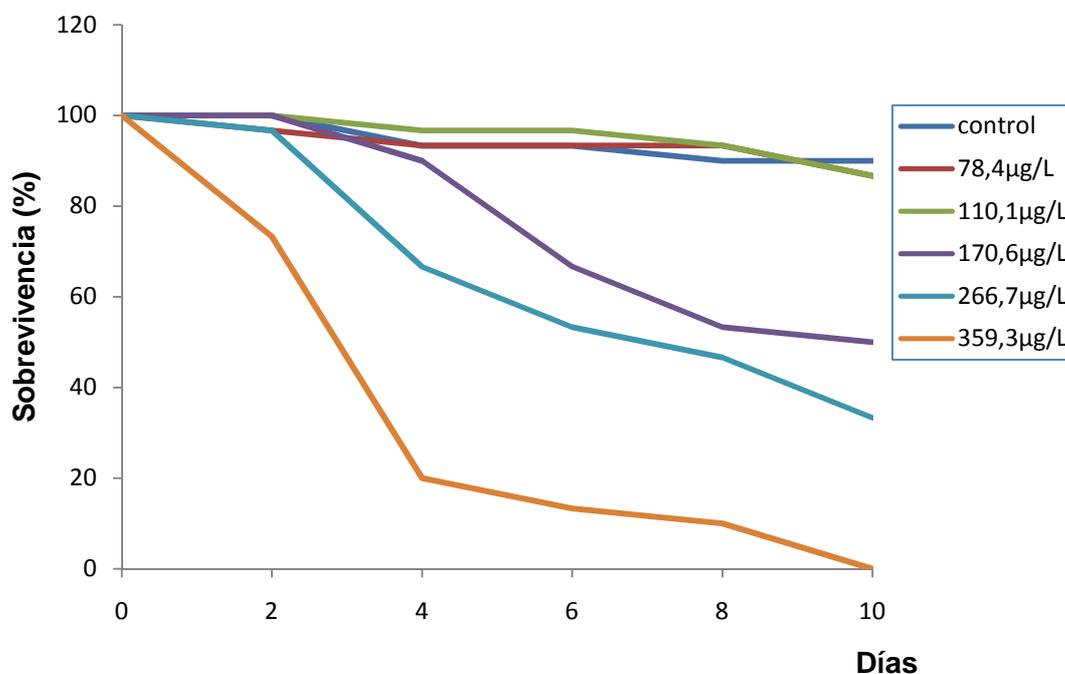


Figura 5.8: Supervivencia de juveniles de *H. curvispina* en función del tiempo para las diferentes concentraciones de cobre en MHW ensayadas.

5.4.1.6 Evaluación de la toxicidad del Cu en solución sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia y el crecimiento (Ensayo Cu-2)

La longitud promedio a tiempo inicial de ensayo de los individuos empleados fue de $3,31 \pm 0,29$ (\pm DS; n=20).

Los parámetros físico-químicos y concentraciones medidas de cobre a tiempo inicial y final en los medios de ensayo se muestran en la Tabla 5.9.

Las mediciones de Cu en solución estuvieron entre un 80 y un 85% de los valores nominales a tiempo inicial de experimentación y presentaron una disminución entre 1,3 y 1,4 veces, a tiempo final de exposición. En consecuencia las concentraciones nominales 50, 100 y 150 $\mu\text{gCu/L}$, fueron expresadas como 34, 74,5 y 107 $\mu\text{gCu/L}$, respectivamente.

En estas condiciones experimentales, si bien se observó una disminución de la supervivencia en la concentración más alta probada (107 $\mu\text{gCu/L}$), esta no fue significativa (Tabla 5.9 y Anexo I Tabla 16).

Concentración Nominal	Control		50 $\mu\text{gCu/L}$		100 $\mu\text{gCu/L}$		150 $\mu\text{gCu/L}$	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Tiempo								
pH	7,8	7,0 \pm 0,1	7,7	7,4 \pm 0,0	7,7	7,3 \pm 0,0	7,7	7,0 \pm 0,1
OD (mg/L)	8,2	8,0 \pm 0,1	8,2	8,0 \pm 0,1	8,3	8,2 \pm 0,1	8,3	8,1 \pm 0,0
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	110 \pm 10	100	110 \pm 10	100	100 \pm 10	100	100 \pm 10
Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	341	366 \pm 10	334	383 \pm 14	333	364 \pm 9	344	359 \pm 3
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	1,0 \pm 0,1	0	1,5 \pm 0,2	0	0,8 \pm 0,2	0	1,1 \pm 0,2
CE ($\mu\text{g/L}$)	<5	<5	40	28	85	64	122	92
CP ($\mu\text{g/L}$)		<5		34		74,5		107
Supervivencia (%)	--	94 \pm 6	--	94 \pm 6	--	92 \pm 8	--	70 \pm 24

Tabla 5.9: Parámetros fisicoquímicos (n=1-5), concentraciones efectivas de cobre (CE, n=1) y porcentaje de supervivencia de juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones del metal en MWH. Valores expresados como media \pm DS. CP: concentración promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición.

El efecto observado del Cu sobre el crecimiento (expresado como biomasa) fue concentración dependiente. Si bien el peso de los animales correspondientes al grupo control y el de los expuestos a la menor concentración de Cu (34 $\mu\text{g/L}$) incremento en relación al del grupo inicial, dicho aumento no fue significativo, en tanto que los anfípodos expuestos a 74,5 y 107 $\mu\text{g/L}$ mostraron una pérdida de peso significativa (17% y 38% respectivamente), con respecto al grupo inicial (Fig. 5.9.A).

En relación a la longitud, sólo se observó un incremento significativo de este parámetro respecto al grupo inicial, en los animales del grupo control y en los expuestos a 107 $\mu\text{g/L}$ con (Fig. 5.9.B).

El patrón de variación del IMC observado fue el mismo que para la biomasa. Los animales expuestos a 34 µg/L presentaron un IMC equiparable al control (Fig. 5.9.C). En los grupos expuestos a 74,5 y 107 µgCu/L si bien los animales no se diferenciaron en longitud de los controles, perdieron peso de manera significativa, lo cual se ve claramente reflejado en el menor valor del IMC. Estos resultados demuestran que el efecto del Cu sobre el estado general de los animales incrementó con la concentración de exposición.

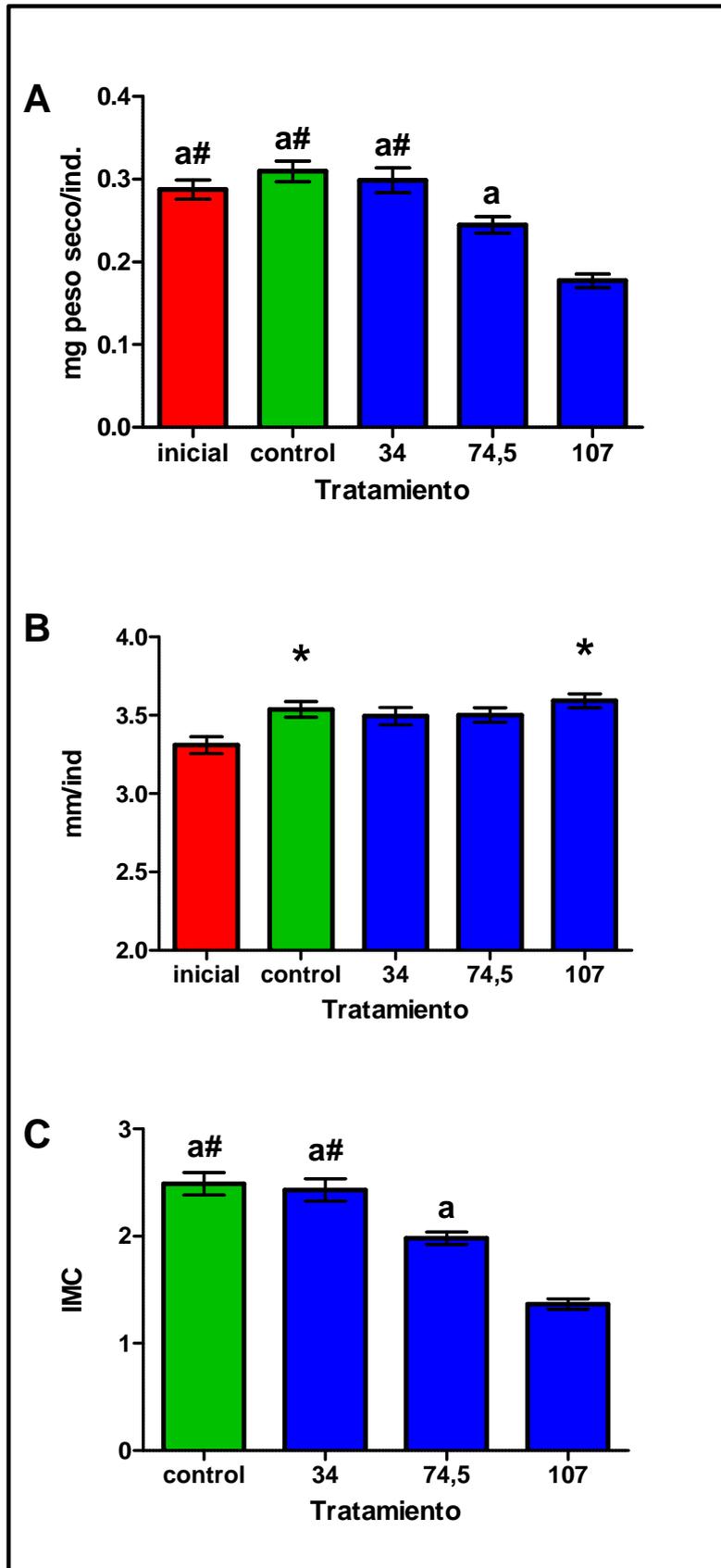


Fig. 5.9. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en MHW.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con 74,5 μ g/L.

a: indica diferencias significativas con 107 μ g/L.

Nivel de significancia $p < 0,05$.

5.4.1.7 Evaluación de la toxicidad del Cu en solución sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-3)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $6,47 \pm 0,46$ (n=20).

Los parámetros físico-químicos y concentraciones medidas de cobre a tiempo inicial y final en los medios de ensayo se muestran en la Tabla 5.10.

Las concentraciones medidas de Cu de menor a mayor fueron, 86 y 77% de los valores nominales en el tiempo de experimentación inicial y presentaron una disminución de 1,4 y 1,3 veces, respectivamente, a tiempo final de exposición. En consecuencia las concentraciones nominales 100 y 150 $\mu\text{gCu/L}$, fueron expresadas como 73 y 101 $\mu\text{gCu/L}$, respectivamente.

En estas condiciones experimentales no se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia de los anfípodos expuestos a las diferentes concentraciones de ensayo (Tabla 5.10. y Anexo I Tabla 20).

Concentración Nominal	Control		100 $\mu\text{gCu/L}$		150 $\mu\text{gCu/L}$	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Tiempo						
pH	7,5	$7,5 \pm 0,0$	7,5	$7,5 \pm 0,1$	7,6	$7,6 \pm 0,1$
OD (mg/L)	7,5	$5,9 \pm 0,2$	7,5	$6,1 \pm 0,3$	7,5	$6,3 \pm 0,2$
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	100	100 ± 10	90	110 ± 0	90	100 ± 0
Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	373	326 ± 8	353	322 ± 5	362	318 ± 5
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	$2,6 \pm 0,5$	0	$1,8 \pm 0,2$	0	$2,5 \pm 0,2$
CE ($\mu\text{g/L}$)	<5	<5	86	60	115	87
CP ($\mu\text{g/L}$)		<5		73		101
Supervivencia (%)	--	90 ± 0	--	85 ± 7	--	85 ± 7

Tabla 5.10: Parámetros fisicoquímicos (n=1-2), concentraciones efectiva de cobre (CE, n=1) y porcentaje de sobrevivencia de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones del metal en MHW. Valores expresados como media \pm DS. CP: concentración promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición.

El crecimiento de los machos mayores, tanto en biomasa como en longitud, no se vio afectado por la exposición a Cu (Fig. 5.10. A y B). En la Fig. 5.10. A, si bien se observa

una tendencia a la disminución del peso en los animales expuestos a la mayor concentración del metal, la diferencia no fue significativa. Contrariamente, el IMC reflejó diferencias significativas entre los anfípodos del grupo control y los expuestos a 101 µg/L (Fig. 5.10. C). Por lo tanto en este caso, solo el IMC permitió discriminar efectos del metal a esta concentración sobre el estado general de los animales.

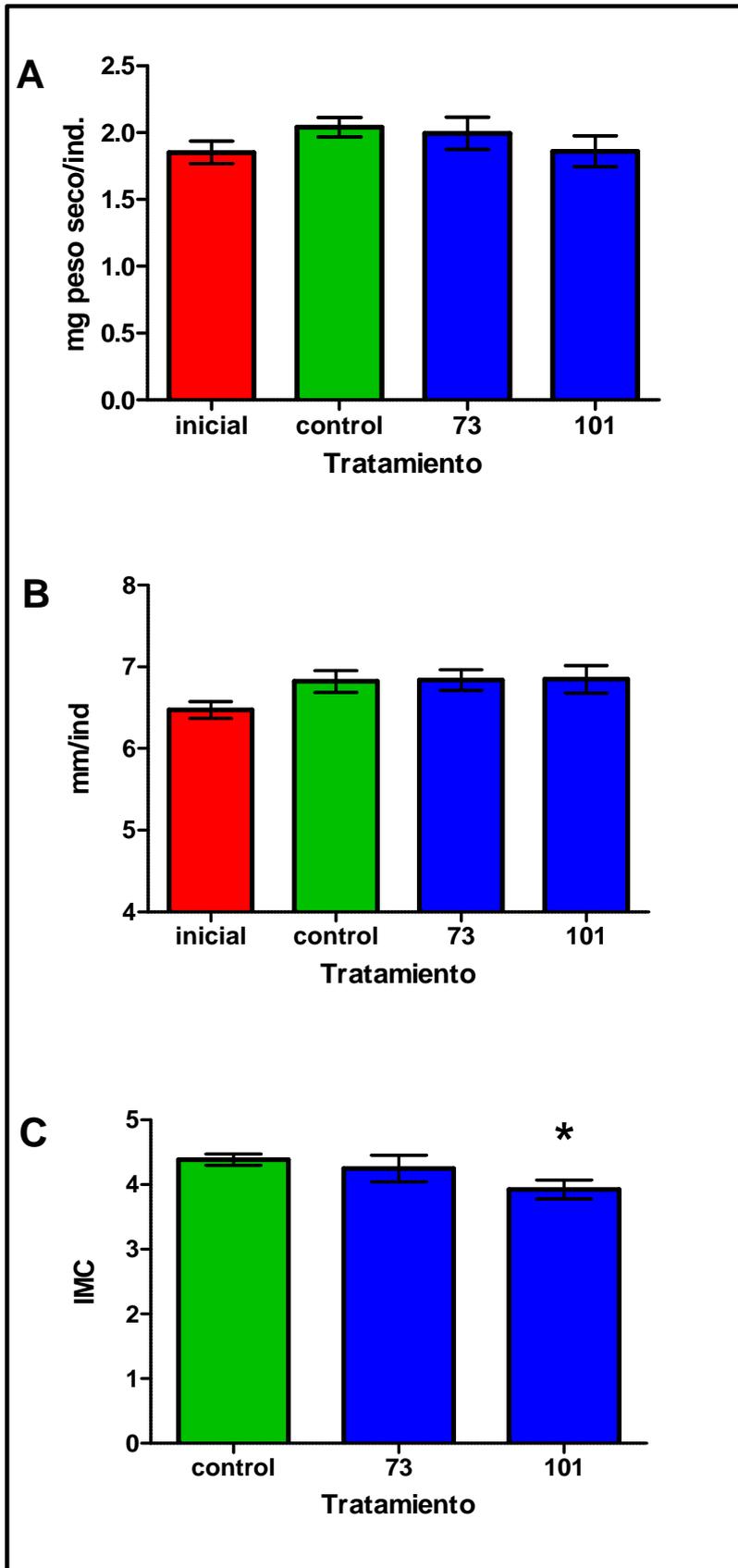


Fig. 5.10. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en MHW.

*: indica diferencias significativas con el grupo control.

Nivel de significancia $p < 0,05$.

El contenido de cobre en el tejido de machos mayores (Mm) expuestos por 10 días a Cu en MHW se muestra en la Tabla 5.11.

CP	Control	73 $\mu\text{gCu/L}$	101 $\mu\text{gCu/L}$
Mm	106 \pm 10 n=3	205 \pm 52 n=3	246 \pm 39 (*) n=3

Tabla 5.11: Contenido de Cu en tejido ($\mu\text{gCu/g PS}$) en machos mayores (Mm). Valores expresados como promedio \pm DE. CP: concentración efectiva promedio. Límite de detección 5 $\mu\text{gCu/L}$. (*): indica diferencias significativas en relación al control.

Los resultados de la carga corporal de cobre revelaron que el período de exposición fue lo suficientemente largo para acumular cobre en el tejido de los animales en concentraciones detectables. La incorporación de cobre en tejido incrementó con la concentración de exposición, siendo significativamente más elevada en el tratamiento de mayor concentración en relación al grupo control.

En la siguiente figura (5.11) se observa el incremento de la carga de Cu en tejidos como porcentaje del control.

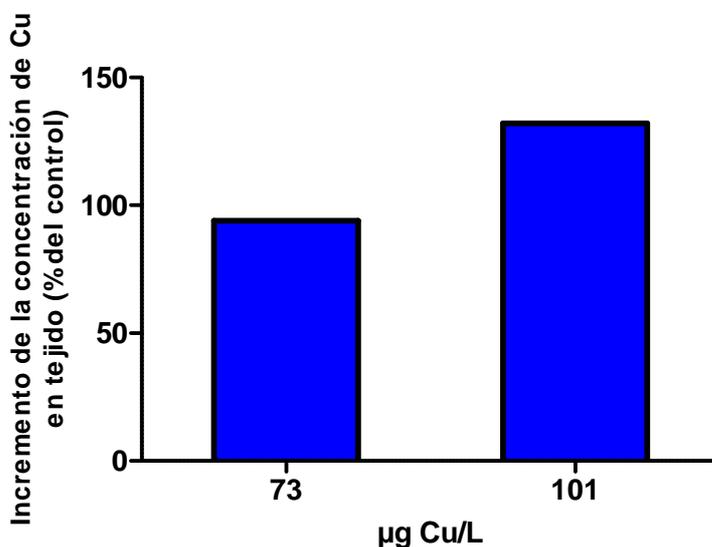


Figura 5.11: Acumulación porcentual de Cu en tejidos en machos de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a Cu en MHW.

Dicho incremento fue de un 94% y un 132% para 73 y 101 $\mu\text{gCu/L}$, respectivamente.

5.4.2 Ensayos con *Hyaella pseudoazteca*

5.4.2.1 Determinación de las concentraciones letales de Cu en Juveniles (Ensayo J-1)

Las concentraciones efectivas determinadas a tiempo final de ensayo y las concentraciones de metal en tejido se muestran en la Tabla 5.12. Debido a que no fue posible determinar las concentraciones efectivas a tiempo inicial los resultados del ensayo corresponden a valores nominales.

Concentración Nominal	Tiempo	pH	OD (mg/L)	Dureza (mgCaCO ₃ /L)	CE (µg/L)	Concentración en tejido
0 µgCu/L	Inicial	7,5	7,6	90	-----	-----
	Final	7,7±0,0	7,5±0,1	90	<0,02	170
50 µgCu/L	Inicial	7,7	7,8	90	-----	-----
	Final	7,8±0,0	7,4±0,1	100	50	350
100 µgCu/L	Inicial	7,7	7,8	90	-----	-----
	Final	7,8±0,0	7,4±0,1	100	120	440
200 µgCu/L	Inicial	7,7	7,5	90	-----	-----
	Final	7,9±0,0	7,3±0,1	90	170	520
400 µgCu/L	Inicial	7,8	7,8	90	-----	-----
	Final	7,8±0,1	7,2±0,1	90	340	750
600 µgCu/L	Inicial	7,6	7,7	90	-----	-----
	Final	7,8±0,0	7,1±0,1	90	500	-----
800 µgCu/L	Inicial	7,8	7,6	90	-----	-----
	Final	7,8±0,0	7,1±0,1	100	750	-----

Tabla 5.12: Ensayo realizado con juveniles de *H. pseudoazteca* en MHW. Parámetros fisicoquímicos (n=1-3), valores expresados como media ± DS. Concentraciones de cobre efectivas (CE; n=1) determinadas a tiempo final de ensayo y concentración de Cu en tejido para individuos sobrevivientes (µgCu/g peso seco).

En la Tabla 5.13 se observan los valores de las concentraciones letales de cobre (CL10 y CL50 en µgCu/L) a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición en agua moderadamente dura (MHW) para juveniles de *H. pseudoazteca*. Los valores de CL10 y CL50 para las 24 h no pudieron ser estimados.

Horas	CL10	LCI-LCS	CL50	LCI-LCS	Pendiente	Ordenada al origen	Chi ²
24	<50	-----	>400	-----			
48	104	67-138	311	254-379	2,69	-1,71	0,9
72	69	39-98	210	163-261	2,64	-1,13	3,8
96	58	34-82	174	134-216	2,69	-1,03	1,5

Tabla 5.13: Concentraciones letales (CL10 y CL50) en $\mu\text{gCu/L}$ a diferentes tiempos de exposición en agua moderadamente dura (MHW) para juveniles de *H. pseudoazteca*. LCI, LCS: límites de confianza inferior y superior (N total=210).

Como fue descripto en la Sección Materiales y Métodos del presente capítulo, se realizaron varios experimentos en MHW, utilizando a *H. pseudoazteca* de diferentes estadios.

En la Tabla 5.14 y Fig 5.12 se observan los porcentajes de sobrevivencia a los 4 y 10 días de exposición, para el grupo control de cada ensayo realizado.

Ensayo	Estadio	N° organismos	N° Tratamientos	Intervalo ($\mu\text{g/L}$)	SC (%) 4 días	SC (%) 10 días
J2	Juveniles	180	6	0-150	90 \pm 10	67 \pm 14
J3	Juveniles	150	3	0-100	98 \pm 4	88 \pm 8
M1	Machos	150	3	0-100	96 \pm 9	84 \pm 13
M2	Machos	360	3	0-100	80 \pm 14	53 \pm 11
M3	Machos	240	3	0-100	95 \pm 5	65 \pm 19
M4	Machos	150	3	0-100	80 \pm 14	59 \pm 20

Tabla 5.14: Experiencias realizadas con *H. pseudoazteca* expuestas a cobre en MHW. Se detalla edad utilizada, el **N° total de organismos** empleados en el ensayo, el **N° de Tratamientos**, el **Intervalo de concentraciones** ensayadas y el porcentaje de sobrevivencia del grupo control (SC) a los 4 y 10 días de exposición.

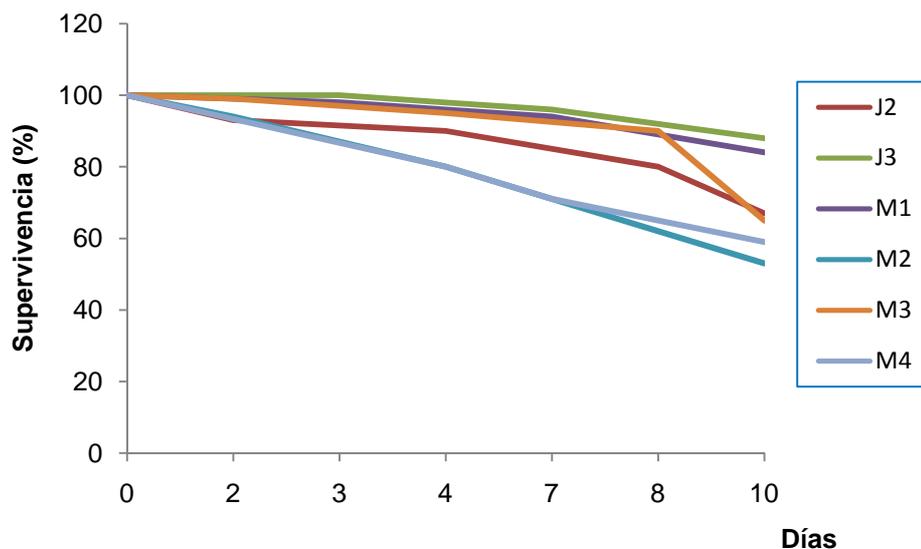


Figura 5.12: Supervivencia (%) en función del tiempo de los grupos controles para los diferentes ensayos realizados de exposición a Cu en solución con *H. pseudoazteca*.

A los cuatro días de exposición, los controles correspondientes al 100% de los ensayos con juveniles y al 50% de los ensayos con machos, superaron el porcentaje de supervivencia requerido (90%) para la validez del bioensayo. En contraposición, luego de 10 días de exposición en ningún caso la supervivencia alcanzó el 90%.

5.5 Discusión

Ensayos con H. curvispina

Parámetros fisicoquímicos

En general, los parámetros de calidad del agua se mantuvieron constantes a lo largo de los experimentos. Los valores promedio de pH registrados presentaron como máximo una variación de 0,8 entre tiempo inicial y final de ensayo. El OD en algunos casos disminuyó durante la exposición estando siempre por encima de los niveles mínimos recomendados. Sólo en algunos experimentos se observó un escaso incremento en la concentración de la dureza y la conductividad. En general, para todos los ensayos realizados estos parámetros no presentaron variaciones entre tratamientos. En relación al nitrógeno amoniacal, el valor máximo determinado en los

experimentos con juveniles a tiempo final de ensayo fue de 1,5 mg/L, en tanto que con adultos los niveles llegaron a 3,3 mg/L. Esto probablemente se encuentre asociado a la mayor excreción de amonio por parte de los adultos en relación a los anfípodos de menor tamaño. Los valores de N-NH_4^+ determinados se encontraron dentro del rango aceptable para la supervivencia de *H. curvispina* (ítem 4.4 del capítulo 4 y Anexo II).

Estadio de los animales utilizados

En la bibliografía existe escasa información sobre las etapas de crecimiento y desarrollo de *H. curvispina*, García (2009), en un seguimiento de crías obtenidas de hembras ovígeras colectadas en campo provenientes de dos cohortes (primavera y verano), propuso tres estadios de desarrollo identificables por la longitud corporal, neonatos o crías (de 0,88 a 2,3 mm; entre 0 y 21 días), juveniles (de 3,2 a 5 mm; entre 35 y 70 días) y adultos (de 5,1 a 10mm). A su vez, también describió que si bien entre los 3 mm y los 5 mm en la mayoría de los casos aún no se evidenciaba dimorfismo sexual, existen individuos menores a 5 mm identificables como “adultos”. Peluso (2011) indicó intervalos de tamaño mayores que los reportados por García (2009) para el estadio de desarrollo correspondiente a juveniles, encontrando en organismos de hasta 35 días de edad un tamaño promedio de 4,97 mm, coincidiendo con el estado “adulto o núbile” propuesto por Lopretto (1983) para la especie *H. pampena*. Doyle (2007) consideró para individuos de *H. curvispina* provenientes de cultivo de laboratorio otros rangos de tamaño para definir edades (juveniles: entre 1,69 y 4,04 mm; adultos: entre 3,37 y 8,61 mm).

En el presente trabajo, los rangos de longitudes corporales asociadas a los diferentes estadios (juveniles y adultos) se encontraron en general en concordancia con los reportados por Doyle (2007), lo cual puede observarse en las longitudes promedio de los grupos iniciales de los diferentes experimentos detallados en la sección Resultados del presente capítulo. Cabe destacar que en ambos trabajos los anfípodos provinieron de cultivos de laboratorio y la longitud corporal de los mismos fue determinada con los animales en posición estirada. Además, no debe desestimarse que la población de origen de los cultivos de laboratorio utilizados por Doyle (2007) y los nuestros fue la del arroyo las Flores, contribuyendo ello indudablemente a disminuir la variabilidad de intervalo de talla entre edades. Se pone en evidencia la necesidad de establecer rangos de talla por edad para cada población de origen de anfípodos a utilizar.

Ensayos con cadmio

Sobrevivencia y crecimiento

Con el fin de establecer niveles guía para cadmio asociados a la protección de la vida acuática, se determinó la sensibilidad de 21 géneros de organismos acuáticos en exposiciones crónicas y el género *Hyaella* se encontró entre los cuatro más sensibles (Mebane, 2006). La toxicidad del cadmio depende de la concentración del ion libre, que varía de acuerdo a la composición del medio de exposición. En este sentido, una compleja variedad de procesos bióticos y abióticos afectan la especiación del cadmio y su distribución medioambiental, incluyendo la adsorción y la desorción de las superficies minerales, incorporación en precipitados y coprecipitados, liberación a través de la disolución de minerales e interacción con plantas y microorganismos. Algunos de estos procesos pueden efectivamente aislar metales pesados del medio, mientras que otros pueden liberarlos transformados en diferentes especies que pueden ser más o menos biodisponibles, afectando la toxicidad sobre los organismos (Sorensen *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1999; Onyatta & Huang, 1999). Consecuentemente, el medio de dilución, las condiciones de ensayo (ej. dureza del agua, pH, temperatura, alimentación) y también, las especies, etapa del ciclo de vida de los organismos, estado de salud, etc, resultan en una gran variabilidad del efecto tóxico del cadmio.

Para invertebrados de agua dulce, si la CL50 es considerada como punto final, la especie más sensible fue *Hyaella curvispina* en el estadio de neonato, (CL50 96 h de 0,00171 mg/L), mientras que la más resistente fue *Artemia salina* (CL50 96h of 160 mg/L) (Achiorno *et al.*, 2010). La amplia variabilidad en los valores e CL50 reportados en la literatura, está relacionada no solo a la variabilidad interespecífica, sino también a las diferencias en las condiciones de ensayo, no siempre debidamente reportadas. Este contexto de variabilidad e incertidumbre, hacen las comparaciones más difíciles. En la Tabla 5.15 se resume información relevante de toxicidad por cadmio en anfípodos.

Especie	Estadio	CL50	Dureza (mgCaCO ₃ /L)	Referencia
<i>H. azteca</i>	Juveniles grandes y adultos menores	CL50-96h 8 µgCd /L	34	Nebeker <i>et al.</i> (1986)
<i>H. azteca</i>	Juveniles grandes y adultos jóvenes	CL50-10d (dos ensayos) <2,8 y 6 µgCd /L	34	Nebeker <i>et al.</i> (1986)
<i>H. azteca</i>	Adultos	CL50-15d 5,6 µgCd/L	145	Shuhaimi-Othmann and Pascoe(2007)
<i>H. azteca</i>	Adultos	CL50-96h 13 µgCd/L	145	Milani <i>et al.</i> (2003)
<i>H. azteca</i>	Adultos	CL50-28d 5,66 µgCd/L	162,7	Stanley <i>et al.</i> (2005)
<i>H. azteca</i>	Neonatos (1 a 11 días)	CL50-7d 4,41 µgCd/L	124	Borgmann <i>et al.</i> (2005)
<i>H. azteca</i>	Neonatos (1 a 11 días)	CL50-7d 0,57 µgCd/L	18	Borgmann <i>et al.</i> (2005)
<i>H. curvispina</i>	Neonatos	CL50-96h 1,71 µgCd/L	80 - 100	García <i>et al.</i> (2010)
<i>H. curvispina</i>	Juveniles	CL50-10d 14,52 µgCd/L	80 - 100	García <i>et al.</i> (2010)
<i>H. curvispina</i>	Adultos (machos 5 a 10m)	CL50-10d 6,41 µgCd/L	80 - 100	García <i>et al.</i> (2010)

Tabla 5.15: Información de CL50 de cadmio reportada para anfípodos.

En el ensayo Cd-1 la mortalidad registrada en individuos juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días fue del 45% a una concentración efectiva promedio (CP) de 11,25 µgCd/L. Considerando la mortalidad registrada, dicha concentración sería cercana a una CL50 bajo estas condiciones de ensayo. Cabe destacar que la mortalidad informada se encuentra asociada a una concentración nominal de 20 µgCd/L. Por lo tanto, es importante considerar que los cálculos deberían ser realizados a partir de concentraciones efectivas, dado que reflejan mejor las condiciones reales de exposición y son en general más conservativas al momento de reportar niveles de sensibilidad de las especies en estudio. Los valores de mortalidad determinados en este trabajo se encuentran en el orden de los reportados por García *et al.* (2010) (CL50 (10 días)= 14,52 µgCd/L; concentración nominal) para juveniles de la misma especie en ensayos realizados en condiciones estáticas (Tabla 5.15). García (2009) en su Tesis Doctoral mencionó que probablemente la CL50 resultaría menor aún que la

reportada, considerando que en su trabajo ha sido informada en base a concentraciones nominales. En relación a los machos adultos García *et al.* (2010) informaron una CL50 (10 días)= 6,41 $\mu\text{gCd/L}$ (concentración nominal), siendo este valor considerablemente menor que el porcentaje de mortalidad determinado para el mismo estadio (y rango de longitud) de *H. curvispina* en el presente trabajo (Ensayo Cd-3; 33% de mortalidad a una concentración efectiva de 13,5 $\mu\text{gCd/L}$). Sin embargo, debe tenerse en consideración que los anfípodos utilizados por estos autores provienen de recolecciones realizadas en el campo, mientras que los empleados en este estudio son originarios de cultivo de laboratorio (*indoor*). A sido informado en diversos trabajos que la sensibilidad de los organismos se ve afectada por el origen diferencial de los animales empleados en los bioensayos (Kater *et al.*, 2000; Menchaca *et al.*, 2010).

Sobre una base de datos de toxicidad comparativa de distintas sustancias químicas a diferentes etapas del ciclo de vida de invertebrados acuáticos, Hutchinson *et al.* (1998) mostraron el siguiente orden de sensibilidad: larvas>juveniles>adultos. Particularmente para el Cd, estos autores encontraron en general que los juveniles presentaron una mayor sensibilidad que las larvas o adultos. Los resultados del presente trabajo indicaron que a concentraciones de Cd comparables (11,25; 12,5 y 13,5 $\mu\text{gCd/L}$) la sobrevivencia de juveniles (55%) fue semejante a la de los machos menores (53%) y menor que la de los machos mayores (67%). En experimentos realizados por King *et al.* (2006) donde juveniles y adultos de distintas especies de anfípodos fueron expuestos a Cu y Zn en medio acuoso, los juveniles fueron más sensibles a ambos metales que los adultos, a pesar del corto periodo de exposición (96 h y 10 días).

Contrariamente, García *et al.* (2010) reportaron que los juveniles de *H. curvispina* fueron menos sensibles que los adultos. Collyard *et al.* (1994) en la evaluación de la toxicidad de cinco sustancias incluido el Cd, reportaron que los valores CL50 96 h variaron en un 50% o menos entre las diversas clases de edad en *Hyaella azteca*.

Si se analizan comparativamente los resultados obtenidos en el presente trabajo para los diferentes estadios del ciclo de vida, es importante notar que para juveniles (J; Ensayo Cd-1) y machos jóvenes (Mj; Ensayo Cd-2) fueron hallados efectos cuantificables sobre la supervivencia y el crecimiento (como longitud y biomasa) sólo a las concentraciones de Cd más altas ensayadas (11,25 y 13,5 $\mu\text{g/L}$, respectivamente). Por lo tanto, en fase acuosa bajo estas condiciones experimentales, supervivencia y

crecimiento fueron indicadores de toxicidad por Cd igualmente sensibles para estos estadios de *H. curvispina*.

A su vez, tanto para J como para Mj el Índice de Masa Corporal (IMC) mostró diferencias significativas entre el grupo expuesto a la mayor concentración de Cd y el resto de los tratamientos, en contraste a lo observado en general con la longitud y biomasa evaluadas por separado, donde con excepción del peso seco en Mj, estos parámetros no se diferenciaron significativamente entre la concentración intermedia de exposición y la más elevada (Figs. 5.3 A, B, C y 5.4 A, B y C). Por lo tanto en relación a los restantes parámetros de crecimiento determinados, el IMC permitió una mejor discriminación entre tratamientos.

Con respecto a los machos mayores (Mm; Ensayo Cd-3), si bien se observó mortalidad en la máxima concentración ensayada, esta no fue significativa en relación al control. Los parámetros de crecimiento evaluados, tampoco se vieron afectados por exposición al Cd.

Una posible interpretación de estos resultados estaría asociada a la menor vulnerabilidad de los individuos mayores con periodos de intermuda más largos. La ausencia de resultados pone un alerta sobre la resistencia por tamaño y no por edad.

Concentración en Cd en tejidos

Dentro de los parámetros evaluadores de efecto, varios autores han sugerido como preferible el uso de la concentración de los contaminantes en la biota, a la concentración de los mismos en agua o sedimento. Esto se fundamenta principalmente en que la concentración en tejidos frecuentemente puede predecir mejor los efectos biológicos debido a que los factores que afectan la biodisponibilidad de las sustancias químicas ya han sido tenidos en consideración (Borgmann & Norwood, 1997).

Los procesos de acumulación de metales en invertebrados dependen de una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos, pero la anatomía funcional de los órganos digestivos y el epitelio branquial, como también la fisiología de un organismo, juegan roles dominantes en el control de los procesos de acumulación (Dallinger, 1994).

La acumulación, regulación y toxicidad del cadmio ha sido abordada por varios autores. En invertebrados tales como *Eisenia fetida*, *Nereis virens*, *Gammarus zaddachi*, *G. salinus* y *H. azteca*, el Cd en fase acuosa mostró un rápido ingreso que incrementó con el tiempo y la concentración de exposición (Shuhaimi-Othman & Pascoe, 2007; Shuhaimi-Othman *et al.*, 2002). En ensayos de exposición crónica a

cadmio, *H. azteca* no mostró signos de efecto tóxico a concentraciones de Cd en tejidos de 23 µgCd/g PS o menores; concentraciones entre 28 y 62 µgCd/g PS estuvieron o no asociadas a letalidad dependiendo del medio de ensayo; mientras que concentraciones de 76 µgCd/g PS o superiores resultaron siempre tóxicas (Borgmann *et al.*, 1991). Adultos de *H. azteca* expuestos por 5 días a 5,8 µgCd/L (concentración correspondiente a CL50 15 días) en agua dura, mostraron una carga corporal de Cd cercana a 50 µgCd/g PS (Shuhaimi-Othmann & Pascoe, 2007). Para 28 días de exposición a 5 µgCd/L en agua dura Stanley *et al.* (2005) hallaron en *H. azteca* valores de carga corporal de Cd de 41,18 µgCd/g PS, siendo la concentración de exposición del orden de la CL50.

La acumulación de Cd registrada en juveniles de *H. curvispina* fue de dos a tres veces mayor que aquellas reportadas para *H. azteca* expuesta a concentraciones comparables (80 y 140 µgCd/g PS para 2,5 y 5,25 µgCd/L, respectivamente). A pesar de la elevada acumulación del metal en tejido hallada a estas concentraciones, la carga corporal de Cd promedio en *H. curvispina* (219 µgCd/g PS) asociada a una disminución de la supervivencia fue observada sólo a la máxima concentración de exposición (11,25 µgCd/L). Por lo tanto, en función de los resultados obtenidos, puede asumirse que en juveniles de *H. curvispina* valores de carga corporal de Cd > 200 µgCd/g PS están relacionados a una elevada mortalidad (Tabla 5.3, Fig. 5.3).

Para machos jóvenes y machos mayores, a concentraciones de exposición de Cd cercanas a 2 se registraron concentraciones de Cd en tejidos de 48 y 37 µgCd/g PS, respectivamente; mientras que para concentraciones próximas a 5 µgCd/L la acumulación de Cd fue de 90 y 60 µgCd/g PS. Comparativamente, el cadmio acumulado en tejidos de adultos de *H. curvispina* fue 1,2 a 1,5 veces mayor que los valores previamente reportados para adultos de *H. azteca* expuestos a concentraciones de Cd cercanas a 5 µgCd/L. Por lo tanto individuos adultos de *H. curvispina* presentaron una mayor tolerancia a concentrar Cd en tejido que la reportada para *H. azteca* del mismo estadio. A su vez, en machos jóvenes una carga corporal de Cd de 180 µgCd/g PS (concentración de exposición 13,5 µgCd/L) estuvo asociada a una mortalidad cercana al 50%; en tanto que para machos mayores expuestos a 12,5 µgCd/L la acumulación de Cd fue de 114 µgCd/g PS, en la que si bien se registró mortalidad (33%), esta no fue significativamente mayor en relación al control.

La carga corporal de Cd registrada en juveniles, machos jóvenes y machos mayores de *H. curvispina* aumentó marcadamente con la concentración de exposición y disminuyó con el incremento de la talla y edad (Tabla 5.6; Fig. 5.6). Esto es

consistente con lo reportado por Pastorino *et al.* (2009) para el anfípodo *Echinogammarus marinus*, quienes informaron que la etapa del ciclo de vida influyó significativamente en la absorción y acumulación de Cd y Zn. La carga corporal de ambos metales fue mayor en neonatos que en juveniles y estos a su vez acumularon más carga que los adultos. Resultados similares fueron obtenidos para el anfípodo *Gammarus locusta* (Correia *et al.*, 2004) donde los juveniles acumularon niveles más altos de zinc que los adultos.

Este es el primer reporte de carga corporal de Cd en *H. curvispina* y puede inferirse del presente estudio que esta especie posee capacidad de concentrar elevadas cantidades de Cd en sus tejidos.

Ensayos con cobre

Concentración Letal 50

En la Tabla 5.8 se observan los resultados de las CL50 calculadas a los diferentes tiempos para juveniles de *H. curvispina*. La CL50 (96 h) fue de 301 µgCu/L (valor efectivo), en tanto que el valor de CL50 (10 días) fue de 200 µgCu/L (valor efectivo) (Ensayo Cu-1). García (2009) y Peluso (2011) informaron para juveniles de la misma especie valores de CL50 (96 h) de 194 µgCu/L y 116 µgCu/L, respetivamente. A su vez García reportó una CL50 (10 días) de 155 µgCu/L, encontrándose en el orden de la obtenida en el presente estudio.

Como se mencionó previamente, variaciones en las condiciones de exposición en los bioensayos generan un amplio intervalo de valores de CL50 para las mismas especies o especies relacionadas. Los valores de CL50 96 h determinados estuvieron dentro del mismo orden de magnitud, sin embargo el valor aquí obtenido luego de 96 h de exposición, fue más elevado. Considerando que en los tres casos se utilizó el mismo medio de dilución (MHW), la diferencia podría ser explicada por el origen diferencial de los individuos de *H. curvispina* utilizados, dado que fueron obtenidos de cultivos diferentes, e incluso, en el caso de García (2009) los animales provienen de colectas realizadas en el campo. En este sentido, y al igual que en lo mencionado anteriormente para el cadmio, en la literatura se registra un amplio rango de CL50 en relación a las condiciones de ensayo. Borgmann *et al.* (2005) obtuvieron valores de CL50 (7 días) con individuos de 1-11 días de edad de 56 µgCu/L nominal (36 µgCu/L

efectiva) en agua blanda (18 mgCaCO₃/L), en tanto que con agua dura (124 mgCaCO₃/L), los valores obtenidos fueron 121 µgCu/L (nominal) y 90 µgCu/L (efectiva). Milani *et al.* (2003) reportaron para la misma especie una CL50 (96 h) de 210 µgCu/L en un bioensayo realizado con agua dura (120-140 mgCaCO₃/L). En tanto que Shuhaimi-Othmann & Pascoe (2007) informaron una CL50 (15 días) de 182 µgCu/L para adultos de *H. azteca* en agua dura (145 mgCaCO₃/L).

Sobrevivencia y Crecimiento

En relación a los ensayos de crecimiento las concentraciones experimentales resultaron de carácter subletal tanto para juveniles como para machos mayores (Ensayos Cu-2 y Cu-3). Esto es esperable particularmente en el ensayo Cu-2, dado que las concentraciones de exposición fueron seleccionadas a partir de la CL50 de juveniles en el ensayo Cu-1.

A diferencia de los resultados obtenidos con el cadmio, sobrevivencia y crecimiento no fueron parámetros indicadores de toxicidad similares.

En el ensayo con individuos juveniles, fueron observados efectos sobre la biomasa en las dos concentraciones más elevadas (74,5 y 107 µgCu/L), a su vez, dicho efecto fue concentración dependiente (Fig. 5.9 A). Estos resultados indican una importante inhibición sobre el crecimiento. La disminución en la biomasa puede deberse a diversos factores, tal como disminución en la alimentación, incremento en la producción de heces o detención del proceso de muda (Borgmann & Norwood, 1997). En este bioensayo la longitud no se vio afectada por la presencia del Cu. El IMC indicó un claro efecto sobre los animales expuestos a las mayores concentraciones del metal.

En el caso del experimento con machos mayores, al igual que en el ensayo con Cd, no se registraron efectos sobre la longitud y la biomasa de los anfípodos tratados con Cu en relación al grupo control. Sin embargo, el IMC como parámetro integrador del estado general de los animales indicó diferencias significativas entre el grupo control y el expuesto a 101 µgCu/L, permitiendo nuevamente discriminar efectos que no llegan a ser registrados con los parámetros tradicionales (longitud y biomasa) evaluados por separado.

Si bien la longitud es uno de los puntos finales más comúnmente utilizado como parámetro tradicional de evaluación de efecto en ensayos de subletalidad, en los experimentos aquí presentados de exposición a Cu la biomasa, pero en particular el

IMC, fueron más sensibles que la longitud como indicadores de efecto subletal (Figs. 5.9 y 5.10; Tablas 5.9 y 5.10).

Contrariamente, Borgmann & Norwood (1997) en ensayos de exposición crónica a Cu con *H. azteca*, informaron que el indicador más sensible de efecto fue la supervivencia y que no observaron efectos sobre el crecimiento y la reproducción en concentraciones que no hayan causado también mortalidad significativa. Sin embargo, en experimentos de exposición crónica a metales con *Daphnia magna* se informó que frecuentemente la alteración en la reproducción fue un indicador más sensible de toxicidad que la mortalidad (Borgamann *et al.*, 1989).

Concentración de Cu en tejidos

A diferencia del cadmio que es un metal no esencial con concentraciones acumuladas esperadas que varían sólo en concordancia con las diferencias de biodisponibilidad (Marsden *et al.*, 2003) el cobre es un metal traza esencial con potencial para variar su concentración en tejidos debido a los diferentes requerimientos fisiológicos, a la etapa de desarrollo, género y estado reproductivo, así como la biodisponibilidad.

En *H. azteca*, luego de 10 semanas de exposición en agua adicionada con Cu, el metal fue completamente regulado (Borgmann & Norwood, 1997). La concentración en tejido más alta no tóxica fue 95 µg/g PS en animales expuestos a 18 µg/L nominal (16,7 µg/L efectiva), mientras que la concentración tóxica más baja fue de 88 µg/g PS en anfípodos expuestos a 32 µg/L nominal (25,4 µg/L efectiva). La cantidad de Cu acumulado en ninguno de los casos difirió significativamente de la carga corporal de Cu de los animales control (79 µg/g de PS). Sin embargo en exposiciones más cortas (una semana) con adultos, los animales expuestos a 5,6 µgCu/L nominal (4,28 µgCu/L efectiva) acumularon 122 µgCu/g PS y en una concentración de 180 µgCu/L nominal (124 µgCu/L efectiva) acumularon 288 µgCu/g PS. La carga corporal de Cu desde la menor concentración de exposición fue significativamente más elevada que en el control (98 µgCu/g PS). Por lo tanto, las diferencias observadas en la regulación de Cu parecen estar asociada para esta especie, al menos en parte, a la duración del tiempo de exposición. Sus resultados sugieren que la concentración de Cu en *H. azteca* expuesta bajo condiciones crónicas en laboratorio, no puede ser usada para inferir presencia o ausencia de toxicidad por este metal. Sin embargo, exposiciones por un período de tiempo corto resultaron en una elevada acumulación de Cu a concentraciones muy por debajo de aquellas que causan toxicidad crónica. Por lo tanto, este tipo de estudios a corto plazo, podrían ser utilizados potencialmente como

indicadores de toxicidad crónica de Cu. Sin embargo, la relación entre la acumulación del metal y la toxicidad no es sencilla, y puede estar relacionada a las vías de captación relativa y a las particularidades fisiológicas de las especies prueba (Borgmann, 2003; Simpson, 2005; Simpson & King, 2005). En individuos adultos de *H. azteca* expuestos por 5 días a 148 µgCu/L (concentración correspondiente a la CL50 15 días) en agua dura, se observó que la acumulación de Cu en tejidos incrementó con el tiempo de exposición. La carga corporal de Cu a tiempo final de ensayo fue cercana a 200 µgCu/g PS (Shuhaimi-Othmann & Pascoe, 2007).

Las concentraciones de Cu en tejidos en machos mayores de *H. curvispina* (205 y 246 µgCu/g PS para concentraciones efectivas de 73 y 101 µgCu/L, respectivamente) se encontraron en el orden de las reportadas para adultos de *H. azteca* en exposiciones de tiempo similares. Por lo tanto, a diferencia de los resultados obtenidos para Cd (donde *H. curvispina* tolera mayor carga del metal en tejido que *H. azteca*) individuos adultos de *H. curvispina* presentaron una tolerancia similar a concentrar Cu en tejido a la reportada para *H. azteca* del mismo estadio. Cabe destacar que un incremento de la carga corporal de Cu del 132% no afectó la sobrevivencia de los anfípodos, pero se encontró asociada a una disminución del IMC.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan el primer reporte de carga corporal de Cu en *H. curvispina*.

Ensayos con Hyalella pseudoazteca

El valor de la CL50 (96 h) determinado para *H. pseudoazteca* se halla dentro del rango reportado para *H. azteca* (Borgman y Norwood, 1997; Milani *et al.*, 2003) y *H. curvispina* (García *et al.* 2010; Peluso 2011). Sin embargo en el presente trabajo es inferior al reportado para esta última especie (CL50 96 h= 301 µgCu/L; valor efectivo), bajo exactamente las mismas condiciones experimentales. Por lo tanto, juveniles de *H. pseudoazteca* resultaron ser más sensibles que juveniles de *H. curvispina* en exposiciones a Cu en medio acuoso.

La Tabla 5.12 muestra los valores de Cu en tejido medidos en los sobrevivientes a 96 horas de exposición a concentraciones crecientes de Cu, entre 0 y 400 µg/L. Bajo nuestras condiciones experimentales, la incorporación de Cu mostró una tendencia a incrementarse con la concentración. Como se mencionó previamente, el mismo efecto fue observado en machos mayores de *H. curvispina* expuestos 10 días a Cu en medio acuoso.

En relación al resto de los experimentos realizados con *H. pseudoazteca* (todos de 10 días de duración), tanto juveniles como machos no cumplieron con las condiciones mínimas para su validación (Tabla 5.14). Si bien luego de 96 h de exposición la sobrevivencia de los animales control en el estadio juvenil superó el 90%, luego de 10 días, en ningún caso (ni juveniles ni machos) la sobrevivencia alcanzó el porcentaje requerido para la validez del bioensayo.

Por lo tanto bajo estas condiciones experimentales, solo el estadio juvenil de *H. pseudoazteca* resultaría confiable para su uso en bioensayos de toxicidad en experimentos de corta duración (96 h), donde los objetivos estén orientados a evaluar efectos agudos de diferentes tóxicos sobre estos organismos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta el sesgo que podría existir sobre los resultados debido a la marcada sensibilidad de *H. pseudoazteca* en exposiciones en matriz acuosa, incremento el nivel de incertidumbre. Por otro lado, si el objetivo es obtener indicadores más sensibles y representativos mediante estudios subcrónicos, esta especie no es recomendable, debido a que es de fundamental importancia contar con un control que garantice la confiabilidad de los resultados.

5.6 Conclusiones

- ✓ Supervivencia y crecimiento fueron indicadores similarmente sensibles de toxicidad por Cd para juveniles y machos menores en *H. curvispina*.
- ✓ A diferencia de los resultados obtenidos con cadmio, para el Cu, los parámetros de crecimiento fueron indicadores de toxicidad más sensibles que la sobrevivencia en juveniles y machos mayores de *H. curvispina*.
- ✓ En general, tanto en la evaluación de sobrevivencia como crecimiento, los juveniles de *H. curvispina* resultaron más sensibles a ambos metales que los machos.
- ✓ El IMC permitió una mejor discriminación entre tratamientos en relación a los restantes parámetros de crecimiento determinados.
- ✓ *H. curvispina* mostró una significativa capacidad de acumular Cd y Cu en tejidos. En particular para el Cd, los juveniles incorporaron una mayor

concentración del metal que los adultos. Debería considerarse el potencial de biomagnificación a través de la cadena alimentaria a los niveles tróficos superiores, lo que representaría un potencial riesgo ecotoxicológico.

- ✓ Bajo las condiciones experimentales *H. curvispina* probó ser sensible a concentraciones de Cd y Cu ecológicamente relevantes. Los resultados reafirman su importancia como una especie adecuada para ensayos de evaluación ecotoxicológica en cuerpos de agua dentro de su área de distribución.

- ✓ *H. pseudoazteca* no es recomendada para ensayos en matriz acuosa.

- ✓ Juveniles de *H. pseudoazteca* luego de 96 h de exposición mostraron una significativa capacidad de acumular Cu en tejidos y resultaron más sensibles que juveniles de *H. curvispina* en exposiciones a Cu en medio acuoso.

CAPITULO 6

TOXICIDAD DE COBRE Y CADMIO EN SEDIMENTO: EFECTOS SOBRE LA SOBREVIVENCIA, EL CRECIMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE METALES EN TEJIDO

6.1 Introducción

La información sobre la sensibilidad de organismos bentónicos a los contaminantes en sedimentos, es obtenida a partir de pruebas de toxicidad con sedimentos contaminados natural y artificialmente. Mientras que los ensayos de exposición en matriz acuosa evalúan la tolerancia de los organismos a contaminantes disueltos, los de toxicidad de sedimento completo exponen a los mismos a contaminantes ligados a las partículas de sedimento, al agua de poro y al agua sobrenadante (Ingersoll *et al.* 1997; Batley *et al.* 2002; ASTM, 2003). La acumulación y toxicidad de los metales del sedimento y del agua de poro asociada sobre los organismos, se encuentra influenciada por un número de parámetros físico-químicos (abióticos) y biológicos (bióticos). Por lo tanto, las pruebas de toxicidad son una manera conveniente y adecuada de reflejar la fracción biodisponible de un contaminante, que puede ser muy diferente de la cantidad total determinada por el análisis químico (Hill *et al.*, 1993).

En las últimas décadas, se han realizado importantes esfuerzos por parte de científicos y autoridades para determinar la ecotoxicidad de sedimentos. Así, se han desarrollado diversos ensayos con especies bentónicas, siendo los anfípodos usualmente elegidos como organismos prueba (ASTM, 1995; USEPA, 2000).

La mayoría de las numerosas Guías de Calidad de Sedimentos (SQGs) fueron desarrolladas para asistir a los entes reguladores basados en datos obtenidos en América del Norte (Burton, 2002). La aplicabilidad específica de los SQGs a una región geográfica particular es incierta, debido a las diferencias en la geografía (ej. temperatura, salinidad, formación geológica), en la sensibilidad y composición de especies y en la biodisponibilidad de poluentes. Esto refleja la necesidad de generar

una base de datos para especies nativas, por lo tanto, los estudios ecotoxicológicos son requeridos para verificar la aplicación de los SQGs bajo condiciones locales. En este sentido, este trabajo presenta los primeros resultados de efectos por exposición a sedimentos adicionados con Cd y Cu en especies de anfípodos de agua dulce del hemisferio sur.

En relación a los SQG, en términos generales hay dos niveles umbrales, uno debajo del cual raramente ocurren efectos [ej: nivel de efecto más bajo (LEL), nivel umbral de efecto (TEL), umbral de efecto mínimo (MET), rango bajo de efecto (ERL), con un valor nivel de consenso (TEC)], y un valor por encima del cual probablemente se produzcan efectos [ej: umbral de efecto tóxico (TET), nivel de efecto severo (SEL), nivel de efecto probable (PEL), rango medio de efecto (ERM), con un valor nivel de consenso (PEC)]. Para el Cd, el valor de TEC es 0,99 mgCd/Kg SS y el PEC es 4,98 mgCd/Kg SS; en tanto que para el Cu TEC es 31,6 mgCu/Kg SS y PEC 149 mgCu/Kg SS (MacDonald *et al.*, 2000; Burton, 2002). A su vez en muestras ambientales, las concentraciones de Cd y Cu en cuerpos de agua poluidos de áreas periurbanas de Argentina, llegan a valores en sedimentos de 3,2 mgCd/Kg SS y 136,2 mgCu/Kg SS, respectivamente (Ronco *et al.*, 2008).

El presente trabajo pretende aportar datos sobre la sensibilidad de diferentes estadios de *H. curvispina* y *H. pseudoazteca* a cadmio y cobre (tóxicos referentes) en concentraciones cercanas a los Niveles Guía de Calidad de Sedimento establecidos para América de Norte y esperadas en cuerpos de agua poluidos de la Provincia de Buenos Aires.

6.2 Objetivos

- Evaluar supervivencia, crecimiento (como longitud y bioamasa) y carga corporal de Cd y Cu en dos estadios de *Hyaella curvispina* expuestos a sedimentos adicionados y agua de poro proveniente del mismo (sólo para Cu), bajo condiciones experimentales fijadas.
- Evaluar la sensibilidad a Cu en dos estadios de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimentos adicionados (procesados y completos), utilizando como parámetros evaluadores de efecto supervivencia, crecimiento y concentración de Cu en

tejidos. Se pretende evaluar la utilidad de la especie como organismo prueba en bioensayos de toxicidad con matriz sólida.

- Investigar la utilidad del Índice de Masa Corporal (IMC) como nuevo parámetro evaluador de efecto en estas condiciones experimentales.

6.3 Materiales y Métodos

En el presente capítulo se detallan los estudios realizados con *H. curvispina* y *H. pseudoazteca* utilizando como matriz de ensayo sedimento (procesado y completo) y agua de poro.

6.3.1. Ensayos con sedimento procesado

El sedimento fue recolectado del arroyo Las Flores. En las figuras 6.1 y 6.2 se muestran como diagramas de flujo de manera sucinta, los protocolos seguidos para la toma de muestras, procesamiento del sedimento y procedimiento experimental (descripción detallada en ítem 3.5.2, capítulo 3).

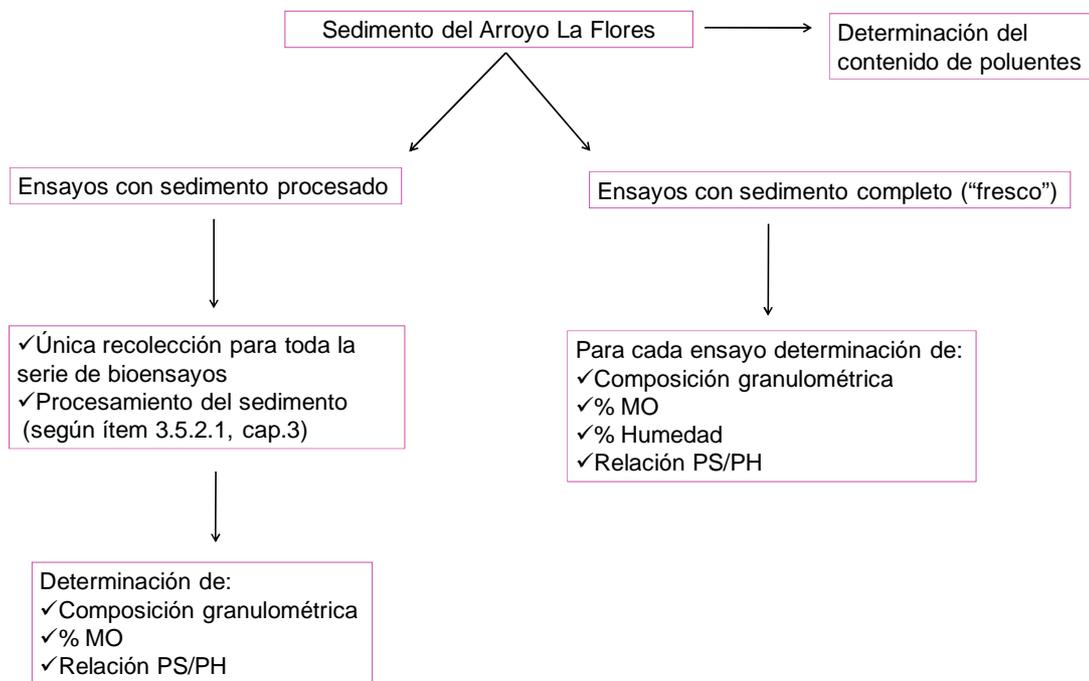


Figura 6.1: Toma de muestras y procesamiento del sedimento control.

Los ensayos fueron estáticos de 10 días de exposición, con sedimentos adicionados (SPK) con Cd o Cu y con agua de poro (AP).

Los individuos de *H. curvispina* y *H. pseudoazteca* utilizados en los ensayos fueron seleccionados por tamizado a partir de cultivos de laboratorio (*indoor*). El proceso de aclimatación de los mismos y el detalle de las condiciones experimentales se encuentran indicados en los ítems 3.1.2 y 3.3 del capítulo 3.

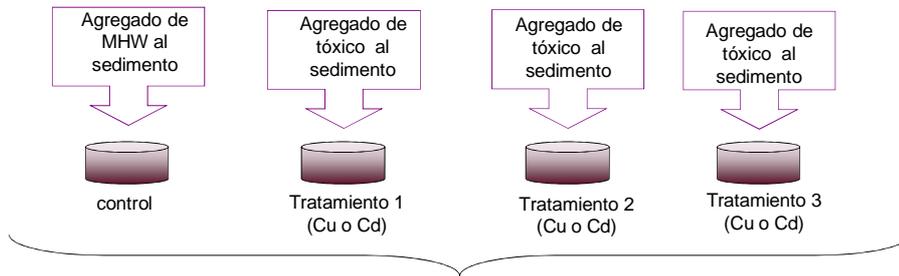
En la Tabla 6.1 se indican los detalles de los experimentos realizados con ambas especies.

Ensayo	Especie	Matriz	Estadio	N° Organismos	N° Tratamientos	Réplicas/ Tratamiento	Intervalo (mg/Kg)	Puntos finales
Cd-1	H. c	SPK	Juveniles	200	4	5	0-8	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación en tejido
Cd-2	H.c	SPK	Machos mayores	150	3	5	0-8	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación en tejido
Cu-1	H.c	SPK	Juveniles	160	4	4	0-200	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación en tejido
		AP		80	3	2-3	0-AP	
Cu-2	H.c	SPK	Machos mayores	160	4	4	0-200	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación en tejido
		AP		60	2	3	0-AP	
Cu-3	H.p	SPK	Juveniles	150	3	5	0-200	Sobrevivencia Crecimiento IMC
Cu-4	H.p	SPK	Machos	150	3	5	0-200	Sobrevivencia Crecimiento IMC Acumulación en tejido

Tabla 6.1: Experimentos realizados con *H. curvispina* (H.c) y *H. pseudoazteca* (H.p) expuestas a cadmio (Cd) o cobre (Cu). Se detalla la **Especie** y el **Estadio** utilizado, la **Matriz** de ensayo, el **N°** total de **Organismos** empleados, el **N° de Tratamientos**, el número de **Réplicas por Tratamiento**, el **Intervalo** ensayado y los **Puntos finales** evaluados. SPK: sedimento adicionado; AP: agua de poro.

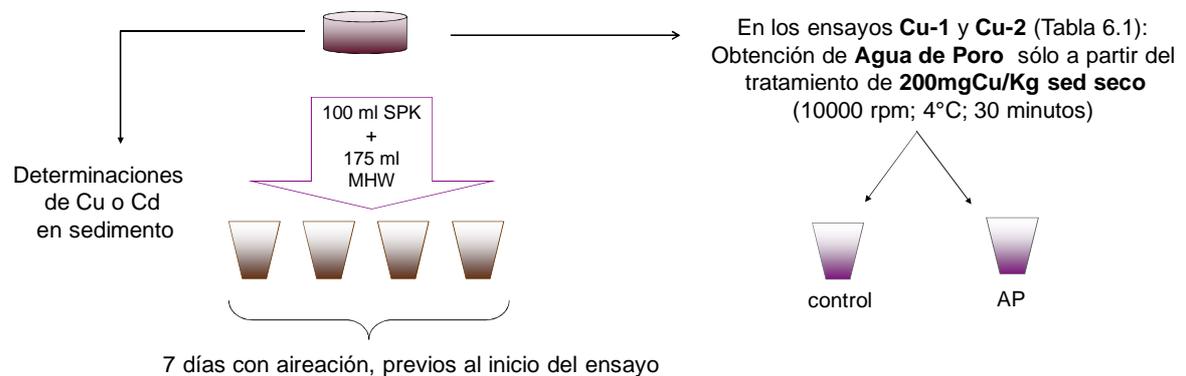
Preparación del sedimento adicionado en recipientes de plástico de 4L (ó 10L para ensayos en los que se extrajo agua de poro)

Relación vol. agua dilución (MHW) : vol. sedimento rehidratado ~ 2 : 1,5



Homogeneización manual cada 4 días, durante 14 días; Conservación a 5°C

Fraccionamiento del sedimento de cada recipiente en 4-5 réplicas



Para ambos ensayos (Sedimento Adicionado y Agua de Poro):

Separación de individuos provenientes de cultivo *indoor*
Aclimatación durante 7 días a condiciones de ensayo

- Día 0:**
 - ✓ Agregado de 10 animales a cada réplica
 - ✓ Toma de muestras de agua sobrenadante para determinación del metal correspondiente
 - ✓ Determinaciones fisicoquímicas en agua sobrenadante
 - ✓ Extracción de submuestras de animales para la caracterización de longitud y biomasa del grupo inicial

- Día 10:**
 - ✓ Recuento de sobrevivientes, colocación en EDTA 50µM por 24h
 - ✓ Fijación por congelamiento a -20°C
 - ✓ Toma de muestras de agua sobrenadante y sedimento para la determinación del metal correspondiente
 - ✓ Caracterización fisicoquímica del agua sobrenadante

- Sobre los animales sobrevivientes se realizó:
 - ✓ Medición de longitud
 - ✓ Determinación de peso seco por individuo
 - ✓ Digestión de *pool* de individuos por tratamiento para determinación de acumulación de metal en tejido

Figura 6.2: Procedimiento experimental para ensayos con sedimento procesado y agua de poro.

6.3.2 Ensayos con sedimento completo adicionado

Se llevaron a cabo dos ensayos de 10 días de duración con juveniles de *H. pseudoazteca*, expuestos a sedimentos adicionados con Cu. En la Tabla 6.2 se detallan los experimentos realizados.

Ensayo	Estadio	N° organismos	N° Tratamientos	Réplicas/ Tratamiento	Intervalo (ppb)	Puntos finales
J1	Juveniles	200	4	5	0-100	Sobrevivencia Crecimiento IMC
J2	Juveniles	150	3	5	0-75	Sobrevivencia Crecimiento IMC

Tabla 6.2: Experimentos realizados con *H. pseudoazteca* expuestas a cobre utilizando como matriz de ensayo sedimento completo. Se detalla el **Estadio** de la especie utilizada, el **N° total de organismos** empleados, el **N° de Tratamientos**, el número de **Réplicas por Tratamiento**, el **Intervalo** ensayado y los **Puntos finales**.

Los anfípodos utilizados fueron colectados del arroyo Las Flores. Los ejemplares de *H. pseudoazteca* se mantuvieron en recipientes de plástico con agua potable, junto con algunas macrófitas del lugar. Se agregó alimento triturado para peces cada 3 días, semanalmente se renovó el 50% del volumen de agua y se removió el alimento residual.

El cultivo se mantuvo en laboratorio (durante 15 días) con temperatura y fotoperíodo constantes ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ y 16L/8O) en agua no clorada de dureza moderada (80-90 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$). Diez días antes del inicio de cada ensayo se seleccionó un *pool* de individuos juveniles que fue llevado a la cámara experimental (con igual régimen de temperatura y fotoperíodo) en agua MHW.

En la Figura 6.3 se muestra como diagrama de flujo de manera sucinta, el protocolo experimental seguido.

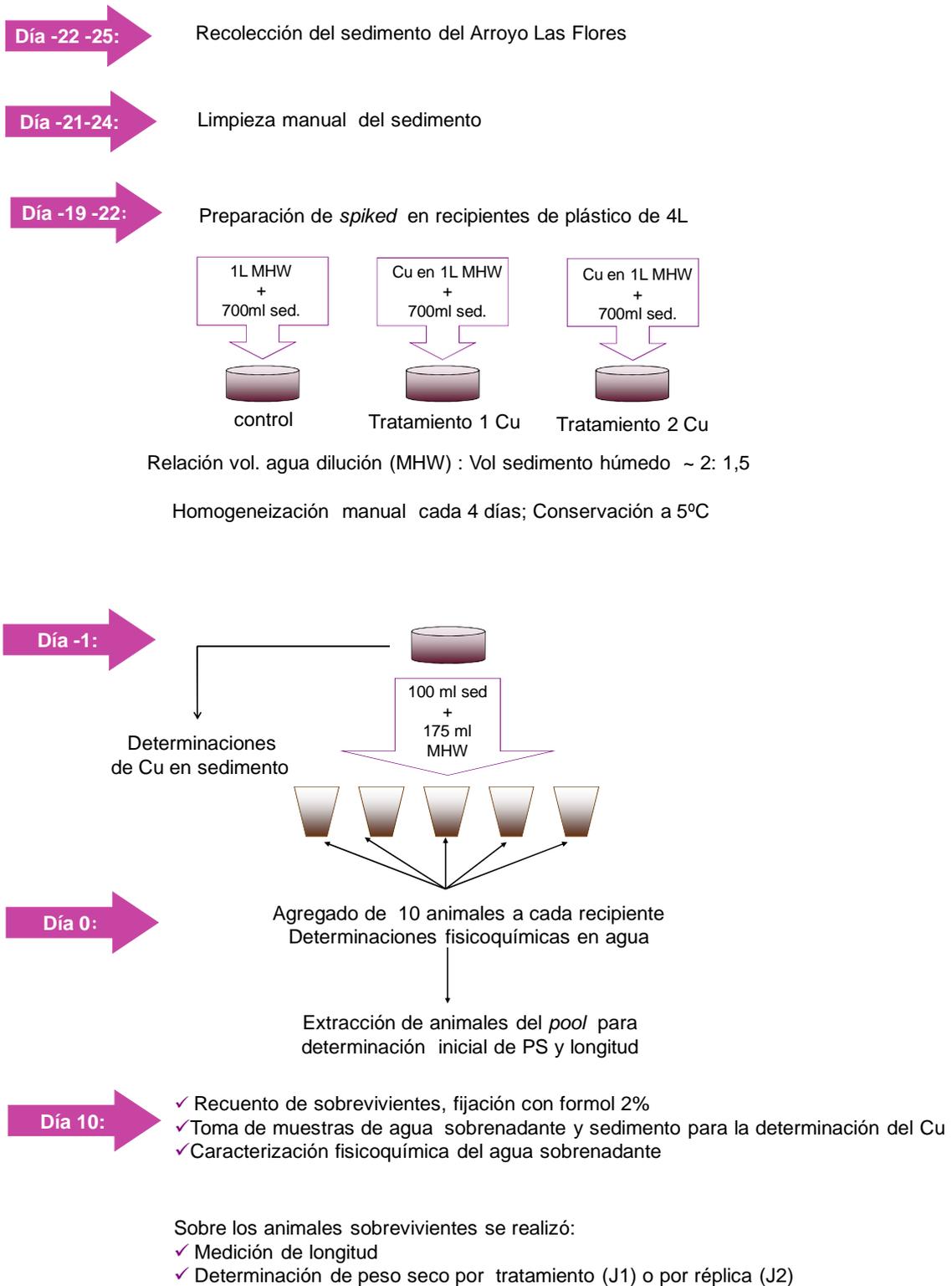


Figura 6.3: Procedimiento experimental para ensayos con sedimento completo.

Para la totalidad de los ensayos, tanto las determinaciones de metales en agua sobrenadante, sedimento y agua de poro, como los parámetros de calidad de agua,

fueron registrados como se indica en el ítem 3.6 del capítulo 3. Las determinaciones de Cu o Cd en tejidos fueron realizadas como se indica en el ítem 3.4.1 del mismo capítulo.

6.3.3 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue evaluada mediante el *test* de Shapiro Wilks, la homogeneidad de varianza por el *test* de Levene. La significatividad de las diferencias entre tratamientos se analizó por ANOVA de un factor con comparaciones de Tukey, o mediante la prueba de Kruskal Wallis cuando no se cumplieron los supuestos para análisis paramétricos (Zar, 2010). Se usó el paquete estadístico Infostat. El nivel de significatividad fue del 95%.

6.4 Resultados

El contenido de metales pesados en el sedimento del arroyo Las Flores fue no detectable o se encontró por debajo de los Niveles Guía de Calidad de Sedimentos (SQG). No se registró presencia de sulfitos, cianuros ni hidrocarburos. Las determinaciones de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretroides alcanzaron valores menores a los límites de detección (2 µg/Kg) (Tabla 6.3).

mg/Kg SS	Arroyo Las Flores
As	< 2
Cd	0,5
Cr	15,5
Cu	4
Hg	< 0,1
Ni	2,3
Pb	3
Zn	< 2
Fe	26559
Mn	609
Na	883,7
K	2911
Ca	8501
Mg	2720
Nitratos	6,0
Cloruros	46,5
Sulfatos	169
Sulfuros	< 2,0
Cianuros	< 1,0
Fosforo total	482,5
Hidrocarburos	< 200

Tabla 6.3: Datos de análisis químicos en el sedimento del arroyo Las Flores. Componentes mayoritarios, minoritarios y contaminantes (a excepción de los niveles de metales pesados, el resto de los datos proviene de Ronco *et al.* (2008)).

El análisis de la distribución del tamaño de grano mostró: Arena (61%), Arcilla (12%) y Limo (27%) con el 6,9% de materia orgánica.

6.4.1 Ensayos con sedimento procesado

Hyaella curvispina

CADMIO

6.4.1.1 Evaluación de la toxicidad del Cd adicionado a sedimento sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-1)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $4,01 \pm 0,46$ (\pm DE; n=48).

Las concentraciones medidas de Cd en sedimento fueron entre un 15 y 30% más bajas que los valores nominales, manteniéndose estables entre el tiempo inicial y final de ensayo. Por lo tanto, los valores correspondientes a las concentraciones nominales de 1, 4 y 8 mg Cd/Kg SS fueron estimados como el promedio de las concentraciones analíticas a tiempo inicial y final, y referidos como 0,85, 2,8 y 5,6 mgCd/Kg SS (Tabla 6.4).

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cd en el agua sobrenadante (OW) a tiempo inicial y final se muestran en la Tabla 6.4. La concentración de Cd en el OW fue no detectable en todos los tratamientos.

En grupo tratado con 5,6 mgCd/Kg SS mostró una tendencia a la disminución de la supervivencia, pero no difirió significativamente del grupo control (Tabla 6.4 y Anexo I Tabla 25).

Concentración Nominal	Control		1 mgCd/Kg SS		4 mgCd/Kg SS		8 mgCd/Kg SS	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Sedimento								
CE (mg/Kg)	<0,25	<0,25	0,95±0,07	0,75±0,02	2,99±0,01	2,54±0,00	5,50	5,70
CP	0		0,85		2,8		5,6	
Agua Sobrenadante								
CE (µg/L)	<1,0±0,0	<1,0±0,0	<1,0±0,0	<1,0±0,0	<1,0±0,0	<1,0±0,0	<1,0±0,0	<1,0±0,0
pH	8,5±0,0	8,4±0,0	8,4±0,1	8,4±0,0	8,5±0,0	8,3±0,1	8,5±0,0	8,3±0,1
OD (mg/L)	7,4±0,9	6,7±0,4	7,0±0,1	6,7±0,3	7,5±0,5	6,2±0,5	7,2±0,1	6,6±0,0
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	180±20	160±0	190±20	180±10	180±010	190±0	210±20	210±20
Conduct. (µS/cm)	917±41	788±15	978±11	817±29	950±28	837±35	968±49	905±35
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	4,6±0,2	0,2±0,0	4,4±0,2	0,1±0,0	4,6±0,4	0,2±0,0	3,3±0,6	0,2
Supervivencia (%)	--	91±7	--	91±11	--	91±11	--	75±13

Tabla 6.4: Parámetros fisicoquímicos (n=2-8), concentraciones efectivas de cadmio en OW y sedimento (CE, n=1-2) y porcentaje de supervivencia de juveniles de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como media ± DS. CP: concentración analítica promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición.

El peso seco de los anfípodos expuestos a 5,6 mgCd/Kg SS fue significativamente más bajo que el de los grupos restantes, incluido el control, pero no difirió del grupo inicial (Fig. 6.4 A). El peso del grupo control y el de los animales expuestos a 0,85 y 2,8 mgCd/Kg SS aumentó significativamente entre un 30 y un 38% en relación al

grupo inicial, mientras que el incremento de los animales expuestos a la mayor concentración de Cd sólo fue del 4%.

El control y los tres grupos tratados mostraron un incremento significativo (del 9 a 14%) en longitud relativo con el grupo inicial (Fig. 6.4 B). No se hallaron diferencias significativas para este parámetro entre tratamientos.

El Índice de Masa Corporal (IMC) del grupo expuesto a 5,6 mgCd/Kg SS fue significativamente menor que el del grupo control y los expuestos a las dos concentraciones menores de Cd (20-26%), siguiendo un patrón similar que el observado para la biomasa (Fig. 6.4 C).

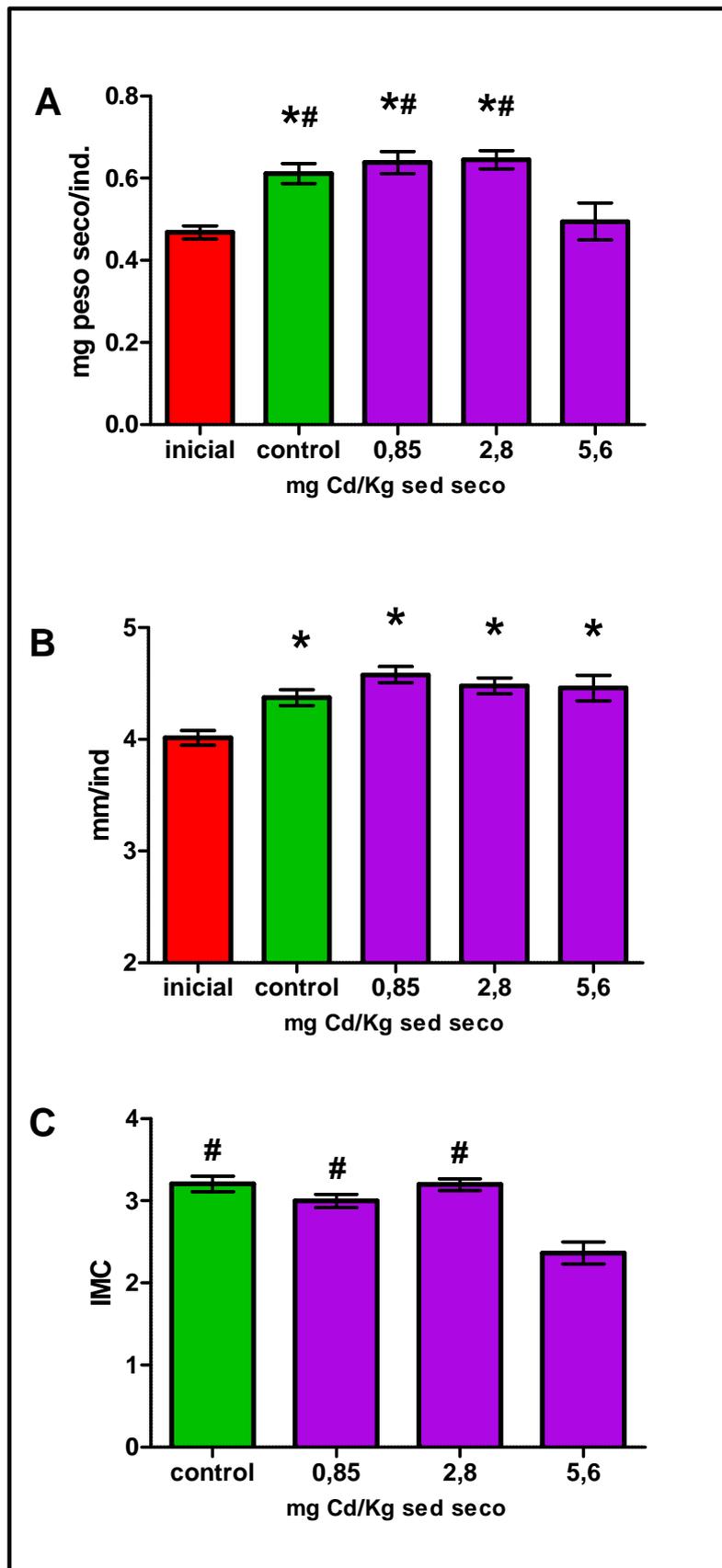


Fig. 6.4. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cd en sedimento.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con el grupo 5,6 mg/KgSS.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.4.1.2 Evaluación de la toxicidad del Cd adicionado a sedimento sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cd-2)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $6,04 \pm 0,45$ (\pm DE; $n=22$).

Las concentraciones medidas de Cd en sedimento fueron entre un 23 y 27,5% más bajas que los valores nominales, manteniéndose estables entre el tiempo inicial y final de ensayo. Por lo tanto, los valores correspondientes a las concentraciones nominales de 4 y 8 mgCd/Kg SS fueron estimados como el promedio de las concentraciones analíticas a tiempo inicial y final, y referidos como 3,0 y 6,2 mgCd/Kg SS (Tabla 6.5).

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cd en el agua sobrenadante (OW) a tiempo inicial y final se muestran en la Tabla 6.5. En todos los tratamientos y tiempos, la concentración de Cd en el OW estuvo por debajo o muy cercana al límite de detección.

Al igual que con los individuos juveniles, el grupo tratado con la mayor concentración de Cd mostró una tendencia a la disminución de la supervivencia, pero no difirió significativamente del grupo control (Tabla 6.5 y Anexo I Tabla 29).

Concentración Nominal	Control		4 mgCd/Kg SS		8 mgCd/Kg SS	
Sedimento	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
CE (mg/Kg)	<0,25	<0,25	2,9	3,1	6,0	6,4
CP	0		3,0		6,2	
Agua Sobrenadante	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
CE (μ g/L)	<1	<1	1,2	<1	1,1	<1
pH	$8,8 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,0$
OD (mg/L)	$8,2 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,1$
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	160 ± 10	170 ± 10	180 ± 0	180 ± 10	180 ± 0	180 ± 0
Conduct. (μ S/cm)	753 ± 15	732 ± 17	791 ± 7	802 ± 16	785 ± 9	817 ± 20
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	$5,7 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,0$
Supervivencia (%)	--	80 ± 0	--	80 ± 17	--	72 ± 13

Tabla 6.5: Parámetros fisicoquímicos ($n=5$), concentraciones efectivas de cadmio en OW y sedimento (CE, $n=1$) y porcentaje de supervivencia de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como media \pm DS. CP: concentración analítica promedio entre tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de exposición.

En relación al grupo inicial, se observó un aumento significativo de la biomasa en el grupo control y en los animales expuestos a 3mgCd/Kg SS (39% y 21%, respectivamente). Si bien los animales ensayados a 6,2 mgCd/Kg SS incrementaron su biomasa en relación al tiempo inicial, dicho incremento no fue significativo (Fig. 6.5 A).

Con respecto a la longitud, sólo se observó un aumento significativo del control respecto del grupo inicial (Fig. 6.5 B).

Si bien no se obtuvieron diferencias significativas ni en longitud ni biomasa entre el control y los grupos tratados, el IMC permitió observar diferencias en el estado general de los animales entre el grupo control y los individuos expuestos a 6,2 mgCd/Kg SS (Fig. 6.5 C).

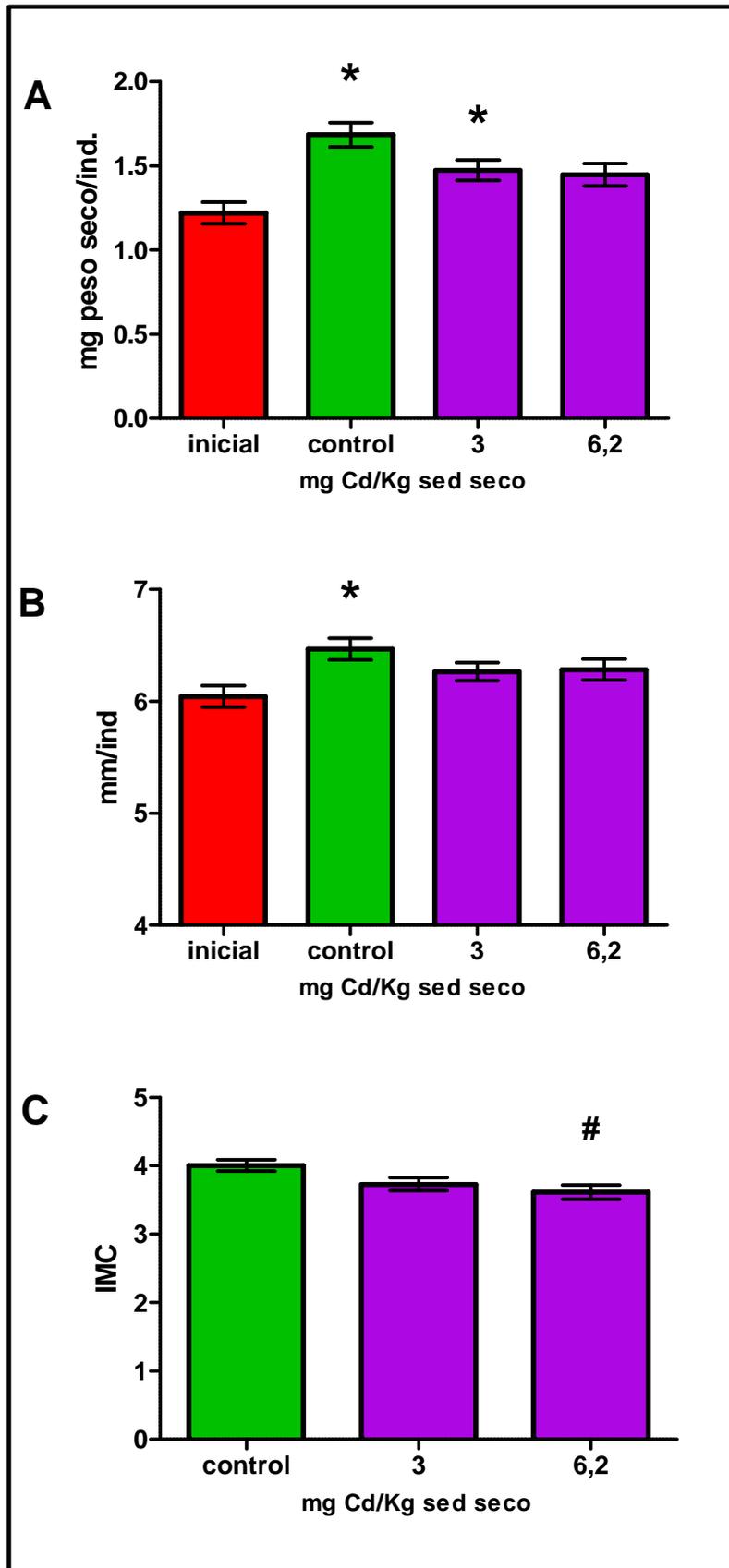


Fig. 6.5. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cd en sedimento.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con grupo control.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.4.1.3 Concentración de Cd en tejidos

Los resultados que se muestran a continuación agrupan los obtenidos en los siguientes ensayos:

- Cd-1; juveniles (J)
- Cd-2; machos mayores (Mm)

El contenido de cadmio en el tejido de los animales expuestos por 10 días a Cd en sedimento se muestra en la Tabla 6.6 y Fig. 6.6.

CN	Control	1 mgCd/Kg	4 mgCd/Kg	8 mgCd/Kg
J	nd	nd	10±2	21±4
	n=2 (0)	n=2 (0,85)	n=2 (2,8)	n=2 (5,6)
Mm	nd	ne	6±2 (*)	9±2 (*)
	n=5 (0)		n=5 (3,0)	n=5 (6,2)

Tabla 6.6: Contenido de Cd en tejido ($\mu\text{gCd/g PS}$) en juveniles (J) y machos mayores (Mm) de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como promedio \pm DE. CN: concentración nominal; n: número de réplicas; entre paréntesis: concentración efectiva promedio; nd: no detectado; ne: no ensayado. Límite de detección $1 \mu\text{gCd/L}$. (*): indica diferencias significativas respecto del grupo control (Mm).

Los resultados indican que el período de exposición fue suficientemente prolongado para que se produzca acumulación de Cd en el tejido de los animales en concentraciones detectables.

La concentración de Cd en tejido fue un orden de magnitud menor que la registrada en los ensayos realizados con Cd en matriz acuosa (Tabla 5.6 y Fig. 5.6, capítulo 5).

La carga corporal de cadmio cercana a $20 \mu\text{gCd/g PS}$ (J) y de $9 \mu\text{gCd/g PS}$ (Mm) registrada en los animales expuestos a 8 mgCd/Kg SS (CN) se asocia a un porcentaje de supervivencia similar al del control (Tablas 6.4, 6.5 y 6.6).

Al igual que en los ensayos realizados en medio acuoso, la incorporación de cadmio aumentó con la concentración de exposición, siendo este efecto más marcado en el caso de los juveniles; a su vez la incorporación del metal disminuyó con el incremento de la talla de los organismos (Fig. 6.6). Debido al bajo número de réplicas no se pudo realizar análisis estadístico con juveniles.

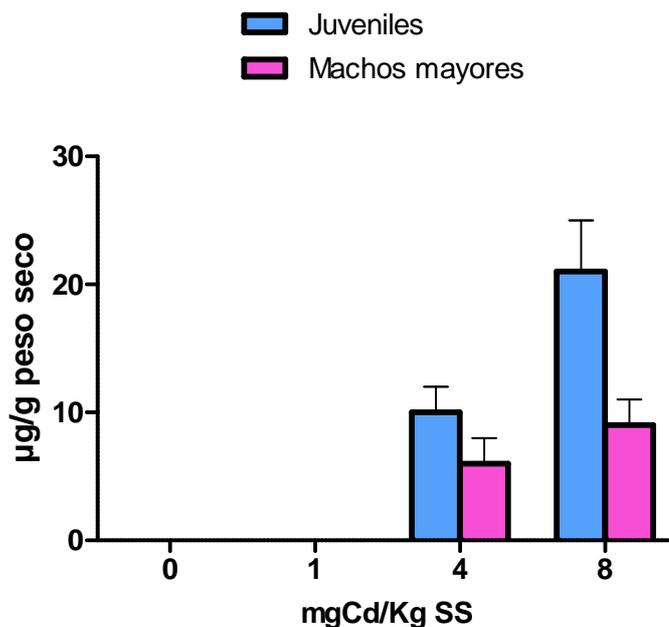


Figura 6.6: Cd acumulado en tejido en juveniles y machos mayores de *H. curvispina* a diferentes concentraciones de ensayo.

6.4.2 ENSAYOS CON SEDIMENTO PROCESADO Y AGUA DE PORO

HYALELLA CURVISPINA

COBRE

Para evaluar de manera efectiva el Cu adicionado al sedimento, sin considerar los niveles basales del metal determinados en el sedimento de origen (control), las concentraciones de Cu en los diferentes tratamientos fueron expresadas como Concentración Efectiva (CE); siendo $CE = Cu \text{ adicionado} - Cu \text{ control}$.

6.4.2.1 Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento y agua de poro sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-1)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $3,32 \pm 0,37$ ($\pm DE$; $n=28$) y $2,99 \pm 0,27$ ($\pm DE$; $n=13$) para el ensayo con sedimento completo y agua de poro, respectivamente.

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cu en agua sobrenadante (OW) para los distintos tratamientos a tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 6.7. Las concentraciones efectivas de Cu en sedimento, expresadas como CE, estuvieron cercanas a los valores nominales.

Sedimento Adicionado

Concentración Nominal	Control		10 mgCu/Kg SS		100 mgCu/Kg SS		200 mgCu/Kg SS	
Sedimento	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Cu medido (mg/Kg)	17,3	--	26,6	--	128,3	--	241,8	--
CE	0		9		111		224	
Agua Sobrenadante	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Cu medido (µg/L)	8	7	15	11	87	58	140	110
pH	8,3±0,1	8,7±0,0	8,2±0,4	8,7±0,0	8,4±0,1	8,6±0,1	8,4±0,1	8,3±0,1
OD (mg/L)	6,9±0,2	7,0±0,1	5,8±1,6	6,9±0,2	7,4±0,4	6,6±0,3	7,2±0,5	6,4±0,1
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	160±0	180±0	160±0	190±0	150±0	210±10	160±10	200±0
Conduct. (µS/cm)	691±7	881±15	762±14	890±18	751±19	913±31	777±17	934±47
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	5,8±0,0	1,9±0,0	5,7±0,3	3,0±0,3	4,7±0,3	2,2±1,4	5,2±0,3	2,0±0,5
Sobrevivencia (%)	--	98±5	--	98±5	--	100±0	--	100±0

Tabla 6.7: Parámetros fisicoquímicos (n=2-4), concentraciones efectivas de cobre en OW (n=1) y porcentaje de sobrevivencia de juveniles de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como media ± DS. CE: concentración efectiva (Cu adicionado - Cu control); Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

A concentraciones menores o iguales a 224 mgCu/Kg SS y 125 µgCu/L en agua sobrenadante (concentración promedio entre Ti y Tf de ensayo), no se registraron efectos sobre la sobrevivencia (Tabla 6.7 y Anexo I Tabla 34) ni en el crecimiento de los anfípodos tratados en relación al grupo control (Fig. 6.7).

En relación al peso seco, hubo un incremento significativo de la biomasa tanto del grupo control como de los tratados, respecto del tiempo inicial. Los individuos del grupo control y de la menor concentración de exposición incrementaron su peso en un 60% y 50%, respectivamente, mientras que en los expuestos a 111 y 224 mgCu/Kd SS el aumento fue de un 35%. Si bien se observó una tendencia a la disminución del peso con el incremento de la concentración de exposición, esta no fue significativa (Fig. 6.7 A).

En ningún caso los individuos incrementaron su longitud en relación al tiempo inicial (Fig. 6.7 B). El IMC no reflejó diferencias significativas entre tratamientos (Fig. 6.7 C).

Agua de Poro

El agua de poro utilizada fue obtenida del ensayo anterior, a partir del sedimento adicionado con la mayor concentración de Cu. Los valores efectivos de Cu en MHW (control) y en agua de poro (AP) se muestran en la Tabla 6.8.

<i>Tratamientos</i>	<i>Control</i>		<i>AP</i>	
<i>Parámetros</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido ($\mu\text{g/L}$)	5	3	200	130
pH	7,8 \pm 0,0	7,8 \pm 0,1	8,3 \pm 0,0	8,8 \pm 0,0
OD (mg/L)	7,6 \pm 0,1	7,2 \pm 0,2	7,9 \pm 0,0	6,5 \pm 0,1
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	100	330	330
Conduct. ($\mu\text{S/cm}$)	373 \pm 13	383 \pm 6	1481 \pm 18	1499 \pm 12
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,0	0,2	2,7	2,5
Supervivencia (%)	--	100 \pm 0	--	85 \pm 7

Tabla 6.8: Parámetros fisicoquímicos (n=1-3), concentraciones efectivas de cobre (n=1) y porcentaje de sobrevivencia de juveniles de *H. curvispina* expuestos a agua de poro. Valores expresados como media \pm DS.

En la matriz de ensayo evaluada, a una concentración de 165 $\mu\text{gCu/L}$ (concentración promedio en agua de poro entre Ti y Tf de exposición) no se registró efecto sobre la sobrevivencia (Tabla 6.8 y Anexo I Tabla 38) ni sobre el crecimiento de los animales expuestos en relación al grupo control.

Tanto los animales del grupo control como los tratados incrementaron en peso significativamente (17% y 8%, respectivamente) en relación al tiempo inicial (Fig. 6.8 A).

Con respecto a la longitud, si bien se observó un aumento en los dos grupos respecto del tiempo inicial, sólo fue significativo en el caso del control (Fig. 6.8 B). El IMC fue similar para ambos tratamientos (Fig. 6.8 C).

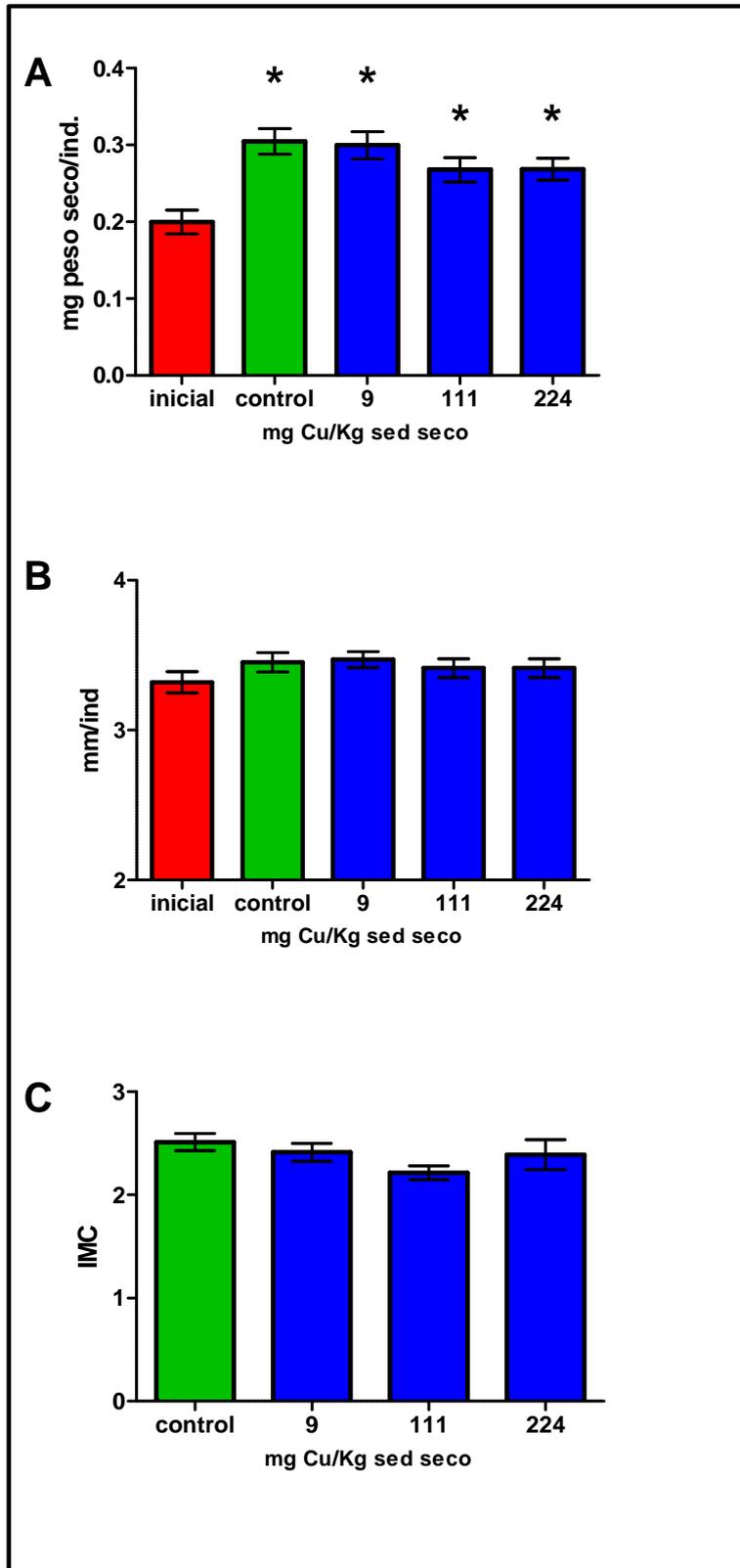


Fig.6.7. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en sedimento.

*: indica diferencias significativas con grupo inicial.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

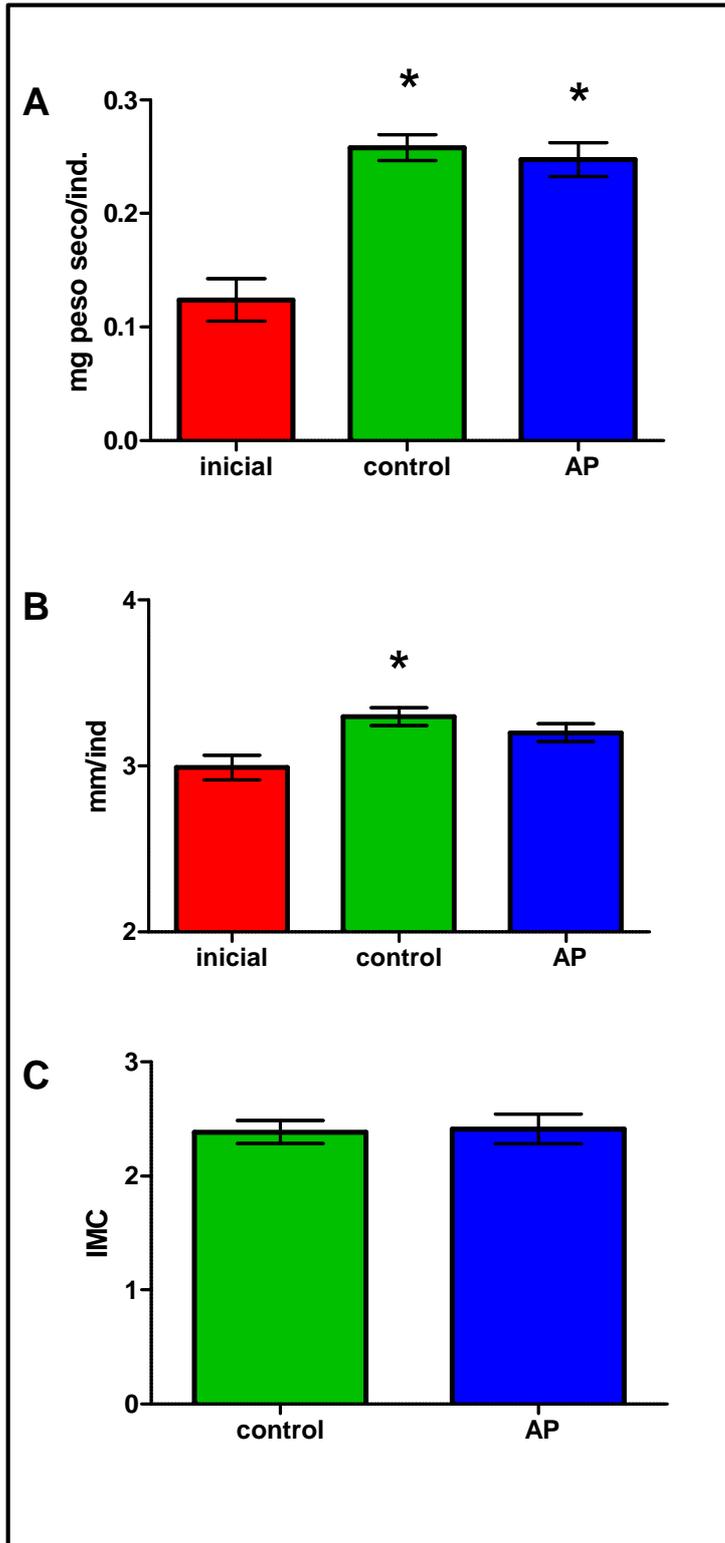


Fig. 6.8. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de juveniles de *H. curvispina* expuestos a MHW y Cu en agua de poro (AP).

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.4.2.2 Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento y agua de poro sobre machos mayores: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-2)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $5,58 \pm 0,32$ (\pm DE; n=17) y $5,52 \pm 0,66$ (\pm DE; n=20) para el ensayo con sedimento completo y agua de poro, respectivamente.

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cu en agua sobrenadante (OW) para los distintos tratamientos a tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 6.9. Al igual que en el ensayo anterior, las concentraciones efectivas de Cu en sedimento, expresadas como CE, estuvieron cercanas a los valores nominales.

Sedimento Adicionado

Concentración Nominal	Control		10 mgCu/Kg SS		100 mgCu/Kg SS		200 mgCu/Kg SS	
Sedimento	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (mg/Kg)	18,4	--	28,8	--	112,6	--	218,1	--
CE	0		10		94		200	
Agua Sobrenadante	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (μ g/L)	18	12	32	24	90	125	150	195
pH	$8,3 \pm 0,0$	$8,4 \pm 0,1$	$8,3 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,0$	$8,7 \pm 0,0$	$8,2 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,0$
OD (mg/L)	$7,2 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,1$
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	120 ± 0	150 ± 10	120 ± 0	150 ± 0	140 ± 0	190 ± 0	140 ± 0	180 ± 0
Conduct. (μ S/cm)	692 ± 2	759 ± 8	711 ± 3	800 ± 8	724 ± 8	839 ± 10	724 ± 18	811 ± 18
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	$4,3 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,0$	$4,0 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,0$	$0,6 \pm 0,0$
Supervivencia (%)	--	93 ± 10	--	93 ± 8	--	90 ± 6	--	90 ± 8

Tabla 6.9: Parámetros fisicoquímicos (n=2-4), concentraciones efectivas de cobre en OW (n=1) y porcentaje de supervivencia de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como media \pm DS. CE: concentración efectiva (Cu adicionado - Cu control); Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

A concentraciones menores o iguales a 200 mgCu/KgSS y 173 μ gC/L en agua sobrenadante (concentración promedio entre Ti y Tf de ensayo), no se registraron efectos sobre la supervivencia de los anfípodos, en relación al grupo control (Tabla 6.9 y Anexo I Tabla 42).

Con respecto a los parámetros de crecimiento, no se observaron diferencias significativas en la biomasa de los animales entre tratamientos ni en relación al tiempo inicial (Fig. 6.9 A).

Se registró un descenso significativo de la longitud de los animales expuestos a 94 y 200 mgCu/Kg SS en relación al grupo control. A su vez, para este parámetro, el grupo expuesto a 200 mgCu/Kg SS se diferenció de los animales expuestos a 10 mgCu/Kg SS (Fig. 6.9 B).

No hubo diferencias significativas en el IMC entre controles y expuestos (Fig. 6.9 C).

Aqua de Poro

El agua de poro utilizada fue obtenida del ensayo anterior, a partir del sedimento adicionado con la mayor concentración de Cu. Los valores efectivos de Cu en MHW (control) y en agua de poro (AP) se muestran en la Tabla 6.10.

Tratamientos	Control		AP	
	Ti	Tf	Ti	Tf
Parámetros				
Cu medido (µg/L)	28	20	230	160
pH	7,9±0,0	7,6±0,1	8,0±0,0	8,8±0,0
OD (mg/L)	7,4±0,1	6,3±0,4	7,2±0,2	5,9±0,4
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	100±10	320	330±0
Conduct. (µS/cm)	397±6	411±3	1415±10	1461±18
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,0	0,8±0,5	1,9	3,3±0,0
Supervivencia (%)	--	87±11	--	83±6

Tabla 6.10: Parámetros fisicoquímicos (n=1-3), concentraciones efectivas de cobre (n=1) y porcentaje de supervivencia de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a agua de poro. Valores expresados como media ± DS.

En la matriz evaluada, a una concentración de 195 µgCu/L (concentración promedio en agua de poro entre Ti y Tf de exposición) no se registró efecto sobre la supervivencia (Tabla 6.10 y Anexo I Tabla 46) ni el crecimiento de los animales debido a la presencia del metal, en relación al grupo control.

Tanto los animales del grupo control como los tratados incrementaron en peso significativamente (18% y 23%, control y tratado respectivamente) en relación al tiempo inicial (Fig. 6.10 A).

No se observaron diferencias significativas en la longitud de ambos grupos respecto del tiempo inicial (Fig. 6.10 B). El IMC fue similar entre ambos tratamientos (Fig. 6.10 C).

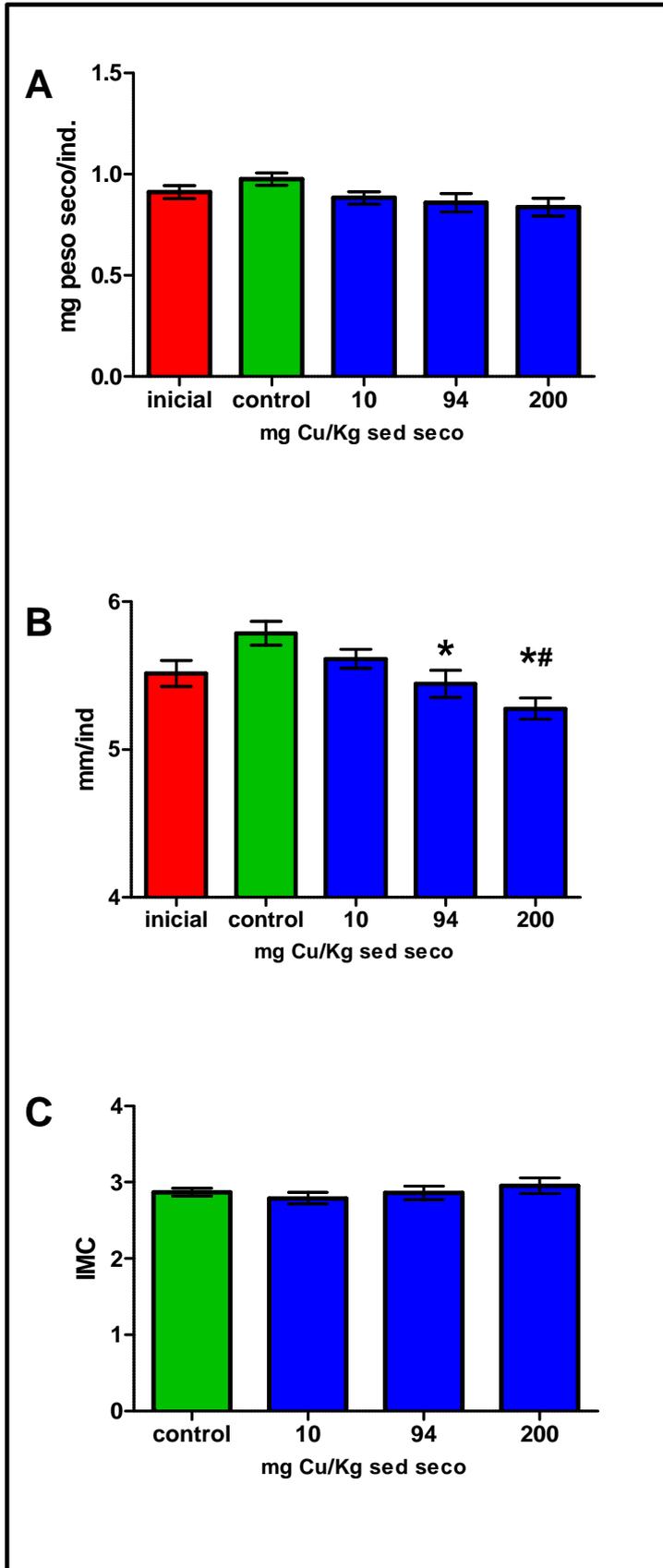


Fig. 6.9. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en sedimento.

*: indica diferencias significativas con el grupo control.

#: indica diferencias significativas con 10 mg/Kg SS.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

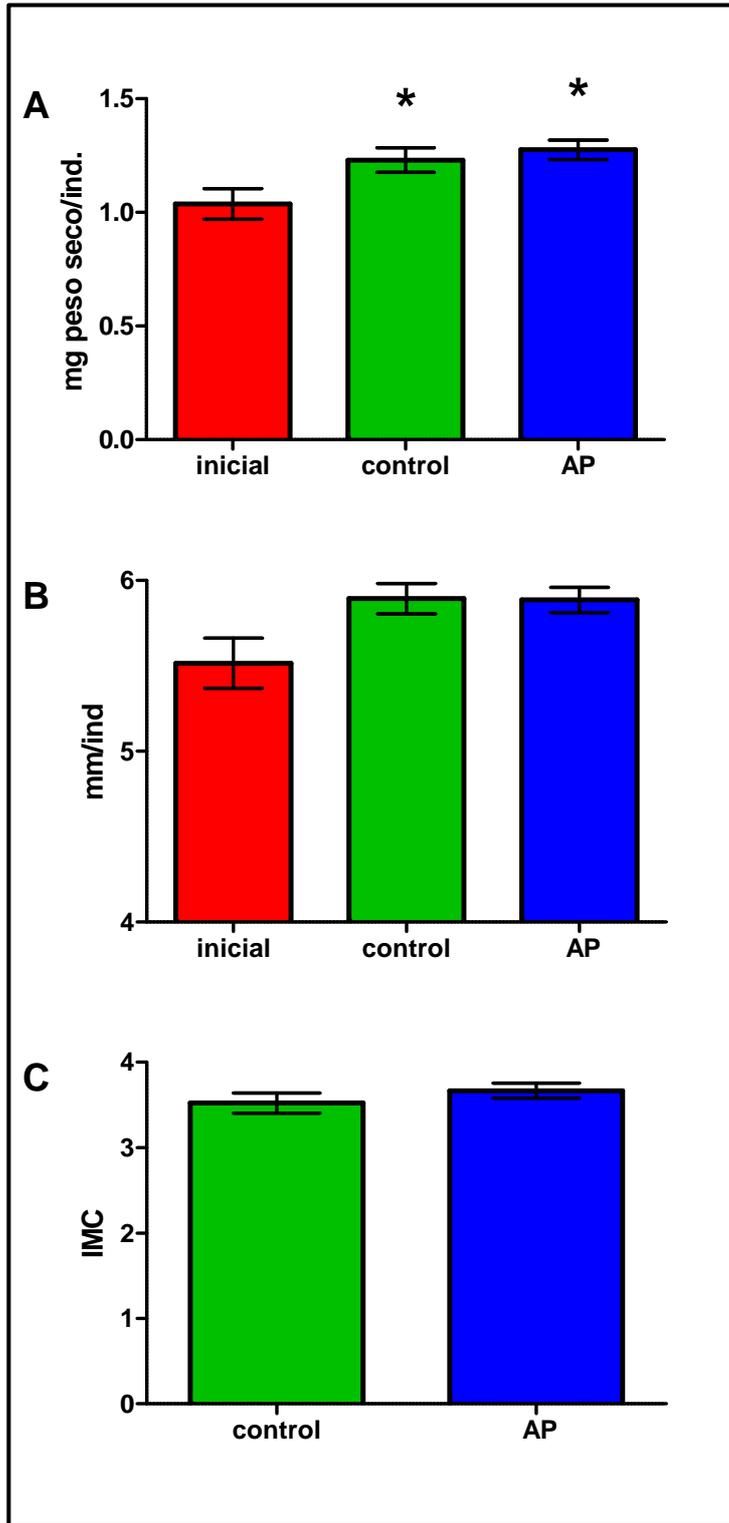


Fig. 6.10. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos mayores de *H. curvispina* expuestos a MHW y Cu en agua de poro (AP).

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.4.2.3 Concentración de Cu en tejidos

Los resultados que se muestran a continuación agrupan los obtenidos en los siguientes ensayos:

- Cu-1; juveniles sedimento (J-S)
- Cu-2; machos sedimento (Mm-S)
- Cu-1; juveniles agua de poro (J-AP)
- Cu-2; machos agua de poro (Mm-AP)

El contenido de cobre en el tejido de los animales expuestos por 10 días al metal en sedimento se muestra en la Tabla 6.11.

CN	Control	10mgCu/Kg	100 mgCu/Kg	200 mgCu/Kg
J-S	103±2	109±7	156±8	142±12
	n=2 (0)	n=2 (9)	n=2 (111)	n=2 (224)
Mm-S	100±14 (*)	141±8	100±6 (*)	114±14
	n=3 (0)	n=3 (10)	n=3 (94)	n=4 (200)

Tabla 6.11: Contenido de Cu en tejido (µgCu/g PS) en juveniles (J) y machos mayores (Mm) de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionados. Valores expresados como promedio ± DE. CN: concentración nominal; n: número de réplicas; entre paréntesis: concentración efectiva. (*): diferencias significativas respecto de 10mgCu/Kg SS.

El contenido de cobre en el tejido de los animales expuestos por 10 días al metal en agua de poro se muestra en la Tabla 6.12.

Tratamientos	Control	AP
J-AP	120±2 n=2	230±13 n=2
Mm-AP	122±4 n=3	117±3 n=3

Tabla 6.12: Contenido de Cu en tejido (µgCu/g PS) en juveniles (J) y machos mayores (Mm) de *H. curvispina* expuestos a agua de poro. Valores expresados como promedio ± DE. n: número de réplicas.

En la siguiente figura se observa el incremento de la carga corporal de Cu como porcentaje del control en animales expuestos a sedimento y agua de poro.

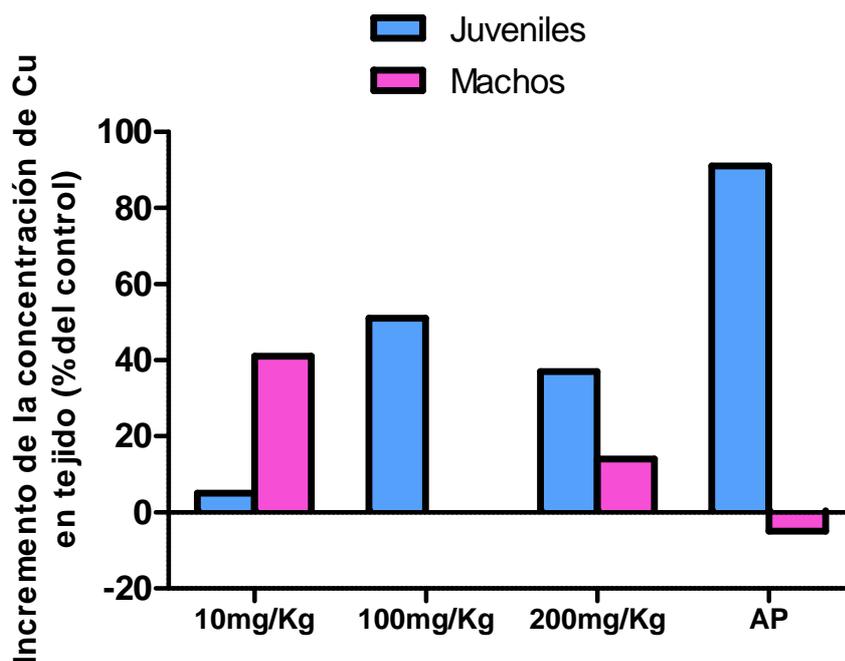


Figura 6.11: Acumulación de Cu relativo a control en tejidos en juveniles y machos mayores de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a sedimento adicionado y agua de poro (AP). Las concentraciones de Cu en sedimento se encuentran expresadas como valores nominales.

En juveniles de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado con Cu, se observó que un incremento del metal en tejidos de hasta un 50% en relación al de control no alteró los parámetros de crecimiento (Tabla 6.11 y Fig. 6.7). Si bien la incorporación de Cu en los animales ensayados con agua de poro fue 2,5 veces mayor que la determinada en los anfípodos expuestos al sedimento de origen (Tablas 6.11 y 6.12; Fig. 6.11), la misma no afectó los puntos finales evaluados (Tabla 6.8 y Fig. 6.8).

Los resultados obtenidos permiten observar un patrón de acumulación de Cu mayor a partir de solución acuosa en relación al sedimento y sugieren una elevada tolerancia a concentraciones de Cu en tejido.

En machos de *H. curvispina* expuestos a sedimento adicionado con Cu, a excepción del tratamiento de 10 mgCu/Kg SS (concentración nominal), no se registró un incremento significativo de la carga del metal en tejidos. A su vez, tampoco incorporaron Cu los anfípodos ensayados en agua de poro en relación al grupo control (Tablas 6.11 y 6.12, Fig. 6.11).

Por lo tanto, para concentraciones de exposición similares tanto en sedimento adicionado como en agua de poro, se observó en general una mayor incorporación del metal en los juveniles, en relación a los machos.

6.4.3 ENSAYOS CON SEDIMENTO PROCESADO ADICIONADO

Hyaella pseudoazteca

COBRE

6.4.3.1 Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia y el crecimiento (Ensayo Cu-3)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $2,25 \pm 0,25$ (\pm DE; $n=15$).

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cu en agua sobrenadante (OW) para los distintos tratamientos a tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 6.13. Las concentraciones efectivas de Cu en sedimento, expresadas como CE, estuvieron cercanas a los valores nominales.

Concentración Nominal	Control		100 mgCu/Kg SS		200 mgCu/Kg SS	
Sedimento	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (mg/Kg)	25	--	135	--	230	--
CE	0		110		205	
Agua sobrenadante	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (μ g/L)	26	19	137	101	249	220
pH	$8,9 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,0$
OD (mg/L)	$8,3 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,1$
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	170 ± 10	160 ± 10	180 ± 10	170 ± 10	190 ± 0	200 ± 0
Conduct. (μ S/cm)	747 ± 7	719 ± 4	782 ± 8	790 ± 15	844 ± 5	860 ± 17
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	$5,7 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,0$	$4,6 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$
Supervivencia (%)	80 ± 7		88 ± 11		90 ± 10	

Tabla 6.13: Parámetros fisicoquímicos ($n=2-5$), concentraciones efectivas de cobre en OW ($n=1$) y porcentaje de supervivencia de juveniles de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como media \pm DS. CE: concentración efectiva (Cu adicionado - Cu control); Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

No hubo efecto sobre la sobrevivencia en ninguna concentración de ensayo en relación al grupo control (Tabla 6.13 y Anexo I Tabla 51).

Tanto la biomasa como la longitud del grupo expuesto a 205 mgCu/Kg SS disminuyeron significativamente en relación al control y a los animales ensayados a 110 mgCu/Kg SS (Fig. 6.12 A y B). Con respecto al tiempo inicial, el peso del grupo control incrementó un 83%, el de los animales expuestos a 110 mgCu/Kg SS un 50%, mientras que en los ensayados a 205 mgCu/Kg SS el incremento fue sólo de un 17%. En cuanto a la talla, el aumento en longitud de los anfípodos control y el de los expuestos a 110 mgCu/Kg SS fue de un 14%, en tanto que en los expuestos a la mayor concentración de Cu el incremento fue sólo de un 2%.

Con respecto al IMC, se observó una diferencia significativa entre los animales expuestos a las dos concentraciones de Cu y el control, siendo un 17% y un 23% menor en los animales ensayados a 110 y 205 mgCu/Kg SS, respectivamente (Fig. 6.12 C). En este caso, el IMC permitió determinar un efecto negativo en los animales ensayados a 110 mgCu/Kg SS comparados con el grupo control, en tanto que al evaluar longitud y biomasa por separado no se logró observar diferencias significativas entre ambos grupos.

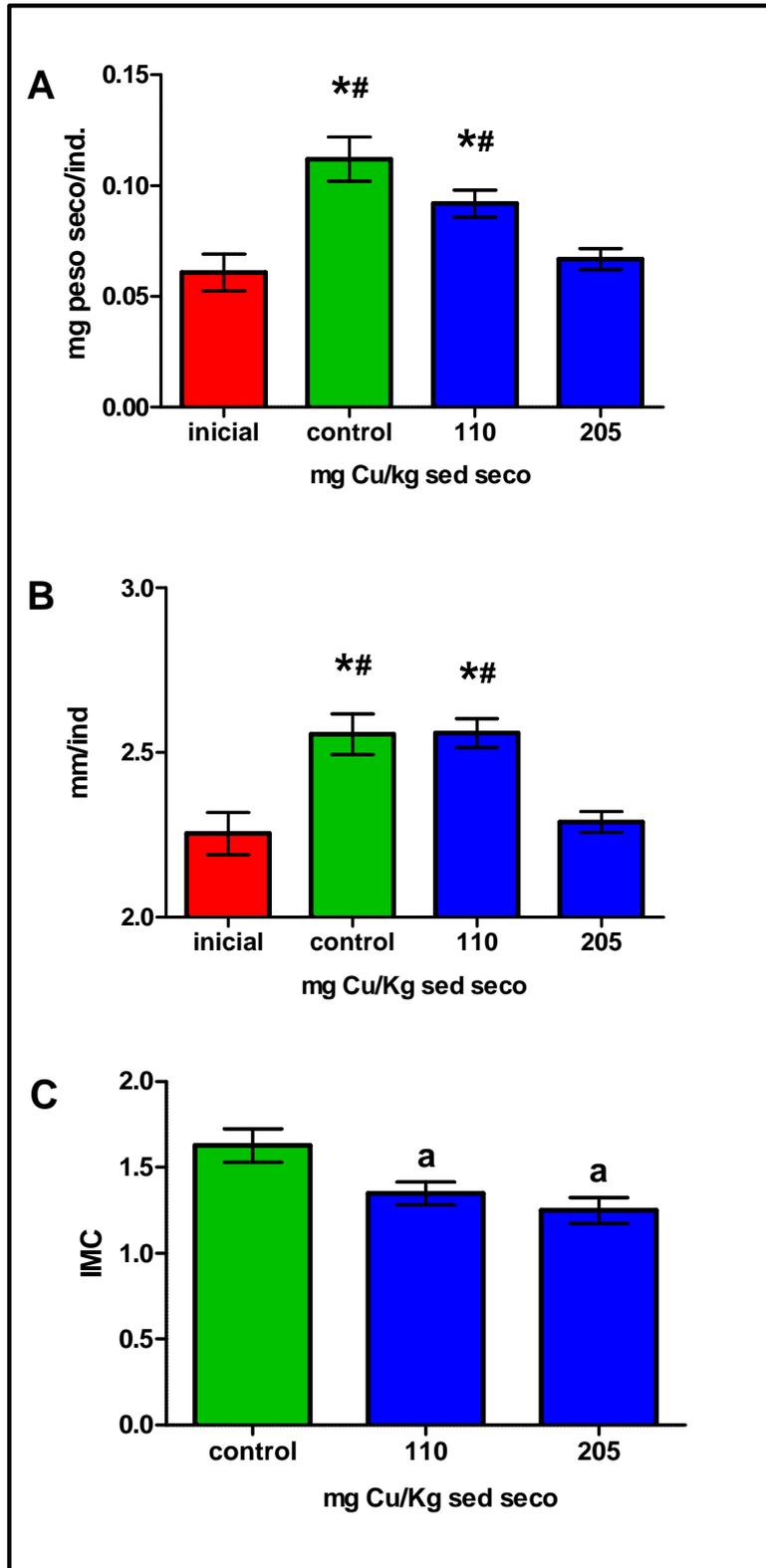


Fig. 6.12. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de juveniles de *H. pseudoazteca* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en sedimento.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con 205 mgCu/Kg SS.

a: indica diferencias significativas con el grupo control.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.4.3.2 Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento sobre machos: efectos sobre la supervivencia, el crecimiento y acumulación del metal en tejidos (Ensayo Cu-4)

La longitud promedio de los individuos empleados a tiempo inicial de ensayo fue de $4,87 \pm 0,35$ (\pm DE; $n=30$).

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cu en agua sobrenadante (OW) para los distintos tratamientos a tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 6.14. Las concentraciones efectivas de Cu en sedimento, expresadas como CE, estuvieron cercanas a los valores nominales.

Concentración Nominal	Control		100 mgCu/Kg SS		200 mgCu/Kg SS	
Sedimento	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Cu medido (mg/Kg)	25	--	135	--	230	--
CP	0		110		205	
Agua sobrenadante	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Cu medido (μ g/L)	26	25	137	120	249	238
pH	$8,7 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,0$	$8,8 \pm 0,0$	$8,8 \pm 0,1$
OD (mg/L)	$8,1 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	170 ± 0	170 ± 10	170 ± 0	150 ± 0	200 ± 0	190 ± 10
Conduct. (μ S/cm)	767 ± 8	738 ± 13	776 ± 27	792 ± 62	784 ± 41	792 ± 22
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	$5,8 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$	$4,3 \pm 1,1$	$0,6 \pm 0,3$	$4,6 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$
Supervivencia (%)	82 ± 13		90 ± 12		82 ± 11	

Tabla 6.14: Parámetros fisicoquímicos ($n=2-5$), concentraciones efectivas de cobre en OW ($n=1$) y porcentaje de supervivencia de machos de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimento adicionado. Valores expresados como media \pm DS. CE: concentración efectiva (Cu adicionado - Cu control); Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia entre el grupo control y las diferentes concentraciones de ensayo (Tabla 6.14 y Anexo I Tabla 55).

Tanto en biomasa como en longitud se observaron diferencias significativas entre los animales del grupo control y los expuestos a 110 mgCu/Kg SS, en relación al grupo inicial. A su vez se observaron diferencias significativas en el peso seco entre el control y los animales ensayados a 205 mgCu/Kg SS (Fig. 6.13 A y B). En comparación al grupo inicial, el incremento en peso del grupo control y de los

expuestos a la menor concentración de Cu, fue de un 16% y un 22%, mientras que en los expuestos a 205 mgCu/Kg SS sólo fue de un 8%.

No se observaron diferencias significativas en la longitud y el IMC entre tratamientos (Fig. 6.13 B y C).

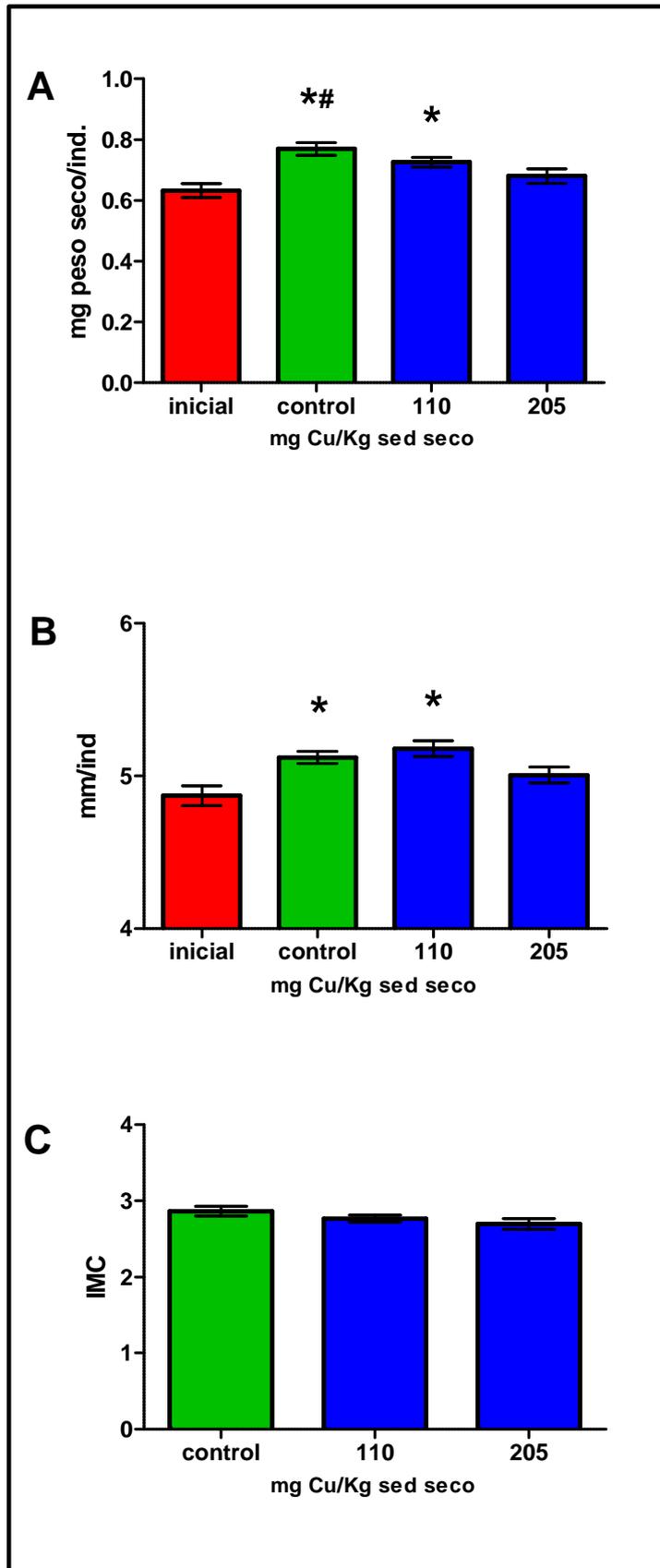


Fig. 6.13. Valores promedio \pm EEM del peso (A), la longitud (B) y el IMC (C) de machos de *H. pseudoazteca* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en sedimento.

*: indica diferencias significativas con el grupo inicial.

#: indica diferencias significativas con 205 mgCu/Kg SS.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.4.3.3 Concentración de Cu en tejidos

El contenido de cobre en el tejido de los animales expuestos por 10 días a sedimento adicionado con el metal se muestra en la Tabla 6.15.

CE	Control	110 mgCu/Kg	205 mgCu/Kg
M	56±4 (n=4)	73±10 (n=4)	87±17 (*) (n=4)

Tabla 6.15: Contenido de Cu en tejido ($\mu\text{gCu/g PS}$) en machos (M) de *H. pseudoazteca*. Valores expresados como promedio \pm DE. CE: concentración efectiva de Cu en sedimento; n: número de réplicas. (*): indica diferencias significativas respecto del grupo control.

En la siguiente figura (6.14) se observa el incremento de la carga corporal de Cu como porcentaje del control en animales expuestos a sedimento adicionado con el metal.

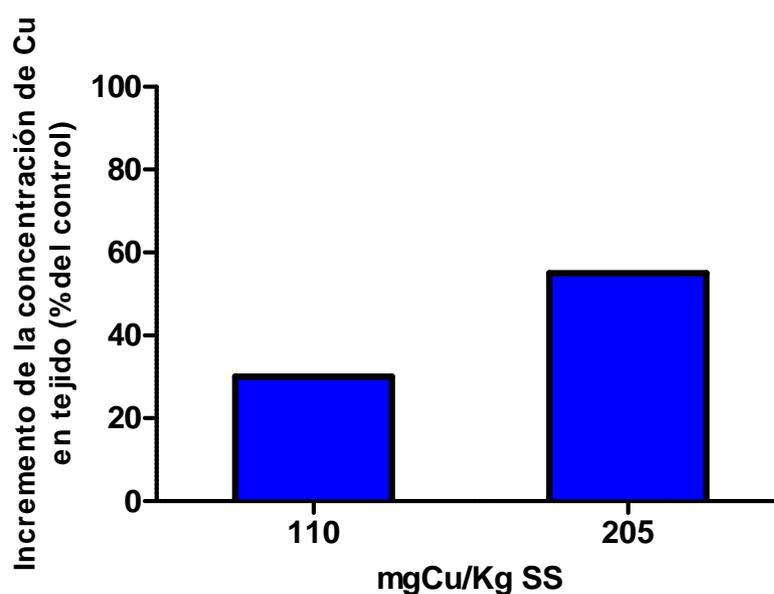


Figura 6.14: Acumulación de Cu en tejidos en machos de *H. pseudoazteca* luego de 10 días de exposición a sedimento adicionado.

En machos de *H. pseudoazteca* la incorporación de cobre aumentó con la concentración de exposición. Un incremento significativo del metal en tejidos de hasta un 50% no afectó la sobrevivencia de los anfípodos, pero puede asociarse a un efecto sobre la biomasa de los animales (Tabla 6.14; Figs.6.13 y 6.14).

6.4.4 Ensayos con sedimento completo

Hyaella pseudoazteca

COBRE

6.4.4.1 Evaluación de la toxicidad del Cu adicionado a sedimento sobre juveniles: efectos sobre la supervivencia y el crecimiento

Los ensayos con sedimento completo se llevaron a cabo utilizando individuos juveniles de *H. pseudoazteca* y se realizaron en dos etapas:

Ensayo J1, se evaluaron las siguientes concentraciones nominales: control, 10, 50 y 100 mgCu/Kg SS.

Ensayo J2, se evaluaron las siguientes concentraciones nominales: control, 25 y 75 mg Cu/Kg SS.

Para ambos experimentos, las concentraciones de Cu determinadas en el sedimento adicionado se mantuvieron estables durante el período de ensayo, lo que confirma que el nivel de exposición al tóxico fue casi constante. Al igual que en los ensayos con sedimento procesado, las mismas fueron expresadas como concentraciones efectivas (CE= Cu adicionado - Cu control).

Ensayo J1

En el sedimento de la muestra utilizada se determinó el total de materia orgánica (4,9 %), humedad (48%), relación PS/PH (0,52) y granulometría (arena: 47%; limo: 17% y arcilla: 36%).

Los parámetros fisicoquímicos y la concentración de Cu en agua sobrenadante (OW) para los distintos tratamientos a tiempo inicial y final de ensayo y los porcentajes de sobrevivencia por tratamiento se muestran en la Tabla 6.16.

Concentración Nominal	Control		10 mgCu/Kg SS		50 mgCu/Kg SS		100 mgCu/Kg SS	
Sedimento	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (mg/Kg)	13,5	14,1	15,1	19,9	53,8	49,7	95,5	106,6
CE	0		3,7		38		87,3	
Agua sobrenadante	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (µg/L)	--	<50	--	<50	--	<50	--	<50
pH	7,5	9,0±0,2	7,2	8,7±0,2	7,0	8,7±0,3	7,1	8,5±0,2
OD (mg/L)	7,5	9,0±0,2	7,2	8,7±0,2	7,0	8,7±0,3	7,1	8,5±0,2
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	90±10	102	110±10	100	100±20	90	120±10
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	--	0,1±0,0	--	0,1±0,0	--	0,1±0,5	--	0,1±0,1
Supervivencia (%)	--	96	--	88	--	92	--	75

Tabla 6.16: Parámetros fisicoquímicos (n=1-5), concentraciones efectivas de cobre en OW (n=1) y porcentaje de supervivencia de juveniles de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimento completo adicionado. Valores expresados como media ± DS. CE: concentración efectiva (Cu adicionado - Cu control).

En relación a los parámetros fisicoquímicos, en todos los tratamientos se registró un aumento del pH a tiempo final de ensayo. La dureza se mantuvo relativamente constante a excepción del tratamiento correspondiente a 87,3 mgCu/Kg SS que mostró un leve aumento a tiempo final. Probablemente este efecto se deba a la liberación de sales y electrolitos inicialmente presentes en el sedimento. Se observó un aumento en la concentración de OD a tiempo final de exposición probablemente relacionada con actividad microbiana del sedimento. En este sentido la presencia de algas, registrada por examen microscópico del sedimento podría sugerir que el aumento del OD se debió a actividad fotosintética. El nitrógeno amoniacal, presentó valores similares a tiempo final entre todos los tratamientos.

Sólo los anfípodos expuestos a 87,3 mgCu/kg SS mostraron una disminución significativa en la supervivencia en comparación con el control (Tabla 6.16).

Los resultados de crecimiento, tanto en longitud como en biomasa, se encuentran en la Tabla 60 del Anexo I.

La longitud de los grupos control y tratados (expuestos a 3,7 y 38 mgCu/Kg SS) mostró un aumento significativo de entre 17% y 18% con respecto al grupo inicial, mientras que en los anfípodos expuestos a 87,3 mgCu/Kg SS se observó una disminución significativa en la tasa de crecimiento, con un aumento en la longitud de sólo 2,7% con respecto del tiempo inicial (Anexo I Tabla 61).

La biomasa del grupo de control y la de los grupos tratados con 3,7 y 38 mgCu/Kg SS aumentó entre 70% y 90% con respecto al grupo inicial, mientras que la del grupo expuesto a 87,3 mgCu/Kg SS aumentó un 50%. A pesar de que no se realizó una prueba estadística debido a que la determinación del peso seco se realizó por tratamiento (n=1), estos resultados indican una importante inhibición de crecimiento en el grupo expuesto a 87,3 mgCu/Kg SS.

Ensayo J2

El sedimento de la muestra utilizada se caracterizó por el total de materia orgánica (5,3 %), humedad (48,3%), relación PS/PH (0,52) y granulometría (arena: 47%; limo: 17% y arcilla: 36%).

Los parámetros fisicoquímicos para los distintos tratamientos a tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 6.17.

Concentración Nominal	Control		25 mgCu/Kg SS		75 mgCu/Kg SS	
Sedimento	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (mg/Kg)	4	4	23	27	74	76
CE	0		21		71	
Agua sobrenadante	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>	<i>Ti</i>	<i>Tf</i>
Cu medido (µg/L)	--	--	--	--	--	--
pH	8,0±0,2	9,3±0,1	7,9±0,2	9,4±0,2	7,7±0,1	8,4±0,1
OD (mg/L)	7,0±0,5	9,6±0,9	6,8±0,4	14,7±2,5	6,7±0,3	7,5±0,1
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90±0	140±10	90±10	110±10	90±0	140±20
Conduct. (µS/cm)	433±32	601±33	430±35	546±16	408±8	594±7
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	1,4±0,1	0,2±0,1	1,5±0,3	0,1±0,0	1,1±0,1	1,2±0,5
Supervivencia (%)	--	100±0	--	98±4	--	100±0

Tabla 6.17: Parámetros fisicoquímicos determinados a tiempo inicial (Ti) y final (TF) en OW (n=5), y porcentaje de supervivencia de juveniles de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimento completo adicionado. Valores expresados como media ± DS. CE: concentración efectiva (Cu adicionado - Cu control).

La lectura de la tabla 6.17 permite observar un aumento de OD en controles y en el grupo de 21 mgCu/Kg SS, en tanto que la concentración de amonio disminuyó marcadamente. Al igual que en el ensayo J1, se determinó presencia de algas en el

sedimento mediante análisis microscópico. Estos parámetros no registraron diferencias en el grupo de mayor concentración (71 mgCu/Kg SS). En todos los tratamientos hubo un aumento de la conductividad, la dureza y el pH, lo que podría atribuirse a la resuspensión de sales y electrolitos contenidos inicialmente en el sedimento.

No se registraron efectos sobre la sobrevivencia por exposición a Cu (Anexo I Tabla 63). Sin embargo el crecimiento disminuyó de manera significativa tanto en longitud como en peso (biomasa). Los resultados de crecimiento se encuentran en la Tabla 62 del Anexo I.

El grupo control incrementó su longitud un 12% en relación al tiempo inicial, en tanto que en los individuos expuestos a 21 y 71 mgCu/Kg SS el incremento fue de aproximadamente un 6%, no diferenciándose del grupo inicial (Tabla 65 Anexo I).

En cuanto a la biomasa, en los tres grupos se observó un aumento con respecto al tiempo inicial. Sin embargo, mientras que en el grupo control los individuos duplicaron su peso seco, en el grupo expuesto a 71 mgCu/Kg SS solo lo hicieron en aproximadamente un 50% (Tabla 64 Anexo I).

Con el objetivo de observar los resultados de ambos ensayos de manera integrada, se relativizó la longitud y biomasa de los animales expuestos a cada tratamiento a su respectivo grupo control (Fig. 6.15). La longitud se vio afectada únicamente en los individuos expuestos a 87,3 mgCu/Kg SS, donde el crecimiento de los anfípodos tratados fue un 13% menor que en el grupo control. En cuanto a la biomasa, el incremento en peso de los animales expuestos a 71 y 87,3 mgCu/Kg SS fue un 21% y 23% menor que sus respectivos grupos controles (Tablas 64 y 65 Anexo I).

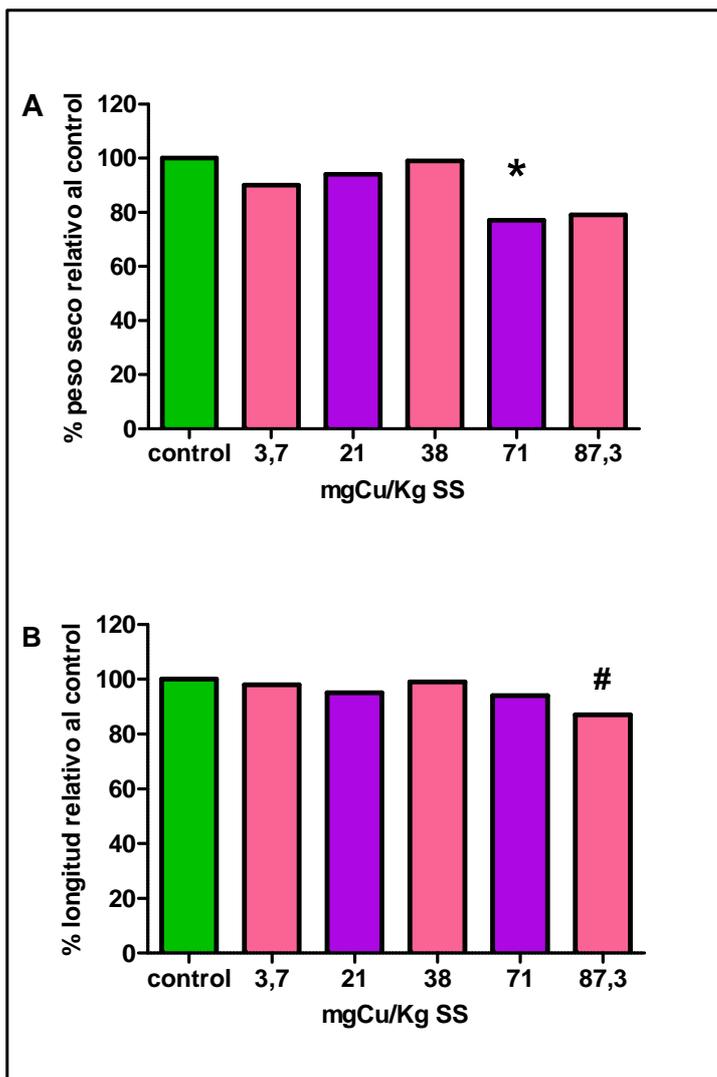


Fig. 6.15. Valores como porcentaje relativo al grupo control del peso (A) y la longitud (B) de juveniles de *H. pseudoazteca* expuestos a diferentes concentraciones de Cu en sedimento completo.

*: indica diferencias significativas con el grupo control y 21 mgCu/Kg SS

#: indica diferencias significativas con el grupo control, 3,7 mgCu/Kg SS y 38 mgCu/Kg SS

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

6.5 Discusión

De acuerdo a las recomendaciones de Agencia Ambiental de Canadá (EC, 1995) un sedimento control es esencialmente aquel en el que la especie de ensayo sobrevive en los controles experimentales. El mismo puede ser colectado en cualquier área no contaminada y debe satisfacer los requerimientos del tamaño de grano para la especie *test*. A su vez, deben determinarse las propiedades fisicoquímicas y niveles basales de los elementos traza de interés. En muchas ocasiones el sitio de recolección es el mismo en el cual los organismos *test* son encontrados. De acuerdo a la información química, el sedimento del arroyo Las Flores puede caracterizarse como no poluido en relación a los Niveles Guía de Calidad de Sedimentos (SGQs) (Mac Donald *et al.*, 2000).

La identificación de efecto tóxico causado por un metal pesado mediante la técnica de adición al sedimento es un método relativamente robusto, puesto que si no hay cambios con respecto al control es razonable asumir que el elemento agregado al sedimento no causó toxicidad; por el contrario, si se produce un incremento de la toxicidad indudablemente se debe al metal adicionado (Borgmann, 2000).

Este estudio presenta los primeros resultados de efecto de exposición a Cd y Cu adicionados a sedimentos procesados o frescos, procedentes de sitios no contaminados, en dos especies de anfípodo de agua dulce del hemisferio sur.

Según el análisis granulométrico, el sedimento procesado del arroyo Las Flores presentó un alto porcentaje de arena y en base a su composición se lo puede clasificar como sedimento franco arenoso (MESL, 2001); su elevado contenido de materia orgánica (aproximadamente 7%), se puede relacionar con la alta densidad de plantas acuáticas halladas en el sector de muestreo y la vegetación terrestre que se encuentra en las orillas. Las concentraciones de Cu y Cd en el sedimento (4 mgCu/Kg SS y <0,5 mgCd/Kg SS, respectivamente) fueron inferiores a los SQGs. En particular el nivel de Cu se encontró dentro del rango esperado para materiales típicos de la corteza terrestre (Frink, 1996). Por lo tanto, el sedimento del arroyo Las Flores pudo utilizarse como control en protocolos de bioensayos de sedimentos adicionados con estos metales como tóxicos referentes.

CADMIO

Hyalella curvispina

Con excepción del amonio, los parámetros de calidad del agua sobrenadante estuvieron dentro del rango aceptable para condiciones de bioensayos estándar (USEPA, 2000; EC, 2013). Los valores promedio de pH registrados se encontraron entre 8,3 y 8,9. La concentración de OD estuvo siempre por encima de los niveles mínimos recomendados y se observó una escasa variación en la dureza y la conductividad. En general, los parámetros mencionados no presentaron variaciones entre tratamientos. En relación al nitrógeno amoniacal, en ambos ensayos la concentración a tiempo inicial fue más elevada que a tiempo final. A pesar de la

variabilidad observada, los valores de N-NH_4^+ determinados se encontraron dentro del rango de tolerancia de *H. curvispina* (ítem 4.4, capítulo 4 y Anexo II).

Sobrevivencia y Crecimiento

En juveniles (J) de *H. curvispina* (Ensayo Cd-1) expuestos al metal por 10 días la sobrevivencia y la longitud no se vieron afectadas; sólo los animales expuestos a la mayor concentración de ensayo (5,6 mgCd/Kg SS) mostraron una reducción de aproximadamente el 20% de la biomasa. En el caso de los adultos (Mm; Ensayo Cd-2) ninguno de estos parámetros se vio afectado por la presencia del metal. A su vez, para J el IMC mostró diferencias significativas entre el grupo expuesto a la mayor concentración de Cd y el resto de los tratamientos, siguiendo el mismo patrón que la biomasa; pero en el caso de los de los Mm, en contraste a lo observado con la longitud y biomasa evaluadas por separado, el IMC indicó diferencias entre el grupo control y los anfípodos expuestos a la mayor concentración de Cd (Figs. 6.4 y 6.5). Por lo tanto el IMC permitió determinar efecto sobre los Mm a 6,2 mg/Kg SS. Para individuos de *H. azteca* expuestos durante 28 días a sedimentos adicionados con cadmio, Milani *et al.* (2003) reportaron que la CL50 fue de 33 mgCd/Kg, mientras que la concentración que resultó en un 25% de inhibición del crecimiento fue 10 mgCd/Kg. Estos resultados podrían suponer una menor sensibilidad de *H. azteca* al Cd en relación a *H. curvispina*, sin embargo, la comparación de la toxicidad de metales en sedimentos contaminados es dificultosa fundamentalmente debido a las diferencias entre los sedimentos utilizados, ej: granulometría, TOC y AVS, entre otros parámetros relevantes del equilibrio de partición y la toxicidad potencial de metales en sedimentos. En este sentido, debe considerarse que la composición granulométrica usada por Milani *et al.* (2003) contenía una proporción más baja de arena que la utilizada en este estudio, lo que posibilitaría la reducción de la disponibilidad del metal para los animales.

Concentración de Cd en tejidos

Para metales no esenciales y no regulados, la expresión de la toxicidad sobre la base de la carga corporal ha sido con frecuencia mejor indicador de efectos biológicos que el uso de la concentración del metal en sedimento (Borgmann, 2000).

La incorporación de Cd en *H. curvispina* fue concentración dependiente y cuantitativamente más baja en los ensayos con sedimentos comparados con los realizados en medio acuoso. Teniendo en cuenta que no hubo incorporación de Cd desde el agua sobrenadante (ver Tablas 6.4 y 6.5), debe considerarse que la ruta de entrada del metal fue desde el sedimento y además fue significativamente más baja que desde la matriz acuosa (Figura 5.6, capítulo 5). Tanto para J como para Mm en los ensayos realizados en medio acuoso, los animales expuestos a la menor concentración de Cd (2,5 µgCd/L (J) y 2 µgCd/L (Mm)), acumularon 4 veces más metal en tejidos que los ensayados a la mayor concentración de Cd en sedimento (5,6 mg/Kg SS y 6,2 mg/Kg SS, para J y Mm, respectivamente). Por lo tanto, el menor incremento en biomasa registrado en los J expuestos a 5,6 mgCd/Kg SS y los efectos observados sobre el IMC tanto para J como para Mm (Figs. 6.4 A y 6.5 C), podrían ser consecuencia de otros factores como la disminución de la alimentación, el aumento de heces y la interrupción del proceso de muda (Borgmann & Norwood 1997) y no del metal acumulado en tejido. Bat *et al.* (1998) ha sugerido que la presencia de sedimento puede reducir la cantidad del metal disponible para los animales, dado que puede ligarse a materia orgánica o al sedimento mismo. En este estudio teniendo en cuenta que la incorporación de Cd fue significativamente menor en animales en el ensayo con matriz sólida en relación al ensayo de matriz acuosa, la elevada capacidad adsorptiva del sedimento utilizado y que la concentración de Cd en el agua sobrenadante fue no detectable, es probable que gran parte del cadmio no haya estado biodisponible.

Por último, en concordancia con los resultados obtenidos en los experimentos realizados en medio acuoso, en los ensayos con sedimento adicionado los juveniles de *H. curvispina* incorporaron una mayor concentración de Cd en tejidos que los machos.

COBRE

Hyaella curvispina* y *Hyaella pseudoazteca

Al igual que en los ensayos realizados con Cd, en general los parámetros de calidad del agua se mantuvieron constantes y dentro del rango aceptable para bioensayos estándar a lo largo de los experimentos (USEPA, 2000; EC, 2013). Los valores de pH, OD, dureza y conductividad se mantuvieron constantes entre concentraciones y

tratamientos durante el tiempo de exposición. Sólo en los experimentos Cu-1 y Cu-2 se observó un incremento en la dureza y la conductividad a tiempo final de ensayo en todos los tratamientos, lo cual este probablemente asociado a la actividad biológica en el sistema o a la disolución de componentes de la matriz sólida a lo largo del tiempo de exposición. Con respecto al nitrógeno amoniacal, en todos los experimentos se observó el mismo efecto que en los ensayos con Cd, siendo el N-NH₄⁺ más elevado a tiempo inicial de ensayo en relación al tiempo final. A pesar de la variabilidad observada, los valores de N-NH₄⁺ determinados se encontraron dentro del rango de tolerancia de *H. curvispina* (ítem 4.4, capítulo 4 y Anexo II).

En los ensayos realizados con agua de poro, el OD se mantuvo por encima de los niveles aceptables establecidos por USEPA (2000), el pH fue moderadamente más elevado en el tratamiento con agua de poro en relación al control y se mantuvo constante durante el tiempo de exposición. Sin embargo, el nitrógeno amoniacal, y en particular la dureza y la conductividad, fueron marcadamente mayores en el tratamiento con agua de poro, lo cual indudablemente está asociado a las características propias de la matriz de ensayo.

Sobrevivencia y Crecimiento

La sensibilidad de las especies a sedimentos contaminados puede depender del comportamiento de los organismos (comportamiento de excavación, filtración y tasas de alimentación), rutas de exposición al metal (agua de poro, sedimento, alimento), particularidades fisiológicas de los organismos (asimilación del metal y efecto tóxico) y etapa del ciclo de vida (juveniles, adultos) (King *et al.*, 2006).

En la evaluación de toxicidad de contaminantes asociada a sedimentos de fondo, se pueden realizar bioensayos de toxicidad en fase acuosa (p. ej: agua de poro, lixiviados, elutriados) o sobre el sedimento completo. En los ensayos realizados en el presente trabajo no se observaron efectos letales ni subletales por exposición de juveniles y adultos de *H. curvispina* a agua de poro extraída de los sedimentos adicionados con Cu. Contrariamente se determinaron efectos subletales sobre machos de esta especie (desde 94 mgCu/Kg SS) en el ensayo realizado con sedimento completo. Por lo tanto, los bioensayos utilizando esta matriz suelen ser la opción más adecuada para anfípodos, debido a que mediante el uso de estas pruebas es posible abordar adecuadamente todas las vías de exposición (sedimento, agua de poro y agua sobrenadante) (ECB, 2003).

Para *H. pseudoazteca* si bien no hubo efecto sobre la supervivencia para ambos estadios evaluados, los anfípodos más jóvenes fueron más sensibles que los machos en relación a los parámetros de crecimiento. Mientras que sólo hubo una disminución en la biomasa de los machos expuestos a 205 mg/Kg SS en relación al control, en los juveniles expuestos a 110 mg/Kg SS se observó una disminución del IMC indicando un efecto negativo por exposición al metal sobre el estado general de los animales. A su vez, en juveniles ensayados a 205 mg/Kg SS el efecto del Cu fue determinado en los tres parámetros evaluados en relación al control (biomasa, longitud e IMC).

Borgmann & Norwood (1997) reportaron para *H. azteca* expuesta durante cuatro semanas a concentraciones de 74 a 300 mgCu/Kg SS, y para ensayos con sedimentos adicionados con cobre entre 74 y 1868 mg/Kg de una semana de duración, porcentajes de sobrevivencia mayores al 90%. Estos autores observaron efectos sobre el crecimiento a partir de una concentración de 363 mg/Kg en animales expuestos por cuatro semanas. Para la misma especie Milani *et al.* (2003) en exposición crónica a cobre en un sistema de sedimento adicionado reportaron una CL50 de 128 mgCu/Kg y efectos sobre el crecimiento, expresado como concentración inhibitoria 25%, a 76 mgCu/Kg. Román *et al.* (2007) evaluaron efectos letales (CL50) y subletales sobre cinco especies de organismos bentónicos expuestos a sedimentos adicionados con Cu. Particularmente en anfípodos, determinaron para *H. azteca* una CL50 de 316 mgCu/Kg (14 días de exposición) y una CE50 de 194 mgCu/Kg (28 días de exposición); mientras que para *Gammarus pulex* reportaron una CL50 de 151 mgCu/Kg y una CE50 de 148 mgCu/Kg (35 días de exposición). La CE50 fue determinada en función de efectos sobre el crecimiento para ambas especies.

La toxicidad del cobre en *H. azteca* informada por Milani *et al.* (2003) se produjo a una concentración aproximadamente 2,5 veces menor que la reportada por Román *et al.* (2007). En éste último estudio se discutió sobre el origen de las diferencias observadas, concluyendo que pudieron provenir de varios factores, incluyendo (I) poblaciones de ensayo con diferente sensibilidad inherente (II) diferencias en las propiedades del sedimento (biodisponibilidad) y (III) diferencias en la duración del ensayo, entre otros.

A pesar de las diferencias en las condiciones experimentales entre los trabajos mencionados y el nuestro, los resultados obtenidos sugieren una sensibilidad similar con *H. azteca* en cuanto a crecimiento, debido a que como se mencionó previamente se observaron efectos subletales en machos de *H. curvispina* y en juveniles de *H.*

pseudoazteca en concentraciones cercanas a 100 mg/Kg SS y en machos de *H. pseudoazteca* a 205 mg/Kg SS.

Sin embargo con los resultados obtenidos en el presente trabajo no se pudo determinar la concentración de efecto del Cu en juveniles de *H. curvispina*, sobre los parámetros tradicionales.

Concentración de Cu en tejidos

En machos de *H. curvispina* expuestos tanto a sedimentos adicionado (concentración máxima de Cu en sedimento= 200 mg/Kg SS; concentración máxima promedio de Cu en OW= 172 µg/L) como a agua de poro (concentración promedio tiempo inicial y final= 195 µg/L), los niveles de Cu acumulados en tejidos se mantuvieron prácticamente en los valores obtenidos para sus respectivos controles. Por lo tanto, para este estadio en el rango de concentraciones ensayadas habría una aparente regulación del Cu, y el efecto subletal observado sería independiente de la carga corporal del metal. Comparativamente, al igual que en los ensayos realizados con Cd, se observó una mayor incorporación del metal desde la matriz acuosa (132% de incremento de Cu en relación al control, a una concentración de exposición de 101 µg/L; Fig. 5.11, capítulo 5), en relación a la matriz sólida. Debe considerarse que el modo de toxicidad de los metales asimilados a través de vías de absorción intestinal (partículas) puede ser bastante diferente de los que se producen debido a la absorción por branquias o superficies del cuerpo (disuelto) (King *et al.*, 2005).

Al igual que los resultados obtenidos con machos de *H. curvispina*, Borgmann & Norwood, (1997) reportaron que la acumulación de Cu en adultos de *H. azteca* expuestos a sedimentos adicionados fue diferente de la observada en ensayos realizados en medio acuoso. Estos autores informaron que la carga corporal de Cu en *H. azteca* fue independiente de la concentración de Cu en sedimento entre 74 y 1116 mgCu/Kg SS, presentando una concentración de Cu en tejidos promedio de aproximadamente 150 µgCu/g PS. Los anfípodos acumularon Cu del sedimento, aún desde el sedimento control, pero el ingreso pareció estar regulado de alguna forma hasta que el metal en sedimento excedió los 1116 mgCu/Kg SS. Sin embargo, se observó toxicidad crónica a 1116 mgCu/Kg luego de 4 semanas de exposición, aún cuando el Cu en tejido en los animales expuestos a este tratamiento no fue significativamente más elevado que los valores registrados en los anfípodos control. El crecimiento fue un punto final más sensible que la sobrevivencia. Una reducción sustancial del crecimiento ocurrió a 363 mgCu/Kg SS aún cuando no se detectó

mortalidad crónica a esa concentración. Cabe destacar que la tasa de reducción del crecimiento observada en sedimentos adicionados con Cu no fue evidenciada en estudios previos realizados por Borgmann *et al.* (1993) con *H. azteca* en agua adicionada con este metal. La causa de la reducción del crecimiento y la aparente regulación del Cu a bajas concentraciones del metal en sedimento no es conocida. Los autores plantean la posibilidad de que el metal en sedimento inhiba la alimentación de *H. azteca*, llevando a la reducción del crecimiento. Esto también puede llevar a la disminución de la captación de Cu de los alimentos con el aumento de Cu en el sedimento, resultando en una aparente regulación de la carga corporal de Cu hasta el punto que esta regulación se interrumpe y la reducción en la alimentación ya no puede controlar la captación de Cu. Independientemente de si el mecanismo propuesto es correcto, Borgmann & Norwood (1997) proponen la reducción en el crecimiento en sedimentos adicionados con Cu como una característica importante para su uso en la identificación de toxicidad por este metal.

En juveniles de *H. curvispina* expuestos a sedimentos adicionados si bien se observó una incorporación del metal en tejidos, la misma no fue dependiente de la concentración de exposición (51% y un 38% para 111 mg/Kg SS (OW promedio= 73 µg/L) y 224 (OW promedio= 125 µg/L), respectivamente). También se observó un incremento significativo (92%) de la concentración de Cu en tejido en los anfípodos expuestos a agua de poro (concentración promedio tiempo inicial y final= 165 µg/L) en relación al control. A pesar de los aumentos registrados en la carga corporal del metal, no se observaron efectos letales ni subletales sobre los organismos de ensayo.

En relación a los estadios evaluados de *H. curvispina* expuestos a sedimentos adicionados con Cu y agua de poro proveniente de los mismos, en general se determinó una mayor incorporación del metal en tejidos en individuos juveniles en relación a los adultos. El mismo efecto fue observado en los bioensayos realizados con Cd.

En machos de *H. pseudoazteca* la concentración de Cu en tejido de los animales expuestos al metal incrementó un 30% y un 55% (para 110 y 205 µg/Kg SS, respectivamente) en relación a los niveles del control. Comparativamente y expresado como incremento de la concentración de Cu como porcentaje del control, a concentraciones similares de Cu adicionado en sedimento y bajo las mismas condiciones experimentales, machos de *H. pseudoazteca* presentaron una mayor carga corporal del metal que individuos de *H. curvispina* del mismo estadio.

Sedimento Completo

En cuanto a la caracterización del sedimento proveniente del arroyo las Flores, la humedad se halló dentro del rango habitual en este sitio con un nivel relativamente elevado de materia orgánica (MO). La diferencia en el porcentaje de MO con respecto a los ensayos con sedimento procesado, probablemente este asociado a la época del año en que se realizó la recolección del material. La composición granulométrica indicó que se trata de un sedimento arcillo arenoso (Folk, 1954), con potencialidad para la retención de metales pesados. Cabe destacar que el sedimento procesado presentó un mayor porcentaje de arena y menor porcentaje de arcilla que el sedimento fresco. La potencialidad para la retención de metales pesados puede evidenciarse en la menor concentración de Cu en agua sobrenadante determinada en el ensayo con sedimento fresco (J1) en relación al procesado (Cu-3).

Probablemente el uso de sedimento fresco como matriz sólida control es ecológicamente más relevante, pero puede ofrecer la desventaja de incluir el efecto potencial de la presencia de organismos indígenas en los resultados de la prueba (Reynoldson *et al.*, 1994). Además, como se mencionó en el capítulo 1, los sedimentos colectados en el campo pueden no ser accesibles todo el año o pueden cambiar con el almacenamiento en el laboratorio siendo muy dificultosa la estandarización de respuesta de los organismos de ensayo tanto intra como interlaboratorio.

En nuestro estudio, la presencia de organismos fotosintetizadores en las muestras evaluadas podría explicar el aumento del OD en la fase acuosa y la disminución del nivel de amonio. La variabilidad causada por esta condición, no factible de cuantificar, agrega un posible factor de incertidumbre al ensayo. En experimentos realizados con sedimento seco y rehidratado del mismo arroyo no se registró este efecto sobre el OD. Por lo tanto, los resultados de las pruebas de toxicidad de sedimento adicionados con metales pueden ser significativamente diferentes según las propiedades del sedimento utilizado.

Como se mencionó previamente, el grado de efecto de cobre en el sedimento reportado en la literatura es muy variable, posiblemente debido a las diferencias en las condiciones de ensayo y composición de la matriz, entre otros parámetros. En particular en los experimentos realizados en el presente trabajo con juveniles de *H. pseudoazteca* expuestos a sedimento completo (Ensayo J1) y procesado (Ensayo Cu-3), se observó un efecto sobre la supervivencia de los animales a 87,3 mgCu/Kg SS en la primera matriz, en tanto que no se determinó efecto sobre dicho parámetro a una

concentración 2,3 veces mayor que la anterior, cuando se empleó sedimento procesado. De todos modos, debe considerarse otra fuente de variabilidad entre los mencionados ensayos, que es el origen de los animales. Los anfípodos utilizados en J1 fueron colectados en el campo (arroyo Las Flores) y aclimatados en laboratorio, en tanto que los utilizados en el Ensayo Cu-3 provinieron de cultivos de laboratorio (*indoor*).

En el presente trabajo empleando sedimento completo como matriz de ensayo, nuestros resultados en cuanto a sobrevivencia indican que *H. pseudoazteca* resultó tener una sensibilidad mayor que *H. azteca* expuestos a intervalos de tiempo y concentraciones similares (Borgamann & Norwood, 1997; Roman *et al.*, 2007).

Esta es una primera contribución a la evaluación de toxicidad por Cu en *H. pseudoazteca* utilizando sedimento completo.

6.6 Conclusiones

- ✓ En el presente trabajo se determinaron efectos tóxicos del Cd sobre juveniles y machos de *H. curvispina* en concentraciones cercanas al PEC (4,98 mgCd/Kg SS). El Cu adicionado al sedimento del arroyo Las Flores ejerció efecto tóxico sobre juveniles de *H. pseudoazteca* (expuestos tanto a sedimento procesado como completo) a valores intermedios entre el TET (86 mgCu/Kg) y el SEL (110 mgCu/Kg) y por debajo del PEC (149 mgCu/Kg). En el caso de los machos de ambas especies, el efecto por exposición a Cu fue observado a concentraciones cercanas al PEL (197 mgCu/Kg) (MacDonald, 2000; Burton, 2002). A las concentraciones ensayadas no se registraron efectos sobre individuos juveniles de *H. curvispina*, lo que indicaría que esta especie en este estadio estaría protegida aún a los niveles de referencia más altos antes mencionados. Sin embargo, incorporó cantidades elevadas de Cu en tejidos, por lo que deben considerarse potenciales procesos de transferencia a través de la cadena alimentaria a niveles tróficos superiores.
- ✓ Este trabajo provee información sobre efectos toxicológicos del Cd y el Cu adicionados a sedimentos, en dos especies nativas de la región Pampeana en Argentina, y contribuye a validar de manera interina el uso en esta región de los SQGs para ambos metales, desarrollados en el hemisferio norte. A su vez,

bajo las condiciones experimentales ambas especies probaron ser sensibles a concentraciones de Cd y Cu determinadas dentro de su área de distribución.

- ✓ Esta es una primera contribución a la evaluación de toxicidad por metales con *H. pseudoazteca*. Bajo nuestras condiciones experimentales esta especie resultó sensible al Cu adicionado al sedimento control.

- ✓ Al igual que los resultados obtenidos en los ensayos en matriz acuosa, el IMC resultó un parámetro evaluador de efecto subletal útil, ya que en muchos casos permitió una mejor discriminación entre tratamientos en relación a los restantes parámetros de crecimiento determinados.

CAPITULO 7

DESARROLLO DE NUEVOS PUNTOS FINALES PARA ENSAYOS CON ANFÍPODOS

7.1 Introducción

Como fue mencionado en capítulos anteriores, los protocolos estandarizados con anfípodos evalúan comúnmente efectos sobre el crecimiento y la mortalidad (Burton *et al.*, 1996; USEPA, 2000), asumiendo que la ausencia de efecto indica que se trata de un medio ecológicamente aceptable. Sin embargo, es prioritario desarrollar protocolos de prueba que incorporen puntos finales de efecto temprano que permitan reducir la brecha existente entre resultados de laboratorio y de campo. En años recientes la atención ha sido enfocada en el uso de parámetros fisiológicos y bioquímicos como indicadores de estrés tóxico a través de exposiciones de especies prueba a diferentes contaminantes (Correia *et al.*, 2002; Barata *et al.*, 2004; De Cohen & Janssen, 2007; Dutra *et al.*, 2007, 2008; Sroda & Cossu-Leguille, 2011). La significancia ecológica de estos parámetros está basada sobre el hecho que exposiciones cortas a diferentes contaminantes pueden tener efectos a largo plazo sobre el ciclo de vida de los organismos aun cuando los contaminantes no son persistentes en el medio ambiente (Achiorno *et al.*, 2010).

Como parámetros ecofisiológicos a considerar como puntos finales de efecto (y/o como variables indirectas que modifican el efecto) cabe mencionar aquellos vinculados con el metabolismo intermediario y energético de los animales. El costo de los procesos metabólicos necesarios para compensar el efecto de una sustancia tóxica puede modificar el patrón de asignación de energía fisiológica de un organismo. Por lo tanto, los puntos finales clásicos utilizados en las pruebas de ecotoxicidad pueden, en última instancia, reflejar cambios en el metabolismo energético de los individuos (Servia *et al.*, 2006).

En crustáceos, el estudio del metabolismo intermediario ha demostrado poseer enorme variabilidad inter e intra específica. Esta variabilidad puede ser el resultado de

múltiples factores, como el hábitat, la etapa del ciclo de muda, la madurez sexual, el sexo, el estado nutricional, la dieta y la estacionalidad. Estos factores determinan un patrón diferencial de respuesta metabólica que dará lugar a cambios comportamentales, fisiológicos, y bioquímicos (Oliveira *et al.*, 2007; Funck *et al.*, 2013; Vellinger *et al.*, 2013). En este sentido, Dutra *et al.* (2008, 2011) refirió alteraciones en el metabolismo intermediario en ejemplares de *Hyalellas* expuestos a carbofuran y glifosato.

Entre los posibles biomarcadores metabólicos de estrés, la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) no es ampliamente utilizada. El ETS es un complejo multienzima localizado en la membrana interna de las mitocondrias. Este complejo contiene flavoproteínas, metaloproteínas y citocromos que se encuentran organizados en un sistema bioquímico redox que transporta electrones desde las coenzimas NADH, NADPH y succinato, provenientes del ciclo de Krebs, hasta el aceptor terminal de electrones (O_2). Su actividad indica la cantidad de oxígeno consumido que habría de ocurrir si todas las enzimas funcionan al máximo. El ensayo de ETS fue propuesto por primera vez por Packard (1971), y ha sido desde entonces modificado y mejorado por varios autores, se ha demostrado útil para estimar la actividad metabólica de diferentes organismos como microplancton (Devol & Packard, 1978), zooplancton (Owens & King, 1975; Borgmann, 1978, Simčić & Brancelj, 2001), especies de la macrofauna bentónica (Cammen *et al.*, 1990), sedimentos (Simcic & Brancelj, 2002) y biofilms (Blenkinsopp *et al.* 1991).

Entre los biomarcadores bioquímicos más comúnmente utilizados se hallan los relacionados con estrés oxidativo. Una vía general de toxicidad inducida por muchos contaminantes químicos está relacionada con su capacidad para catalizar reacciones oxidativas, que llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) (tales como el radical superóxido ($O_2^- \bullet$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH\bullet$)), causando estrés oxidativo (Timbrell, 2009). Estas EROS, mediante una reacción en cadena y su capacidad de oxidar, reaccionan principalmente con macromoléculas, pueden oxidar las proteínas, los lípidos (mediante la peroxidación lipídica) y los ácidos nucleicos. También, pueden inactivar a las enzimas antioxidantes conduciendo a daños en el ADN, en la estructura celular o incluso llevar a la muerte celular (Van der Oost *et al.*, 2003; Alti & Canli, 2010).

Por otro lado, en las células sanas, las especies reactivas de oxígeno son detoxificadas por los sistemas de defensa antioxidante de los organismos. Estos

incluyen atrapadores de bajo peso molecular (no enzimáticos) de radicales libres y enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) entre otras, que tienden a inhibir la formación de agentes prooxidantes (Van der Oost *et al.*, 2003; Ochoa & González, 2008). La SOD es una metaloproteína que cataliza la conversión del anión superóxido reactivo a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), constituyendo la primera defensa contra el efecto tóxico del oxígeno en los organismos aeróbicos. El H_2O_2 es subsecuentemente detoxificado por la catalasa y la glutatión peroxidasa. La catalasa está asociada a los peroxisomas y reduce el H_2O_2 , a oxígeno molecular (O_2) y agua (Livingstone, 2003).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la toxicidad celular inducida por Cu, incluyendo la capacidad de los iones libres de Cu a participar en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Gaetke & Chow, 2003; Pourahmad *et al.*, 2003). El Cu puede actuar como un catalizador para las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, facilitando la conversión del anión superóxido y peróxido de hidrógeno a radical hidroxilo, una especie con frecuencia propuesta como iniciadora de la peroxidación lipídica (Stohs & Bagghi, 1995; Furuno *et al.*, 1996).

Algunos estudios han relacionado la toxicidad del Cd a la generación de estrés oxidativo (Stohs & Bagghi, 1995; Sandrini *et al.*, 2006). Sin embargo, a diferencia del Cu, el Cd no es un metal oxidante y por lo tanto no puede generar EROS a través de reacciones de Haber-Weiss y Fenton, pero puede inhibir la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias ligándose entre la semiubiquinona y el citocromo B566, lo que finalmente resulta en la generación de EROS (Wang *et al.*, 2004). Por otra parte, muchos estudios han atribuido la generación de EROS luego de la exposición a Cd a la interferencia de este metal en el sistema celular de defensa antioxidante (Stohs & Bagghi, 1995; Waisberg *et al.*, 2003; Sandrini *et al.*, 2008).

La enzima Na^+/K^+ ATPasa utiliza la energía derivada de la hidrólisis del ATP para bombear fuera de la célula 3 Na^+ transfiriendo 2 K^+ de la parte externa al citosol; siendo un instrumento fundamental para restaurar el gradiente iónico en las células nerviosas luego de períodos de actividad eléctrica como impulsos nerviosos y potencial sináptico (Shepherd, 1994). La Na^+/K^+ ATPasa ejerce un papel crucial en el mantenimiento de gradientes iónicos celulares y entre el medio interno (animal) y el ambiente, siendo fundamental para el equilibrio osmótico. Las ATPasas desempeñan un papel crucial en funciones intracelulares y en todos los tipos de actividades fisiológicas y se ha utilizado como un indicador sensible de la toxicidad de metales pesados (de la Torre *et al.*, 1999). Se ha informado que productos de la peroxidación

lipídica interrumpen la homeostasis de iones neuronales, alterando actividad de las ATPasas de membrana, tales como la Na⁺/K⁺ ATPasa (Keller *et al*, 1997; Mark *et al*, 1997).

Los biomarcadores bioquímicos de uso común en ecotoxicología rara vez consideran el estado energético de los animales expuestos, o la influencia que podrían tener en las determinaciones. En este sentido, hay pocos estudios que consideran la evaluación simultánea de la condición fisiológica de los animales (De Coen & Janssens, 2003; Sroda & Cossu-Leguille, 2011).

El presente capítulo pretende proporcionar un criterio sensible para la evaluación de los efectos ecotoxicológicos tempranos de Cu y Cd en ensayos de laboratorio en *Hyalella curvispina*. Este trabajo representa una primera contribución de la evaluación del efecto de dos metales pesados sobre algunos parámetros de estrés oxidativo y metabolismo energético en esta especie nativa.

7.2 Objetivo

Evaluar el estado fisiológico, bioquímico y energético de los animales expuestos a Cu y Cd en matriz sólida y acuosa a concentraciones subletales, utilizando los siguientes puntos finales de efecto temprano: contenido de glucógeno, proteínas totales, lípidos totales, triglicéridos, arginina fosfato, niveles de peroxidación lipídica (TBARS) y actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa, catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y del sistema de transporte de electrones (ETS).

7.3 Materiales y Métodos

Los ensayos detallados en el presente capítulo fueron realizados con anfípodos silvestres (ítem 3.1.2, capítulo 3). Los individuos de *H. curvispina* (machos mayores) fueron recolectados en el arroyo Las Flores durante la primavera de 2010.

El modo de recolección de los animales, su traslado al laboratorio y la aclimatación de los mismos fueron detallados en el ítem 4.2 del capítulo 4.

Se realizaron dos series de experimentos: un ensayo en matriz acuosa y otro con sedimento adicionado. En ambos casos, los animales fueron expuestos a

concentraciones subletales de Cu y Cd, con sus correspondientes controles negativos contemporáneos.

7.3.1 Ensayo en matriz acuosa

Las concentraciones nominales ensayadas fueron: 100 µgCu/L, 150 µgCu/L, 10 µgCd/L y 20 µgCd/L. El control se realizó en agua de dilución (MHW).

El ensayo fue realizado bajo las condiciones experimentales y metodológicas detalladas en los ítems 3.3 y 3.5.1.2 del capítulo 3. A cada réplica se le agregó 500 ml de la solución correspondiente y una pieza de gasa de 10 cm² como sustrato.

7.3.2 Ensayo con sedimento adicionado

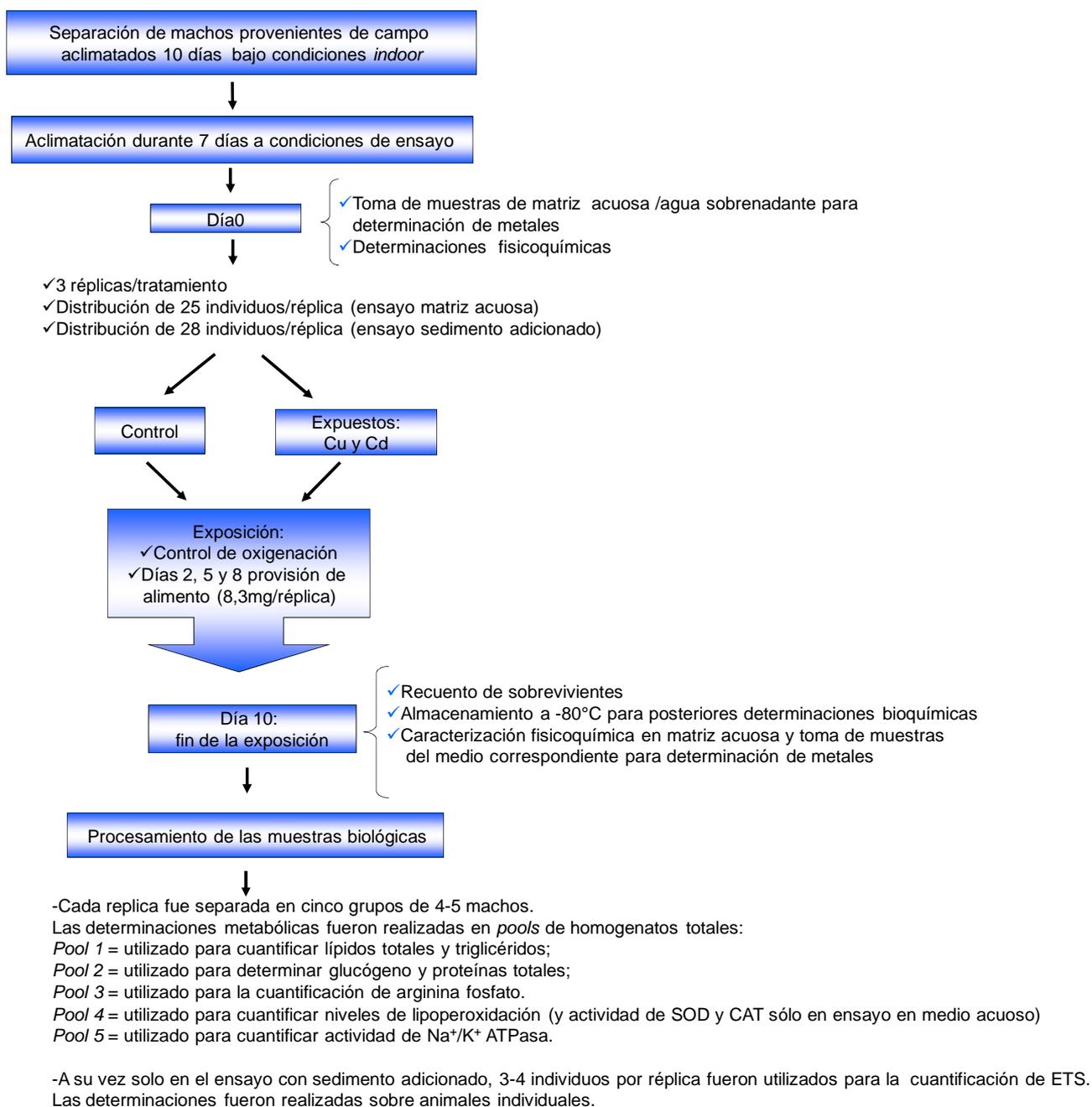
El sedimento utilizado en el ensayo es el sedimento procesado del arroyo Las Flores (ver ítem 3.5.2.2 del capítulo 3).

Las concentraciones nominales ensayadas fueron: 100 mgCu/Kg SS, 200 mgCu/Kg SS, 4 mgCd/Kg SS y 8 mgCd/Kg SS.

El ensayo fue realizado bajo las condiciones experimentales y metodológicas detalladas en los ítems 3.3 y 3.5.2.3 del capítulo 3. A cada réplica se le agregó una relación constante de número de animales/volumen de sedimento/volumen de agua sobrenadante, como fue especificado en el ítem 3.5.2.3 del capítulo 3.

En la Figura 7.1 se indica en forma sucinta el diseño experimental seguido.

Figura 7.1: Procedimiento experimental común para ambos ensayos.



Los puntos finales fueron determinados por triplicado mediante los métodos detallados en el ítem 3.4.2, Puntos Finales de Efecto Temprano, del capítulo 3.

7.3.3 Análisis estadístico

Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizaron las pruebas de Shapiro–Wilks y Levene, respectivamente. Para evaluar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se realizaron Análisis de la

Varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba a posteriori de Bonferroni. En los casos en que no se cumplieron los supuesto de homocedasticidad se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 2010). Se trabajó con un nivel de significancia de $p < 0,05$. Se utilizó el programa Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2012). Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar.

7.4 Resultados

7.4.1 Ensayo en matriz acuosa

Los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de Cu y Cd medidas a tiempo inicial y final de exposición, se muestran en las Tablas 7.1.

Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron estables a lo largo de los 10 días de exposición. Los mismos estuvieron dentro del rango aceptable para condiciones de bioensayo estándar, con excepción del nitrógeno amoniacal donde los niveles fueron más elevados. Si bien las concentraciones de N-NH_4^+ mostraron variabilidad entre tiempo inicial y final de ensayo, fueron parejas entre los tratamientos y estuvieron dentro del rango aceptable para la supervivencia de *H. curvispina* (ítem 4.4, capítulo 4 y Anexo II). Por lo tanto, debido a que los parámetros fisicoquímicos no presentaron variaciones entre tratamientos ni entre concentraciones, es razonable asumir que los resultados obtenidos se debieron a la exposición a Cu y Cd.

Para ambos metales se observó un importante descenso de la concentración entre el tiempo inicial y final de exposición. Esto es esperable en ensayos estáticos de exposición a metales pesados. En vista de ello y siguiendo el mismo criterio que en los capítulos anteriores, los valores de las concentraciones de ensayo fueron expresados como el valor promedio entre ambos tiempos, considerándose esta como la concentración de exposición más representativa.

Las concentraciones de Cu medidas a tiempo inicial estuvieron por encima de las nominales, indudablemente a causa del nivel de Cu detectado en la solución control (medio de dilución). En consecuencia, las concentraciones medias de exposición a Cu fueron 135 y 175 $\mu\text{gCu/L}$ para valores nominales de 100 y 150 $\mu\text{gCu/L}$ respectivamente (Tabla 7.1). Para los tratamientos con Cd las concentraciones nominales, 10 y 20 $\mu\text{gCd/L}$, fueron referidas como 6,5 y 10,5 $\mu\text{gCd/L}$, respectivamente (Tabla 7.1).

Concentración Nominal	Control		135 µgCu/L		175 µgCu/L		6,5 µgCd/L		10,5 µgCd/L	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Parámetros										
pH	7,4	8,1±0,0	8,3	8,1±0,1	7,5	8,1±0,0	7,5	8,0±0,1	7,5	7,9±0,2
OD (mg/L)	8,2	8,3±0,1	7,5	8,3±0,0	8,3	8,1±0,5	8,3	8,1±0,2	8,3	7,7±0,7
Dureza (mgCaCO ₃ /L)	90	100±0	90	100±0	90	100±0	90	100±0	90	100±10
Conduct. (µS/cm)	346	420±26	351	406±4	353	407±7	351	415±14	352	410±6
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	0	4,3±0,5	0	3,9±0,0	0	3,9±0,0	0	4,7±0,0	0	3,5±0,5
Cu medido (µg/L)	90	60	160	110	210	140	--	--	--	--
Cd medido (µg/L)	<1	<1	--	--	--	--	12	1	17	4
Supervivencia (%)	--	93,8	--	96	--	97,5	--	92	--	95

Tabla 7.1: Parámetros fisicoquímicos, concentraciones de Cu y Cd medidas en solución a tiempo inicial (Ti; n=1) y final (Tf; n=2-3) de exposición y porcentaje de supervivencia de machos de *H. curvispina* expuestos a Cu o Cd en solución. Valores expresados como media ± DS. Las concentraciones de Cu y Cd para cada tratamiento son expresadas como el valor medio entre Ti y Tf exposición. La última fila muestra los valores de supervivencia al final del período de exposición.

Bajo las condiciones experimentales, para los dos metales evaluados, no se observó mortalidad significativa en ninguna concentración de ensayo respecto del control (Tabla 7.1).

Todos los parámetros metabólicos estudiados se evaluaron confrontando los efectos de los tratamientos en relación a los valores control así como entre tratamientos. La tabla 7.2 muestra los resultados de los análisis estadísticos para todos los parámetros considerados.

Parámetros	Cobre control-135-175 µg/L	Cadmio control-6,5-10,5 µg/L
Lípidos Totales	$F_{0,05;6} = 391,7^*$	$F_{0,05;6} = 347,1^*$
Triglicéridos	$F_{0,05;6} = 300,9^*$	$F_{0,05;6} = 170,6^*$
Glucógeno	$F_{0,05;6} = 397,8^*$	$F_{0,05;6} = 734,9^*$
Proteínas Totales	$F_{0,05;6} = 150,4^*$	$F_{0,05;6} = 150,0^*$
Arginina fosfato	$F_{0,05;6} = 908,2^*$	$F_{0,05;6} = 1611^*$
SOD	$F_{0,05;6} = 48,0^*$	$F_{0,05;6} = 26,2^*$
CAT	$F_{0,05;6} = 0,14$ ns	$F_{0,05;6} = 0,50$ ns
TBARS	$F_{0,05;6} = 620,8^*$	$F_{0,05;6} = 69,5^*$
NA/K ATPasa	$F_{0,05;6} = 728,4^*$	$F_{0,05;6} = 308,2^*$

Tabla 7.2: Resumen de las significatividades estadísticas obtenidas para los parámetros evaluados en machos de *H. curvispina* expuestos a Cu o Cd en solución. Todos los parámetros cumplieron los supuestos de ANOVA de normalidad y homocedasticidad. Los valores de glucógeno y arginina fosfato para ambos metales fueron previamente transformados (\log_{10}). F: F de Fisher; *: diferencias significativas globales ($p < 0.05$); ns: ausencia de significancia estadística.

La Fig. 7.2 muestra la variación en el contenido de lípidos totales y triglicéridos para los grupos expuestos y el control. Los animales expuestos a Cu mostraron una disminución significativa en los niveles de lípidos totales en relación al grupo control del 71% y 80%, para 135 y 175 µgCu/L, respectivamente. La disminución en los niveles de triglicéridos en relación al grupo control fue concentración-dependiente, siendo 49% para 135 µgCu/L y 66% para 175 µgCu/L. Con respecto al Cd, tanto para lípidos totales como para triglicéridos, el efecto fue concentración-dependiente. En relación al grupo control, en los animales expuestos a 6,5 y 10,5 µgCd/L la reducción fue del 67% y 84% para lípidos totales y del 37% y 78% para triglicéridos.

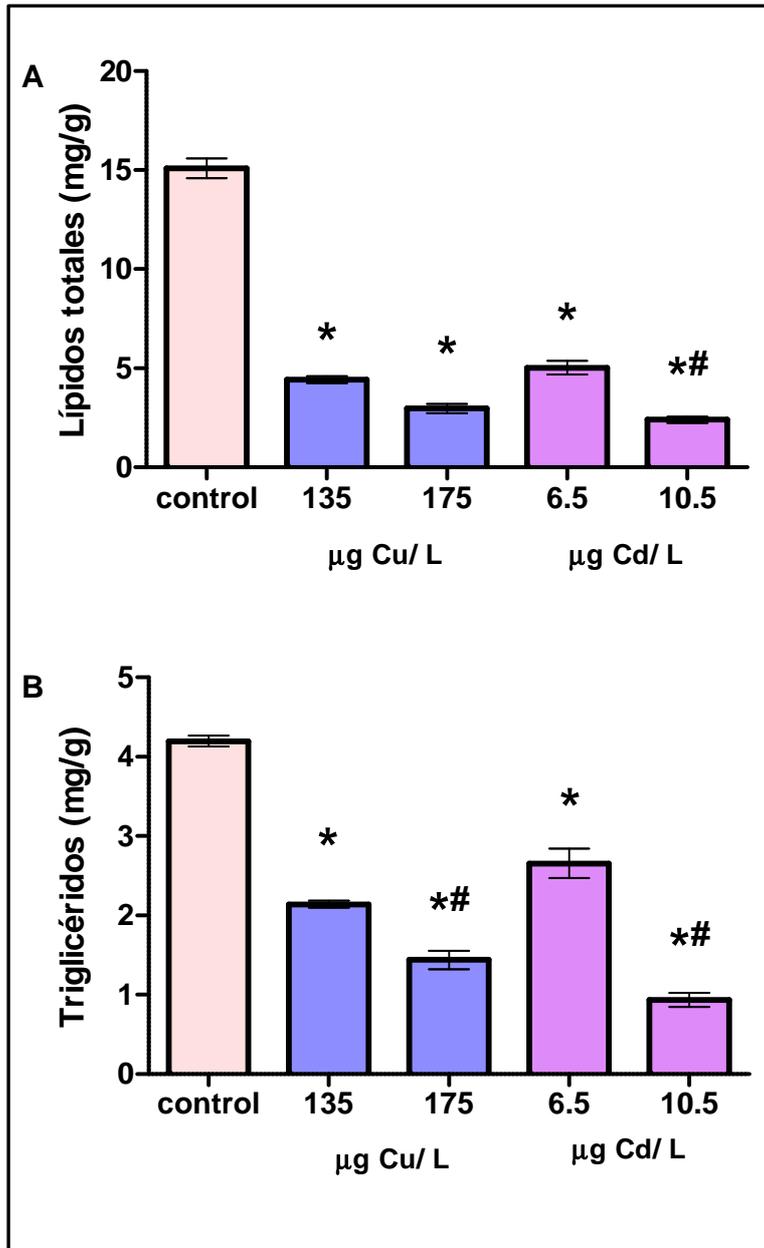


Fig. 7.2. Niveles de lípidos totales (A) y triglicéridos (B) en machos de *H. curvispina* control y expuestos durante 10 días a MHW adicionada con cobre (135 y 175 µg/L) o cadmio (6,5 y 105 µg/L).

Valores expresados como media± EEM (n=3).

*: representa diferencias significativas respecto del control.

#: representa diferencia significativa entre concentraciones del mismo metal.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

La Fig. 7.3 muestra los niveles de glucógeno, proteínas totales y arginina fosfato para los grupos expuestos y el control. En relación a los controles los niveles de glucógeno disminuyeron significativamente en individuos expuestos a Cu (85%-90%) y Cd (84%-95%). A su vez, para ambos metales hubo diferencia significativa entre tratamientos. El contenido de proteínas totales disminuyó en función de la concentración en un 46 a 87% para los animales expuestos a 135 y 175 $\mu\text{dCu/L}$ respectivamente y en un 20 y 77%, para los animales expuestos a 6,5 y 10,5 $\mu\text{gCd/L}$ respectivamente. Los niveles de arginina fosfato mostraron una marcada disminución, mayor al 90% en comparación con el control en todos los tratamientos.

La Fig. 7.4 muestra la actividad de SOD, CAT, TBARS y Na^+/K^+ ATPasa en animales control y expuestos a Cu y Cd. La actividad de SOD aumentó significativamente en los animales expuestos al Cu respecto a la registrada en control (2,2 y 2,5 veces para 135 y 175 $\mu\text{gCu/L}$ respectivamente) sin diferencias significativas entre ambas concentraciones de ensayo. En los animales expuestos a la menor concentración de Cd la actividad de SOD no se vio afectada respecto del control, sin embargo su actividad se duplicó en los animales expuestos a 10,5 $\mu\text{gCd/L}$ diferenciándose significativamente de ambos grupos. Las concentraciones de Cu y Cd ensayadas no generaron cambios en la actividad de CAT. Los niveles de lipoperoxidación incrementaron 1,6 y 4,4 veces para 135 y 175 $\mu\text{gCu/L}$ y 3,2 y 3,4 para 6,5 y 10,5 $\mu\text{gCd/L}$ respectivamente. La actividad de Na^+/K^+ ATPasa decreció significativamente tanto en animales expuestos a Cu como a Cd (2,3 y 2,5 veces para 135 y 175 $\mu\text{gCu/L}$ y 2,5 veces en ambas concentraciones de Cd). No se observaron diferencias significativas para éste parámetro en los anfípodos expuestos entre tratamientos.

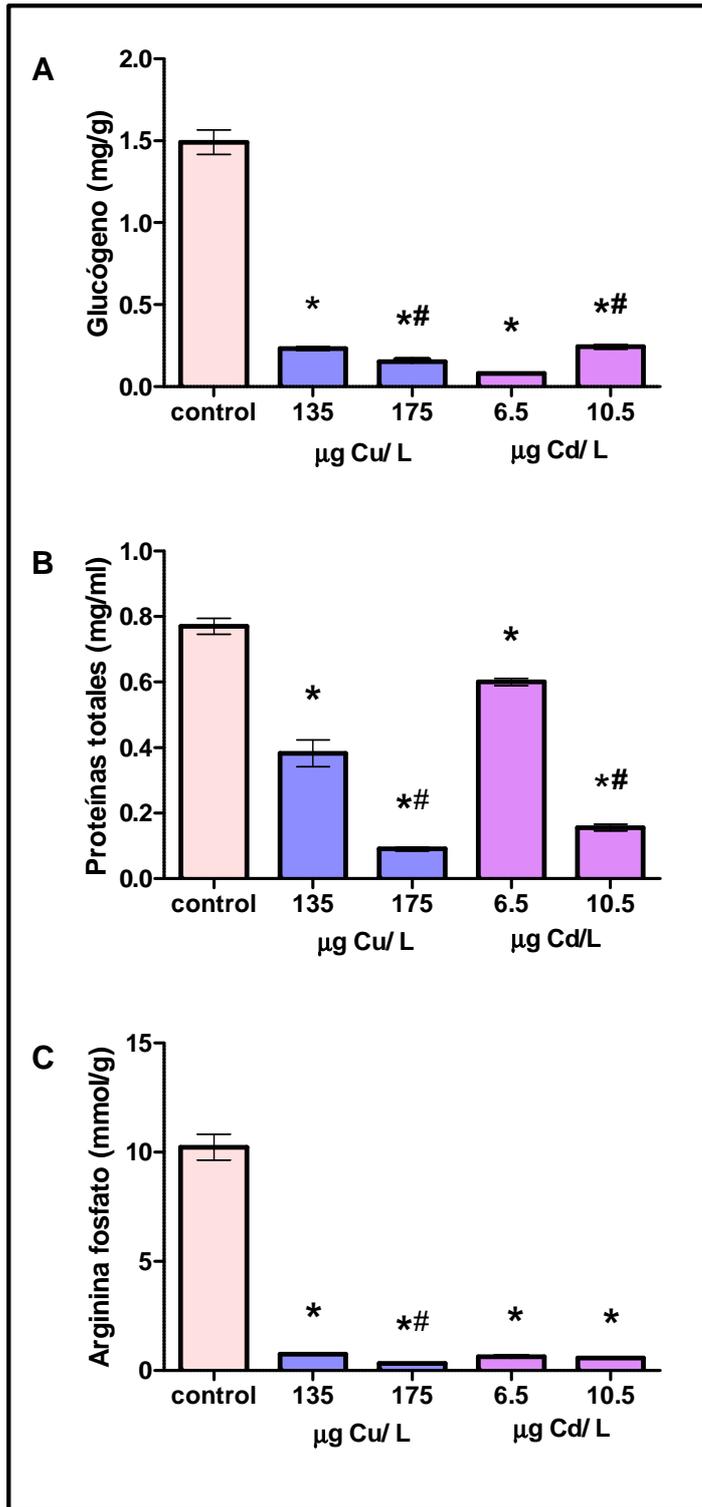


Fig. 7.3. Niveles de glucógeno (A), proteínas totales (B) y arginina fosfato (C) en machos de *H. curvispina* control y expuestos durante 10 días a MHW adicionada con cobre (135 y 175 $\mu\text{g/L}$) o cadmio (6,5 y 105 $\mu\text{g/L}$).

Valores expresados como media \pm EEM (n=3).

*: representa diferencias significativas respecto del control.

#: representa diferencia significativa entre concentraciones del mismo metal.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

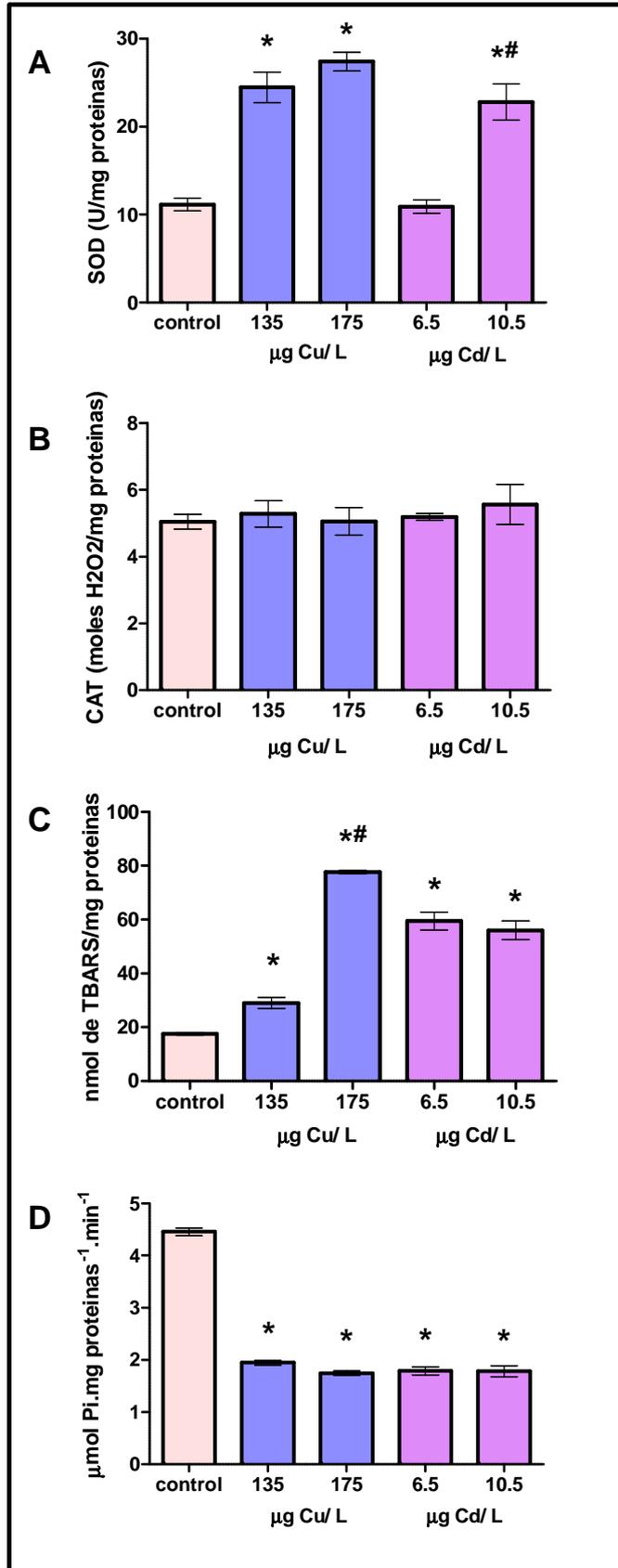


Fig. 7.4. Actividad de superóxido dismutasa (A), actividad de catalasa (B), nivel de lipoperoxidación (C) y actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa (D) en machos de *H. curvispina* control y expuestos durante 10 días a MHW adicionada con cobre (135 y 175 µg/L) o cadmio (6,5 y 105 µg/L).

Valores expresados como media ± EEM (n=3).

*: representa diferencias significativas respecto al control.

#: representa diferencia significativa entre concentraciones del mismo metal.

Nivel de significancia: p<0,05.

7.4.2 Ensayo con sedimento adicionado

Los valores de pH, OD, conductividad, dureza, nitrógeno amoniacal y las concentraciones de Cu y Cd en el agua sobrenadante y sedimento, medidas a tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 7.3.

Los valores de pH y OD se mantuvieron constantes entre concentraciones y tratamientos durante el tiempo de exposición. La dureza y la conductividad fueron mayores a tiempo final de ensayo en relación a los valores iniciales, probablemente asociado a la actividad biológica en el sistema o a la disolución de componentes de la matriz sólida a lo largo del tiempo de exposición. Los parámetros estuvieron dentro del rango aceptable para condiciones de bioensayo estándar, con excepción del amonio donde los niveles fueron más elevados. Al igual que en el ensayo con matriz acuosa las concentraciones de amonio mostraron variabilidad entre tiempo inicial y final de ensayo, pero se encontraron dentro del rango de tolerancia para la supervivencia de *H. curvispina* (ítem 4.4, capítulo 4 y Anexo II).

Concentración Nominal	Control		100 mgCu/Kg		200 mgCu/Kg		4 mgCd/Kg		8 mgCd/Kg	
	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf	Ti	Tf
Parámetros										
pH	8,4±0,1	8,6±0,1	8,3±0,0	8,6±0,0	8,3±0,1	8,6±0,0	8,3±0,2	8,6±0,0	8,4±0,1	8,7±0,0
OD (mg/L)	7,6±0,4	7,9±0,2	7,4±0,4	7,0±0,8	7,6±0,3	7,1±0,8	7,3±0,7	7,5±0,2	7,7±0,5	6,6±1,0
Dureza(mgCaCO ₃ /L)	160	260±10	160	250±10	160	240±0	160	240±10	160	230±0
Conduct. (µS/cm)	691±12	802±17	682±7	816±20	715±8	816±20	687±20	845±25	674±9	852±13
N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	4,3	9,0±0,7	3,5	9,3±0,0	3,5	10,0±0,0	4,3	9,7±0,5	4,3	10,0±1,9
Cu medido (mg/Kg)	19	--	125	--	228	--	--	--	--	--
CE Cu	0		106		209					
Cu medido (µg/L)	53,2	58,3	376,3	439,7	393,6	645,1	--	--	--	--
Cd medido (mg/Kg)	< 0,25	--	--	--	--	--	3,5	--	7,0	--
Cd medido (µg/L)	<2	<2	--	--	--	--	1,5	1,9	2,0	5,3
Supervivencia (%)	--	96,4	--	96,4	--	100	--	100	--	96,4

Tabla 7.3: Porcentaje de supervivencia de machos de *H. curvispina* expuestos a Cu o Cd en sedimento adicionado. Parámetros fisicoquímicos medidos en OW y sedimento a tiempo inicial (Ti; n=1-3) y final (Tf; n=3) de exposición, valores expresados como media ± DS. Concentraciones de cobre y cadmio medidas en OW (Ti y Tf) y sedimento (Ti) (n=1). Las concentraciones de Cu en sedimento para cada tratamiento son expresadas como concentración efectiva (CE): Cu adicionado - Cu control. La última fila muestra los valores de supervivencia al final del período de exposición.

Bajo las condiciones experimentales, para los dos metales evaluados, no se observó mortalidad significativa en ninguna concentración de ensayo respecto del control (Tabla 7.3).

Todos los parámetros metabólicos estudiados se evaluaron confrontando los efectos de los tratamientos en relación a los valores control así como entre tratamientos. La tabla 7.4 muestra los resultados de los análisis estadísticos para todos los parámetros considerados.

Parámetros	Cobre	Cadmio
	control-106-209 mg/KgSS	control-3,5-7 mg/KgSS
Lípidos Totales	$F_{0,05;6} = 44,73 *$	$F_{0,05;6} = 26,1 *$
Triglicéridos	$F_{0,05;6} = 96,24 *$	$F_{0,05;6} = 94,3 *$
Glucógeno	$F_{0,05;6} = 143,67 *$	$F_{0,05;6} = 597,3 *$
Proteínas Totales	$F_{0,05;6} = 1,26 \text{ ns}$	$F_{0,05;6} = 0,2 \text{ ns}$
Arginina fosfato	$F_{0,05;6} = 166,23 *$	$F_{0,05;6} = 329,2 *$
TBARS	$F_{0,05;6} = 218,19 *$	$F_{0,05;6} = 354,09 *$
NA/K ATPasa	$F_{0,05;6} = 107,99 *$	$H_{0,05;2} = 5,60 *$
ETS	$F_{0,05;26} = 4,32 *$	$F_{0,05;26} = 4,22 *$

Tabla 7.4: Resumen de las significatividades estadísticas obtenidas para los parámetros evaluados en machos de *H. curvispina* expuestos a Cu o Cd en sedimento adicionado. Con excepción de Na/K para cadmio a los que se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, los parámetros evaluados cumplieron los supuestos de ANOVA de normalidad y homocedasticidad. Los valores de Na/K y triglicéridos (cobre) y triglicéridos (cadmio) fueron previamente transformados (log10).

F: F de Fisher; H: estadístico de la prueba de Kruskal-Wallis; *: diferencias significativas globales ($p < 0.05$); ns: ausencia de significancia estadística.

La Fig 7.5 muestra la variación en el contenido de lípidos totales y triglicéridos para los grupos expuestos y el control. Los animales expuestos a Cu mostraron una disminución significativa en los niveles de los dos parámetros evaluados en relación al grupo control. Para 106 y 209 mgCu/Kg respectivamente, la reducción en los lípidos totales fue del 54% y 83% y en triglicéridos del 73% y 77%. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los parámetros. Con respecto al Cd se observó una disminución significativa para lípidos totales en relación al control. En los animales expuestos a 3,5 y 7 mgCd/Kg la reducción fue del 38% y 56%, respectivamente. En relación a los triglicéridos el efecto fue concentración-dependiente, la reducción fue del 61% y 74% en los animales ensayados a 3,5 y 7 mgCd/Kg, respectivamente.

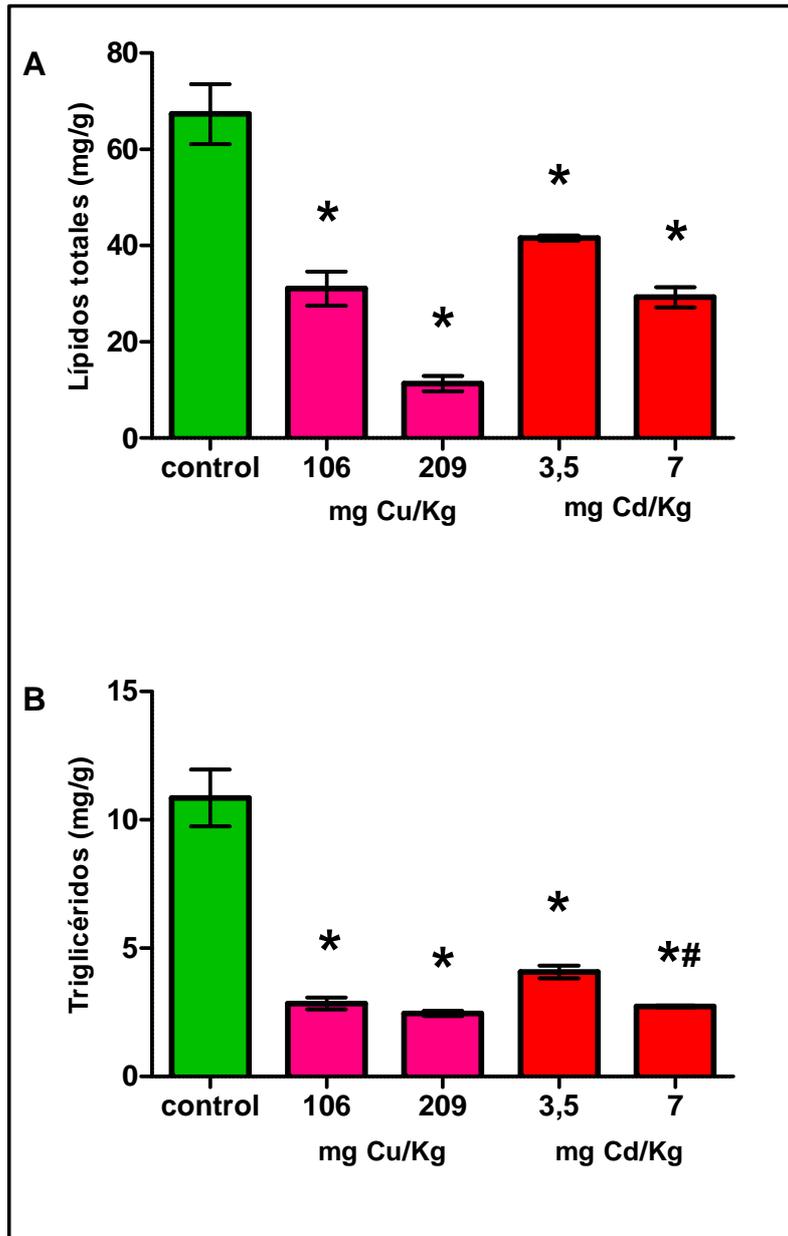


Fig. 7.5. Concentración de lípidos totales (A) y triglicéridos (B) en machos de *H. curvispina* control y expuestos durante 10 días a sedimento adicionado con cobre (106 y 209 mg/Kg) o cadmio (3,5 y 7 mg/Kg).

Valores expresados como media± EEM (n=3).

*: representa diferencias significativas respecto del control.

#: representa diferencias significativas entre concentraciones del mismo metal.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

La Fig 7.6 muestra los niveles de glucógeno, proteínas totales y arginina fosfato para los grupos expuestos y el control. Los niveles de glucógeno disminuyeron significativamente en individuos expuestos a Cu (37%-77%) y Cd (45%-85%) comparados con los controles. A su vez, para ambos metales hubo diferencia significativa entre tratamientos. El contenido de proteínas totales no se vio afectado por la exposición a ninguno de los metales. El contenido de arginina fosfato disminuyó en función de la concentración en un 51% y 66% para los animales expuestos a 106 y 209 mgCu/Kg respectivamente. Con respecto al Cd, la disminución en relación al grupo control fue del 67% y 66%, para los animales expuestos a 3,5 y 7 mgCd/Kg respectivamente, no observándose diferencias entre ambos tratamientos.

La Fig. 7.7 muestra los niveles de lipoperoxidación, la actividad de Na^+/K^+ ATPasa y la actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) en animales control y expuestos a metales. Los niveles de lipoperoxidación incrementaron significativamente en relación al control 4 y 5,5 veces para 106 y 209 mgCu/Kg y 2 y 4,4 veces para 3,5 y 7 mgCd/Kg respectivamente. A su vez, para ambos metales hubo diferencia significativa entre tratamientos. La actividad de Na^+/K^+ ATPasa decreció significativamente tanto en animales expuestos a Cu como a Cd (4,1 y 5,4 veces para 106 y 209 mgCu/Kg y 4,5 y 4,9 veces para 3,5 y 7 mgCd/Kg). No se observaron diferencias significativas para éste parámetro entre tratamientos. La actividad del ETS disminuyó de manera significativa en relación al grupo control para ambos metales, solo en la mayor concentración de exposición (29% para 209 mgCu/Kg y 26% para 7 mgCd/Kg).

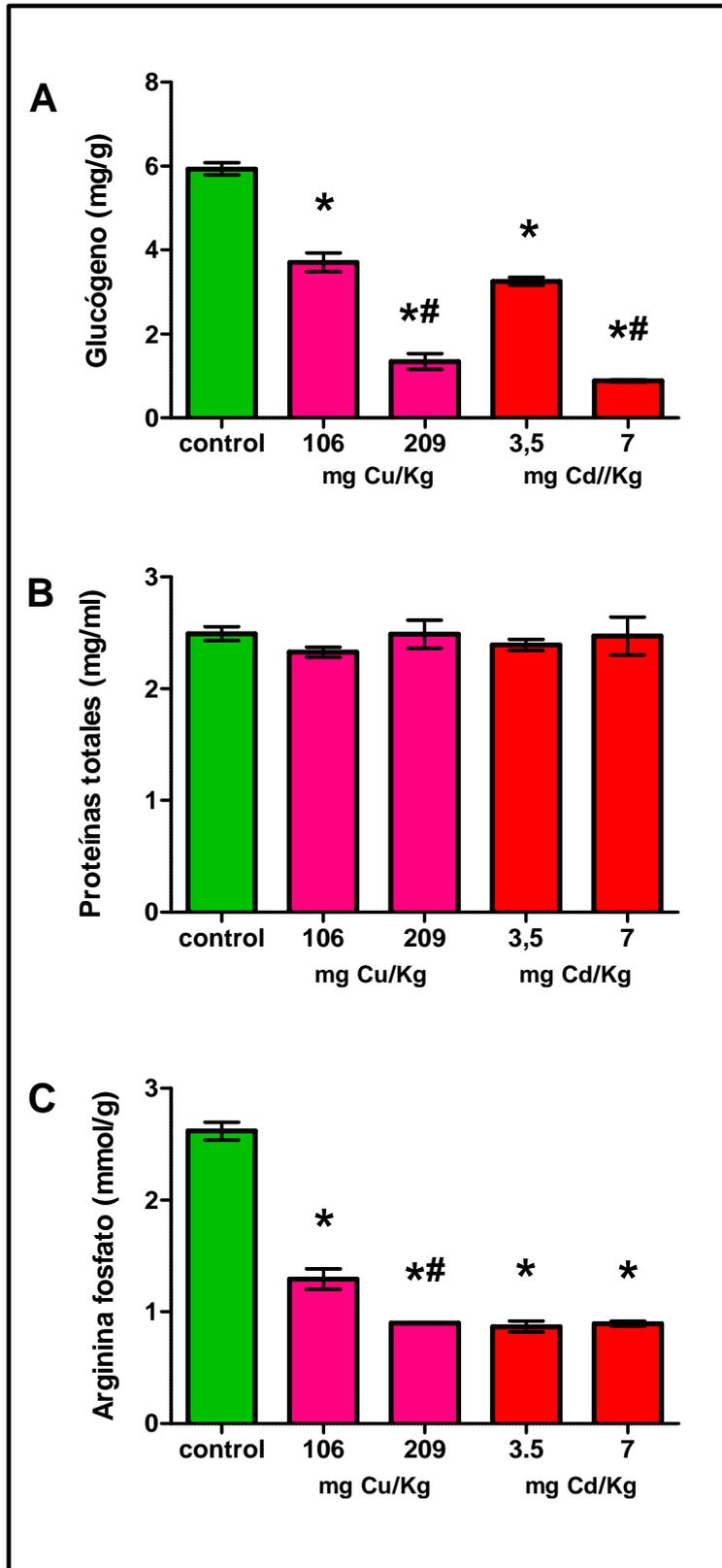


Fig. 7.6. Nivel de glucógeno (A), proteínas totales (B) y arginina fosfato (C) en machos de *H. curvispina* control y expuestos durante 10 días a sedimento adicionado con cobre (106 y 209 mg/Kg) o cadmio (3,5 y 7 mg/Kg).

Valores expresados como media± EEM (n=3).

*: representa diferencias significativas respecto del control.

#: representa diferencias significativas entre concentraciones del mismo metal.

Nivel de significancia: $p < 0,05$.

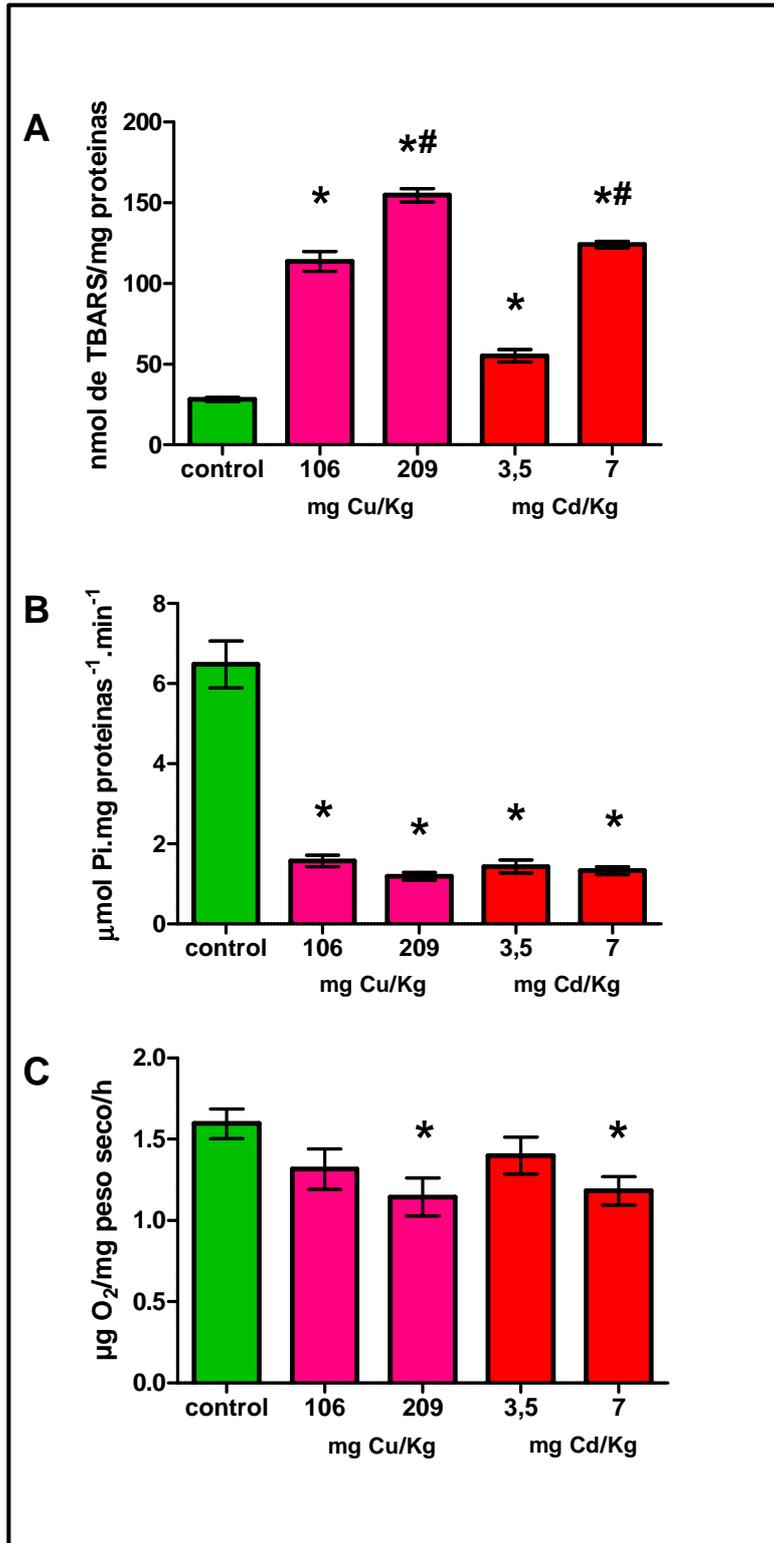


Fig. 7.7. Nivel de lipoperoxidación (A), actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa (B) y actividad del sistema de transporte de electrones (C) en machos de *H. curvispina* control y expuestos durante 10 días a sedimento adicionado con cobre (106 y 209 mg/Kg) o cadmio (3,5 y 7 mg/Kg).

Valores expresados como media± EEM (n=3; para ETS n=9-10)

*: representa diferencias significativas respecto del control.

#: representa diferencias significativas entre concentraciones del mismo metal.

Nivel de significancia: p<0,05.

7.5 Discusión

En el presente trabajo y desde un enfoque tradicional, la ausencia de mortalidad durante la exposición a ambos metales, caracteriza a las concentraciones de ensayo usadas como subletales. Sin embargo, aunque la letalidad es un *endpoint* ecotoxicológico relevante y es usualmente empleado para definir niveles guía para la protección de la biota acuática, no considera el costo energético que representa para los organismos la sobrevivencia en situaciones de estrés crónico por exposición a tóxicos.

Las técnicas de biomarcadores ofrecen un número de ventajas comparadas con los ensayos ecotoxicológicos convencionales, los que generalmente usan *endpoints* conservativos. En general, los biomarcadores pueden considerarse medidas de los cambios iniciales causados por interacciones toxicológicas entre la sustancia química y el sitio receptor (biológico). Esta interacción induce una cascada de eventos comenzando a nivel subcelular (ejemplo: disturbio en la transcripción genética e interferencias con vías metabólicas) y últimamente lleva a efectos adversos a niveles más altos de organización biológica. Los efectos de Cu y Cd sobre diferentes parámetros moleculares han sido estudiados en cladóceros, anfípodos, quironómidos, moluscos bivalvos, cangrejos y mejillones (McLoughlin *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004; Servia *et al.*, 2006; Planelló *et al.*, 2007, 2010; Fang *et al.*, 2010).

En el presente capítulo fueron evaluadas respuestas bioquímicas en machos de *H. curvispina* bajo condiciones de estrés subcrónico, por exposición a concentraciones subtóxicas de Cu y Cd en matriz acuosa y sedimento adicionado, siendo la primera vez que el metabolismo energético es evaluado en esta especie expuesta a metales pesados.

En el ensayo realizado en matriz acuosa, los resultados muestran que las concentraciones de Cu y Cd evaluadas alteraron la mayoría de los parámetros bioquímicos medidos (lípidos totales, triglicéridos, glucógeno, arginina fosfato, proteínas totales, SOD, TBARS y actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa). En tanto que la actividad de CAT no se vio afectada por la exposición a ninguno de los dos metales. En el ensayo realizado en matriz sólida, a excepción del contenido de proteínas totales, las concentraciones de Cu y Cd ensayadas alteraron todos los parámetros determinados (lípidos totales, triglicéridos, glucógeno, arginina fosfato, TBARS y actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa y ETS).

Los animales expuestos a Cu ó Cd en ambas matrices de ensayo mostraron una disminución de los niveles de lípidos, triglicéridos y glucógeno (Fig. 7.2, 7.3, 7.5 y 7.6). Resultados similares fueron registrados por varios autores en invertebrados y vertebrados expuestos a diferentes plaguicidas (Naqvi & Vaishnavi, 1993; Rambabu & Rao, 1994; Sancho *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 2001; Dutra *et al.*, 2008, 2011) y para isópodos expuestos a metales (Donker, 1992; Sorensen *et al.*, 1997).

El contenido de arginina fosfato disminuyó para ambos metales en las dos matrices evaluadas. Cabe destacar que en medio acuoso la disminución fue superior al 90% comparada con el control. Tanto los animales expuestos a Cu como a Cd mostraron una importante respuesta inespecífica (Fig. 7.3, 7.6). Estos resultados sugieren fuertemente que ocurre una depleción energética en los animales tratados.

Es importante notar que en los animales expuestos a ambos metales en matriz acuosa, se observó una drástica disminución en las reservas de arginina fosfato (>90%) y glucógeno (84%) a partir de la concentración más baja ensayada, mientras que los niveles de lípidos totales, triglicéridos y proteínas totales disminuyeron en general, dependiendo de la concentración del metal. Es conocido que la arginina fosfato y el glucógeno son los primeros en ser movilizados en organismos expuestos a estresores, indicando su rápida utilización por los tejidos como consecuencia de cambios medio ambientales y estrés tóxico (Durou, *et al.* 2008; Castiglioni *et al.*, 2010). En un estudio reciente bajo condiciones de campo con larvas de quironómidos, Planelló *et al.* (2013) encontraron una disminución significativa en el contenido de glucógeno en animales de río conteniendo altos niveles de metales pesados. La disminución en el contenido de glucógeno puede deberse al costo energético de contrabalancear el estrés producido por el tóxico, mientras que la disminución del contenido de lípidos y triglicéridos puede explicarse por su uso como reserva energética (Sroda & Cosu-Leguille, 2011). La disminución en el contenido de proteínas puede interpretarse como un proceso homeostático donde la demanda energética lleva al animal a necesitar de grandes reservas de energía, lo que puede llevar al catabolismo proteico (Ribeiro *et al.*, 2001) o pueden ser utilizadas para reparación celular (Rambabu & Rao, 1994; Sancho *et al.*, 1998). En este sentido, se halló un fuerte incremento de lipoperoxidación para ambos metales. La disminución de la concentración de lípidos totales y proteínas fue reportada para *Gammarus pulex* expuesto a un rango de concentraciones de Cd similares a las utilizadas en este trabajo (Vallinger *et al.*, 2013).

Como se mencionó previamente, en el ensayo realizado en matriz sólida se verificó una disminución de las reservas energéticas por exposición a ambos metales. Sin

embargo, a las concentraciones de ensayo evaluadas, el efecto observado fue menor que el determinado en el experimento en medio acuoso. En los anfípodos expuestos a ambos metales en sedimento, no hubo efecto sobre el contenido de proteínas totales, en tanto que la disminución en los niveles de glucógeno y arginina fosfato fue marcadamente inferior a la determinada en los animales ensayados en matriz acuosa.

Los organismos pueden adaptarse a la creciente producción de EROS sobrerregulando las defensas antioxidantes, por ejemplo las actividades de las enzimas antioxidantes (Livingstone, 2003). SOD y CAT se encuentran entre las enzimas antioxidantes más importantes. Fallas en los mecanismos de defensa antioxidantes para detoxificar el exceso de EROS puede llevar a daños oxidativos, incluyendo inactivación enzimática, degradación proteica, daño del ADN y lipoperoxidación (Halliwell & Gutteridge, 1999). En particular, la peroxidación lipídica es considerada como el mecanismo principal por el cual los oxiradicales pueden causar daño en el tejido llevando a una función celular alterada y a modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de las membranas celulares, lo que se torna en una interrupción de las funciones vitales (Barata *et al.*, 2005a).

En el ensayo realizado en matriz acuosa la actividad de SOD en *H. curvispina* se vio significativamente incrementada por exposición a ambas concentraciones de Cu (135 y 175 µg/L) y a 10,5 µgCd/L, en tanto que la actividad de CAT no se vio afectada en ningún caso. Los TBARS se vieron incrementados de manera significativa tanto en los animales expuestos a Cu como a Cd (Fig. 7.4).

Los estudios con Cu y enzimas antioxidantes son contrastantes, pero la mayoría de los casos muestran que el Cu induce daño oxidativo en lípidos (Doyotte *et al.*, 1997; Barata *et al.*, 2005b; Bouskill *et al.*, 2006). *Daphnia magna* expuesta a Cu por 48 h mostró incremento de la actividad de SOD y CAT en relación a los controles. Al mismo tiempo, la actividad de GPx y GST fue moderada pero significativamente incrementada y se reveló daño celular por incremento de TBARS.

En daphnidos expuestos a Cd, Barata *et al.* (2005b) demostraron que se produce un incremento de la actividad de SOD y GPx acoplada a un bajo nivel de peroxidación, sugiriendo así que el sistema de defensa antioxidante fue capaz de detoxificar el exceso de EROS.

En éste estudio, en el caso del Cu el incremento de los niveles de TBARS fue concentración-dependiente. Contrastando este resultado con la actividad de SOD se podría inferir una respuesta antioxidante insuficiente para contrarrestar el daño oxidativo.

Se observó una respuesta diferencial en los animales expuestos a Cd, que mostraron una importante inducción de los niveles de TBARS a partir de la menor concentración y una respuesta retardada de la actividad SOD a las concentraciones de Cd ensayadas, los resultados de los parámetros medidos de estrés oxidativo indicarían que los machos de *H. curvispina* tienen respuesta antioxidante.

La Na^+/K^+ ATPasa se inhibió de manera significativa y similar tanto en animales expuestos a Cu como a Cd (Fig. 7.4). Este resultado podría ser interpretado como consecuencia del daño oxidativo a nivel de las membranas celulares. Resultados similares fueron observados en *G. pulex* expuestos a Cu (Brooks & Mills, 2003).

En relación al ensayo realizado en matriz sólida, también se observó daño oxidativo en los animales expuestos tanto a Cu como a Cd. Para ambos metales el incremento de los niveles de TBARS fue concentración-dependiente. Lamentablemente en este caso no pudo hacerse un análisis relacionado al sistema de defensa antioxidante, debido a no contar con las determinaciones de las actividades de SOD y CAT. Con respecto a la actividad de Na^+/K^+ ATPasa los resultados hallados fueron semejantes a los obtenidos en el ensayo en medio acuoso (Fig. 7.7).

Los resultados hallados aquí son comparables a los reportados para *H. curvispina*, *H. pleoacuta* y *H. castroi*, expuestas a carbofuran (Dutra *et al.*, 2008) y glifosato (Dutra *et al.*, 2011). Ello indicaría que las respuestas observadas no son tóxicas específicas pero evidencian de manera contundente la respuesta bioquímico-metabólica desencadenada ante situaciones de estrés tóxico.

Aunque el sistema de transporte de electrones (ETS) no se utiliza con frecuencia para el análisis de compuestos tóxicos, en este trabajo los resultados obtenidos demostraron que resultó adecuado para este propósito. La actividad de ETS de los animales expuestos a las dos concentraciones mayores de Cu y Cd en sedimento, fue significativamente menor que la del grupo control. Resultados similares fueron reportados por Dutra (2012) quien observó una significativa disminución de la actividad de ETS en *Hyalella castroi* expuesta a diferentes concentraciones de extractos fenólicos de *Pinus taeda*. Lukancic *et al.* (2010) evaluaron la actividad de ETS en dos crustáceos de agua dulce (*Asellus aquaticus* y *Gammarus fossarum*) expuestos a pesticidas (imidacloprid y atrazina). Ambas especies respondieron con una disminución de los niveles de la actividad de ETS, luego de exposiciones breves (1 h) a concentraciones de hasta 10 mg/L.

Generalmente, una situación de estrés induce cambios compensatorios en el metabolismo energético de los organismos. Debido a que la carga energética de los organismos es utilizada para el crecimiento, reproducción y metabolismo estándar, el incremento en el costo energético del metabolismo basal puede llevar a estrés tóxico y a una reducción de las reservas energéticas (Widdows & Donkin, 1992).

Dado que las especies reactivas de oxígeno pueden resultar de la exposición a contaminantes, pero también pueden producirse durante la respiración aeróbica, la actividad metabólica elevada puede dar lugar a elevados niveles de EROS (Arun & Subramanian, 1998; Hoguet & Key, 2008).

También se puede asumir que la respuesta antioxidante ante el estrés (como se desprende del trabajo de Viarengo *et al.* (1995), es probablemente dependiente de varios componentes: la defensa antioxidante constitutiva, al igual que el estado fisiológico de los individuos o el aporte nutricional de antioxidantes alóctonos. En consecuencia la evaluación de ecotoxicidad mediante indicadores de estrés oxidativo por si solo puede resultar de interpretación confusa. Por lo que el uso simultaneo de varios marcadores biológicos es importante para minimizar posibles interpretaciones erróneas, sobre todo en los casos de situaciones complejas de contaminación (Linde-Arias *et al.*, 2008).

Este trabajo representa un primer aporte de evaluación del efecto de dos metales pesados en dos matrices de ensayo, sobre algunos parámetros de estrés oxidativo y metabolismo energético en machos de *H. curvispina*. El metabolismo energético se vio afectado de manera semejante tanto por exposición a Cu como a Cd. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de un desbalance energético asociado al de daño oxidativo y si bien no es posible establecer causalidad, se evidencia una respuesta integral.

Los resultados indican que los parámetros determinados pueden proveer un criterio sensible para la evaluación de efectos ecotoxicológicos tempranos sobre una especie nativa representativa de las comunidades zoobentónicas y epibentónicas del sur de Sudamérica.

CAPITULO 8

VALORACION DE EFECTOS SUBLETALES COMO HERRAMIENTAS DE USO EN ENSAYOS DE EVALUACION DE CALIDAD DE SEDIMENTOS

8.1 Introducción

Para la evaluación de la calidad de sedimentos, los bioensayos más ampliamente utilizados se realizan empleando muestras de sedimento completo y diferentes crustáceos (anfípodos, cladóceros), insectos (dipteros) y anélidos (poliquetos, oligoquetos) como organismos prueba (Ingersoll, 1995). Como ya fuera mencionado, entre los crustáceos, los anfípodos son los más ampliamente usados en pruebas de toxicidad de sedimentos en laboratorio. En particular a nivel regional, *Hyaella curvispina* desde hace algunos años es la especie más utilizada como organismo prueba en biomonitoreo y toxicidad de ambientes acuáticos de agua dulce, bajo condiciones de campo y laboratorio, evaluando generalmente parámetros tradicionales como puntos finales de efecto (mortalidad y crecimiento) (Graca *et al.*, 2002; Di Marzio *et al.*, 2005, 2010; Jergentz *et al.*, 2004; Mugni *et al.*, 2011; Peluso *et al.*, 2011; García, 2012). Sin embargo, el uso de biomarcadores para evaluación ecotoxicológica con esta especie aún es poco frecuente (Anguiano *et al.*, 2008, 2012; Venturino *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2009), e incluso, no se encuentran en la bibliografía resultados por exposición a sedimentos naturales contaminados bajo condiciones estandarizadas de laboratorio.

Los ríos y arroyos que corren a través de las áreas urbanas y suburbanas de la región Pampeana de Argentina, frecuentemente reciben descarga de contaminantes de actividades industriales, agrícolas y ganaderas (Rodríguez Capítulo, 1984; Jergentz *et al.*, 2005; Ronco *et al.*, 2008; Mugni *et al.*, 2011). La Chozza es uno de los arroyos que desemboca en la represa Roggero en la cuenca alta del río Reconquista, que es uno de los ríos periurbanos de Argentina más poluidos. Presenta una longitud de 30 Km y

drena un área de aproximadamente 440 Km². La principal actividad de la región es la agricultura, además, el arroyo La Chozza también recibe las aguas residuales de un club de campo, una zona rural y un pequeño parque industrial, todos localizados agua arriba del sitio de muestreo (Rigacci *et al.*, 2013).

Los estudios llevados a cabo en el presente capítulo, evaluando puntos finales tradicionales y biomarcadores de efecto temprano sobre una especie autóctona, tienen la finalidad de realizar un aporte que sea de utilidad para la evaluación de sedimentos naturales de la región.

8.2 Objetivos

- Evaluar la utilidad de *H. curvispina* como especie prueba en ensayos ecotoxicológicos con muestras estacionales de sedimento y agua de poro de un arroyo poluido (La Chozza), utilizando como puntos finales supervivencia y parámetros de crecimiento.
- Investigar la utilidad de biomarcadores de efecto temprano en *H. curvispina*, en evaluaciones ecotoxicológicas de sedimentos naturales como herramientas para la evaluación toxicológica de calidad de sedimentos. Se determinaron como puntos finales parámetros de estrés oxidativo (actividad de CAT y SOD, lipoperoxidación) y actividad del sistema de transporte de electrones (ETS).

8.3 Materiales y Métodos

8.3.1 Organismos prueba

Los organismos utilizados fueron juveniles de *H. curvispina* obtenidos de cultivos *indoor*, cultivos *indoor* (primera generación) y cultivos *outdoor* (ver ítem 3.1.2, capítulo 3). Los cultivos fueron mantenidos acorde a las metodologías detalladas en el capítulo 4, ítem 4.2.

El *pool* de animales utilizado en cada ensayo se seleccionó del cultivo correspondiente por tamizado y se aclimató durante los 7 días previos al inicio del bioensayo en MHW y

condiciones de fotoperiodo y temperatura constante y fueron alimentados diariamente con alimento para peces triturado (capítulo 3, ítem 3.3).

8.3.2 Tratamiento del sedimento

La Figura 8.1 muestra de manera sucinta el protocolo seguido con el procesamiento de las muestras ambientales en el contexto de los ensayos. Para información más detallada ver ítem 3.5.3 del capítulo 3.

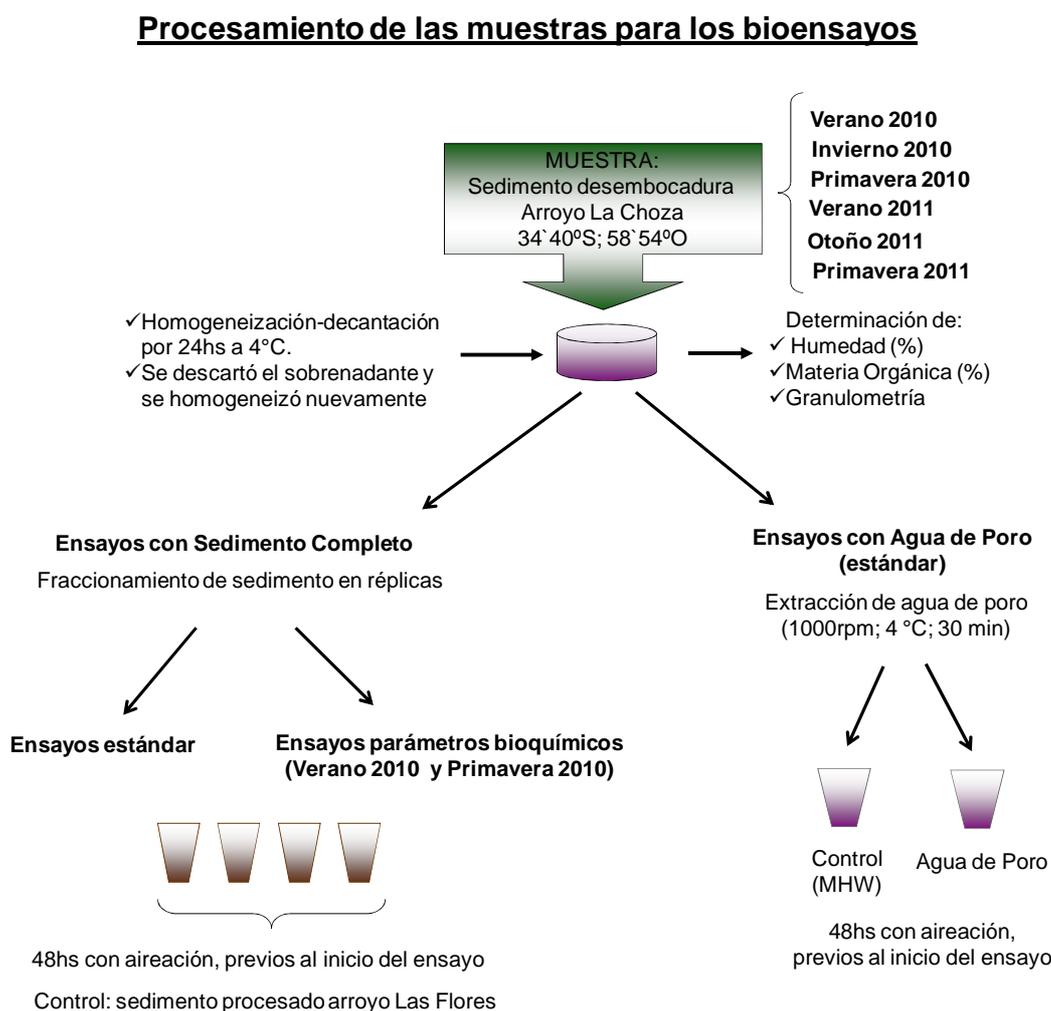


Figura 8.1: Tratamiento del sedimento y procesamiento de las muestras para los bioensayos.

8.3.3 Procedimiento de los bioensayos

Para cada muestra de sedimento se realizaron ensayos estáticos de 10 días de duración con sedimento completo y agua de poro extraída de los mismos siguiendo los

protocolos de USEPA (2000) y EC (1994) (ver ítem 3.5.3, capítulo 3). En estos bioensayos estándar se evaluó supervivencia, crecimiento e IMC (Figura 8.2).

Paralelamente a los bioensayos estándar, con muestras correspondientes a sedimentos colectados en Verano 2010 y Primavera 2010 se realizaron bioensayos para la evaluación de parámetros bioquímicos (Figura 8.3).

En la siguiente tabla (8.1) se indican los ensayos realizados, parámetros determinados y el cultivo de origen de los animales utilizados en cada muestreo:

Muestreo	Cultivo de origen	Ensayo Estándar (Sedimento)	Ensayo Estándar (Agua de Poro)	Ensayos Biomarcadores (Sedimento)
Verano 2010	<i>Outdoor</i>	Sobrevivencia Crecimiento IMC	Sobrevivencia Crecimiento IMC	SOD CAT TBARS ETS
Invierno 2010	<i>Outdoor</i>	Sobrevivencia Crecimiento IMC	Sobrevivencia Crecimiento IMC	-----
Primavera 2010	<i>Indoor</i> (primera generación)	Sobrevivencia Crecimiento IMC	Sobrevivencia Crecimiento IMC	SOD CAT TBARS ETS
Verano 2011	<i>Indoor</i>	Sobrevivencia Crecimiento IMC	Sobrevivencia Crecimiento IMC	-----
Otoño 2011	<i>Indoor</i>	Sobrevivencia Crecimiento IMC	Sobrevivencia Crecimiento IMC	-----
Primavera 2011	<i>Indoor</i> (primera generación)	Sobrevivencia Crecimiento IIMC	Sobrevivencia Crecimiento IMC	-----

Tabla 8.1: Descripción de los bioensayos realizados.

La descripción de la metodología empleada para la determinación de los puntos finales evaluados para todos los bioensayos se encuentra detallada en los ítems 3.4.1 y 3.4.2 del capítulo 3.

Diseño Experimental (Ensayos Estándar)

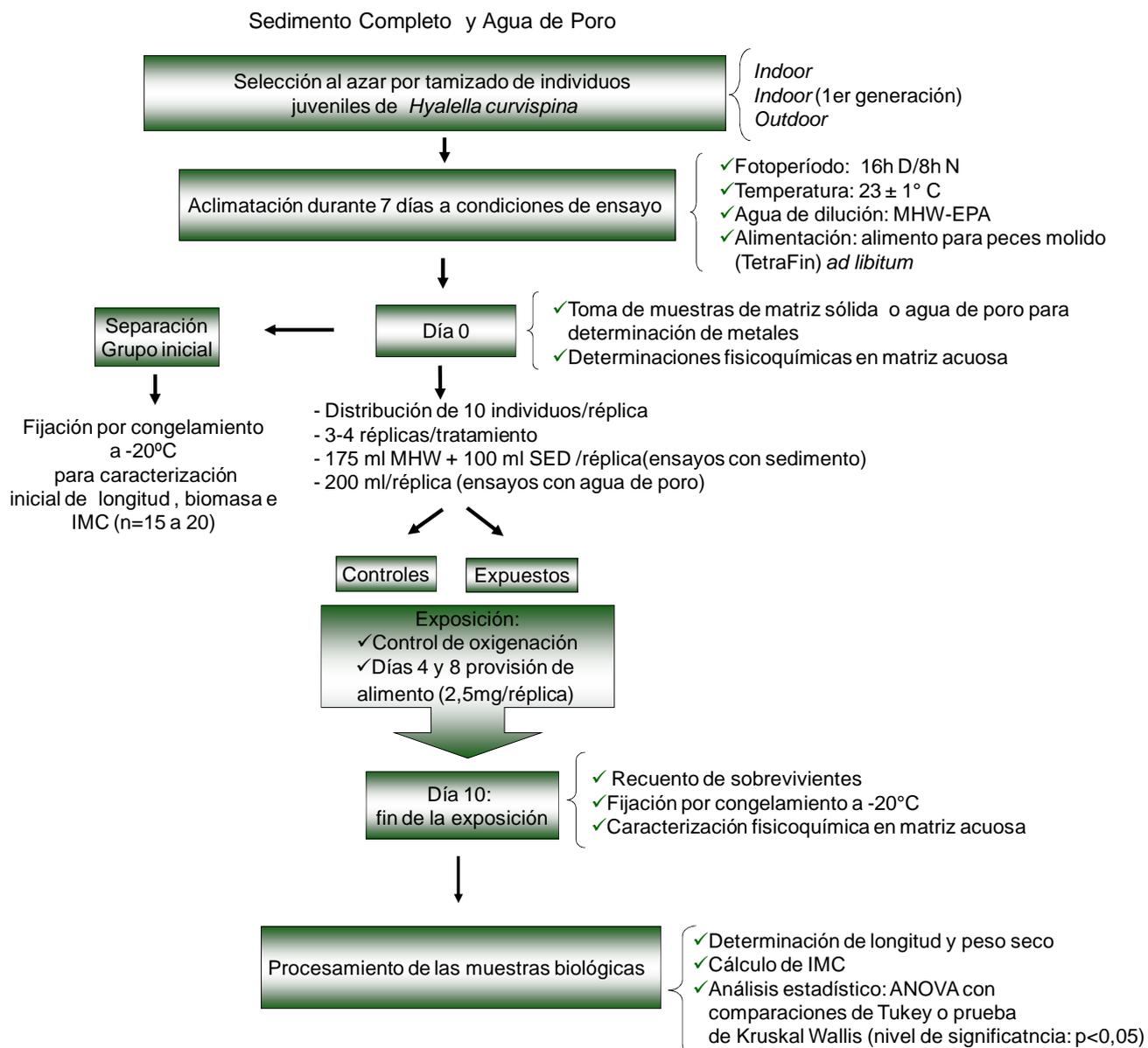
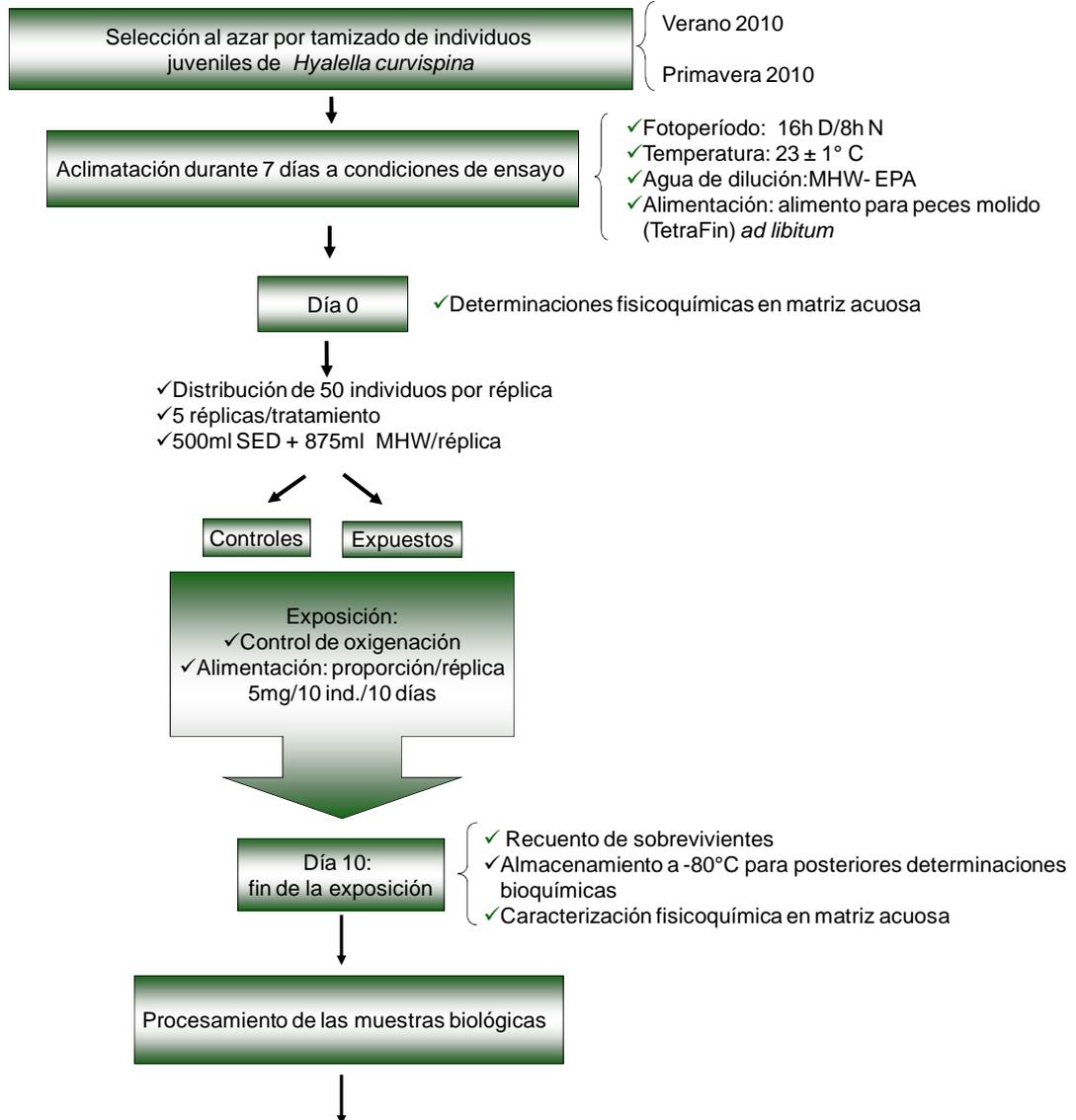


Figura 8.2: Descripción del diseño experimental empleado en los ensayos estándar.

Diseño Experimental (Ensayos Biomarcadores)

Para ensayos con Sedimento Completo, USEPA 2000 con modificaciones



-Cuatro individuos de cada replica fueron utilizados para la cuantificación de ETS. Las determinaciones fueron realizadas sobre animales individuales.

-Los individuos remanentes fueron utilizados para la determinación de:
 -proteínas totales;
 -niveles de lipoperoxidación (TBARS);
 -actividad de SOD y CAT
 Las determinaciones fueron realizadas en *pools* de homogenatos totales.

Análisis estadístico: test de Student (nivel de significancia $p < 0,05$)

Figura 8.3: Descripción del diseño experimental empleado en los ensayos de biomarcadores.

8.4 Resultados

8.4.1 Ensayos estándar

8.4.1.1 Sedimento completo

La Tabla 8.2 muestra el porcentaje de humedad y el contenido de materia orgánica (MO) del sedimento control (arroyo Las Flores procesado) y los sedimentos de La Choza. En el sedimento control el porcentaje de MO fue elevado y la humedad se encontró en el orden del 40%. El sedimento de La Choza exhibió un mayor contenido de agua que el control y MO variable en función de las estaciones del año, siendo más elevada en invierno, e inferior en verano. Cabe destacar que los valores correspondientes al arroyo Las Flores son los mismos que los descritos en el Capítulo 6, dado que se trata de sedimento procesado y almacenado.

		Humedad \pm DS (%)	M O \pm DS (%)	n
Control	Las Flores	39,3 \pm 0,9	6,9 \pm 0,1	6
V 2010	Choza	55,6 \pm 0,7	4,0 \pm 0,2	3
I 2010	Choza	65,2 \pm 0,4	7,3 \pm 0,1	3
P 2010	Choza	56,2 \pm 0,0	5,4 \pm 0,1	3
V 2011	Choza	52,4 \pm 0,2	4,0 \pm 0,1	3
O 2011	Choza	49,4 \pm 0,7	5,6 \pm 0,1	3
P 2011	Choza	49,1 \pm 0,4	5,3 \pm 0,1	3

Tabla 8.2: Contenido de humedad y porcentaje de materia orgánica (MO) de las muestras evaluadas.

La Tabla 8.3 muestra la composición granulométrica del sedimento del arroyo Las Flores y de La Choza para las diferentes estaciones del año evaluadas. Ambos sedimentos pueden clasificarse como franco arenoso (MESL, 2001).

		Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Control	Las Flores	61	27	12
V 2010	Choza	57	30	13
I 2010	Choza	54	32	14
P 2010	Choza	58	27	15
V 2011	Choza	59	30	11
O 2011	Choza	56	31	13
P 2011	Choza	55	30	15

Tabla 8.3: Composición granulométrica de las muestras evaluadas (n=1).

Las concentraciones de metales pesados en los sedimentos de ambos arroyos estuvieron por debajo de los Niveles Guía de Calidad de Sedimentos para la protección de la vida acuática (CEQG, 2013), a excepción del As (en Verano, La Choza 2010 y Primavera, La Choza 2011) y el Cu (Primavera, La Choza 2011) (Tabla 8.4). Sin embargo, cabe destacar que una concentración de 222 mgCu/Kg no generó efectos sobre los parámetros de crecimiento en juveniles de *H. curvispina* (Fig. 6.7, capítulo 6).

		As	Cd	Zn	Cu	Cr	Pb	Fe	Mn
Control	Las Flores	<2	<0,5	<2	4	19	3	26559	609
V 2010	Choza	20	<2	106	25	26	<10	---	---
I 2010	Choza	<2	<0,5	17	14	26	5	36317	339
P 2010	Choza	<2	<0,5	<2	7	22	<1	32884	419
V 2011	Choza	<2	<0,5	<2	7	24	<1	33041	324
O 2011	Choza	7,5	<1	74	22	13	6,7	15210	196
P2011	Choza	13	<0,5	48	121	22	<1	27700	383
ISQG (CEQG,2013)		5,9	0,6	123	35,7	37,3	35	---	---

Tabla 8.4: Contenido de metales pesados en las muestras de sedimento (mg/Kg. SS) (n=1). La última fila indica los Niveles Guía de calidad de sedimentos de agua dulce para protección de la vida acuática.

Los parámetros fisicoquímicos del agua sobrenadante a tiempos iniciales y finales de ensayo se muestran en la Tabla 8.5. Estos parámetros no mostraron variaciones significativas entre los diferentes muestreos. Con la excepción del nitrógeno

amoniaco, los valores obtenidos se encontraron dentro de los límites aceptables para las condiciones de bioensayos estándar (USEPA, 2000; EC, 2013). Los valores promedio de pH permanecieron estables entre tratamientos y muestreos. La concentración de OD estuvo siempre por encima de los niveles recomendados. Para ambos sedimentos la dureza incrementó a tiempo final de exposición lo que probablemente se encuentra asociado a la actividad biológica y a la disolución de sales del sedimento a lo largo del tiempo de ensayo. Las concentraciones de N-NH_4^+ mostraron variabilidad, incluso en los controles, pero con valores dentro del rango aceptable para la supervivencia de *H. curvispina* (ítem 4.4, capítulo 4 y Anexo II).

	Tratamiento	Tiempo	OD (mg/L)	pH	Dureza (mgCaCO ₃ /L)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
VERANO 2010	Control	Ti	6,5±0,3	7,9±0,1	130±0	0,8±0,1
	Control	Tf	7,0±0,2	8,6±0,0	240±0	4,8±0,5
	La Choza	Ti	7,2±0,3	8,0±0,1	110±10	8,7±0,5
	La Choza	Tf	5,9±0,2	8,1±0,1	110±10	0,5±0,1
INVIERNO 2010	Control	Ti	7,7±0,2	8,4±0,0	150±10	0,7±0,2
	Control	Tf	7,5±0,5	8,5±0,0	270±0	7,2±0,3
	La Choza	Ti	8,2±0,1	8,7±0,0	90±0	6,2±0,5
	La Choza	Tf	7,8±0,3	8,1±0,1	130±0	0,2±0,1
PRIMAVERA 2010	Control	Ti	7,6±0,4	8,4±0,1	170±0	2,7±0,0
	Control	Tf	8,2±0,1	8,8±0,0	230	8,2
	La Choza	Ti	8,2±0,3	8,2±0,1	90±0	5,8±0,0
	La Choza	Tf	5,9±0,1	8,2±0,3	140	5,1
VERANO 2011	Control	Ti	7,8±0,1	8,2±0,0	160±10	3,0±0,3
	Control	Tf	7,9±0,1	8,6±0,1	240±0	5,8±2,2
	La Choza	Ti	8,0±0,1	8,6±0,0	90±0	6,1±0,3
	La Choza	Tf	8,2±0,1	8,4±0,0	80±0,10	0,6±0,3
OTOÑO 2011	Control	Ti	8,0±0,1	8,6±0,1	130±10	1,6±0,0
	Control	Tf	7,9±0,3	8,8±0,0	270±0	6,8±0,3
	La Choza	Ti	8,5±0,1	8,7±0,0	90±0	8,0±0,3
	La Choza	Tf	8,3±0,2	8,6±0,0	120±10	0,4±0,0
PRIMAVERA 2011	Control	Ti	7,1±0,7	8,3±0,1	130±10	1,2±0,0
	Control	Tf	7,1±0,1	8,6±0,0	220±30	4,1±0,3
	La Choza	Ti	7,3±0,7	8,6±0,0	80±10	6,1±0,5
	La Choza	Tf	6,8±0,4	8,5±0,1	170±20	0,4±0,1

Tabla 8.5: Parámetros fisicoquímicos en OW registrados a tiempo inicial (Ti) y final (Tf) de ensayo (n=3-4).

Los porcentajes de supervivencia de los anfípodos en el sedimento control oscilaron entre un 83 y un 98%, cumpliendo con los criterios aceptados por la USEPA (2000) para bioensayos con sedimento completo. En ningún caso hubo mortalidad significativa en los animales expuestos al sedimento de La Choza en relación al control (Tabla 8.6).

Tratamientos	Control	La Choza
Verano 2010	83±11	72±15
Invierno 2010	95±6	95±6
Primavera 2010	90±10	77±6
Verano 2011	83±13	95±6
Otoño 2011	83±6	90±0
Primavera 2011	98±5	90±10

Tabla 8.6: Sobrevivencia (%) \pm DE a tiempo final de ensayo (n=3-4) de juveniles de *H. curvipina* expuestos a sedimento completo.

En términos de crecimiento, se observó una respuesta diferencial entre los ensayos (Figs. 8.4 y 8.5).

En relación a la biomasa (Tablas 66, 69, 72, 75, 78 y 81, Anexo I), en todos los experimentos los grupos controles presentaron un incremento significativo en relación a su correspondiente grupo inicial. El mismo efecto se observó en los animales expuestos al sedimento del arroyo La Choza, a excepción de los ensayos correspondientes a P 2010 y V 2011, donde no se observaron diferencias significativas respecto del grupo inicial. A su vez, en tres de los seis ensayos se registró un menor incremento de la biomasa de los animales expuestos al sedimento del arroyo La Choza en relación a su correspondiente grupo control (I 2010, P 2010 y V 2011).

La longitud no siguió el mismo patrón de diferencias que la biomasa (Tablas 67, 70, 73, 76, 79 y 82 ANEXO I). Para éste parámetro, en cuatro de los seis experimentos (V 2010, I 2010, V 2011 y P 2011) los grupos controles presentaron un incremento significativo en relación al grupo inicial. En cuanto al sedimento del arroyo La Choza, el incremento en longitud respecto de dicho grupo se observó en los ensayos correspondientes a V 2010, I, 2010, O 2011 y P 2011. Sólo se determinaron diferencias significativas entre los grupos controles y los expuestos al sedimento de La Choza en los ensayos correspondientes a I 2010 y V 2011.

Por lo tanto considerando ambos parámetros, en los ensayos I 2010, P 2010 y V 2011 el crecimiento de los animales se vio afectado por exposición al sedimento del arroyo La Choza.

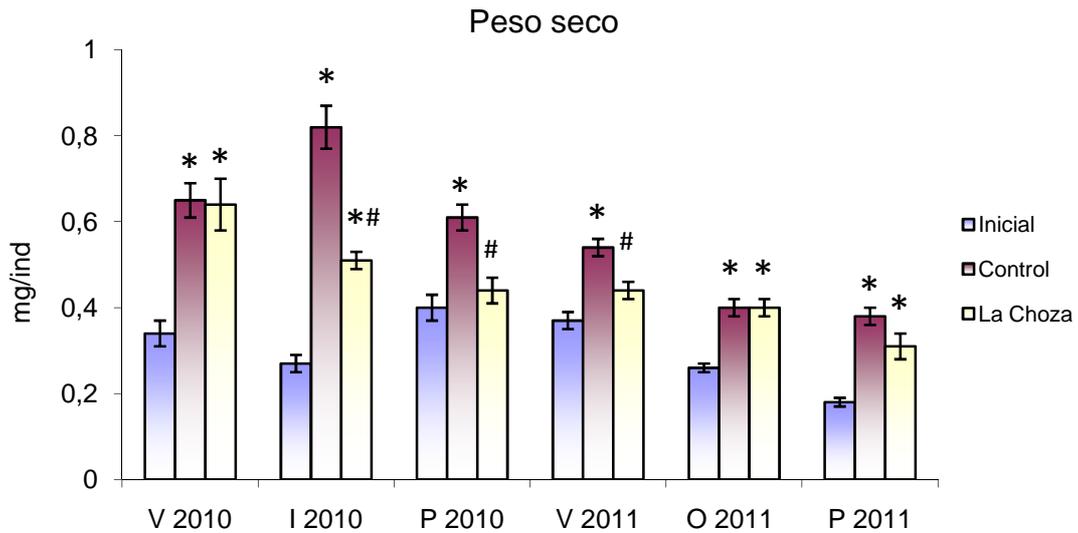


Figura 8.4: Peso seco promedio \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en sedimento completo (V: verano; I: invierno; P: primavera; O: otoño) (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

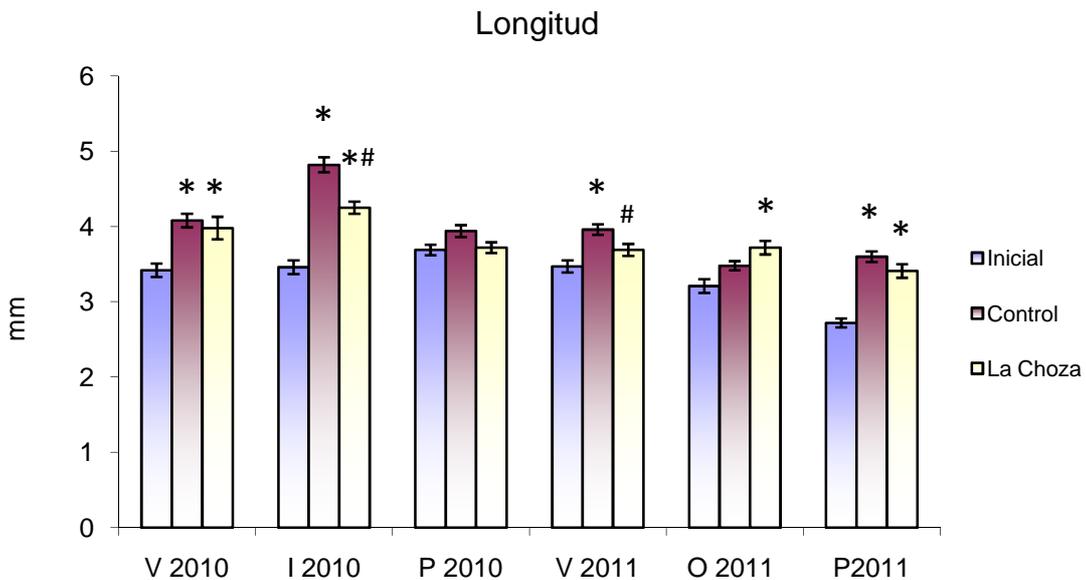


Figura 8.5: Longitud promedio \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en sedimento completo (V: verano; I: invierno; P: primavera; O: otoño) (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

En relación al IMC, a excepción del ensayo de P 2011, en todos los casos se observó un incremento significativo de los grupos controles relativo a los grupos iniciales,

sugiriendo un mejor estado de salud (*fitness*) de los animales controles luego de la exposición durante 10 días al sedimentos del arroyo Las Flores (Tablas 68, 71, 74, 77, 80 y 83 Anexo I). En cuanto al ensayo de P 2011, si bien la diferencia no resultó significativa, se observó la misma tendencia que en el resto de los experimentos donde el IMC del grupo control fue mayor que el del grupo inicial (Fig. 8.6).

Al igual que en lo observado para la longitud y la biomasa, el IMC reflejó diferencias significativas entre los controles y los animales expuestos al sedimento del arroyo La Choya, en los ensayos realizados en I 2010, P 2010 y V 2011. Pero para este último parámetro, a su vez, se determinaron diferencias entre ambos grupos en el experimento correspondiente a O 2011. En los ensayos restantes (V 2010 y P 2011) no se observaron diferencias significativas para este parámetro entre ambos tratamientos (Fig. 8.6).

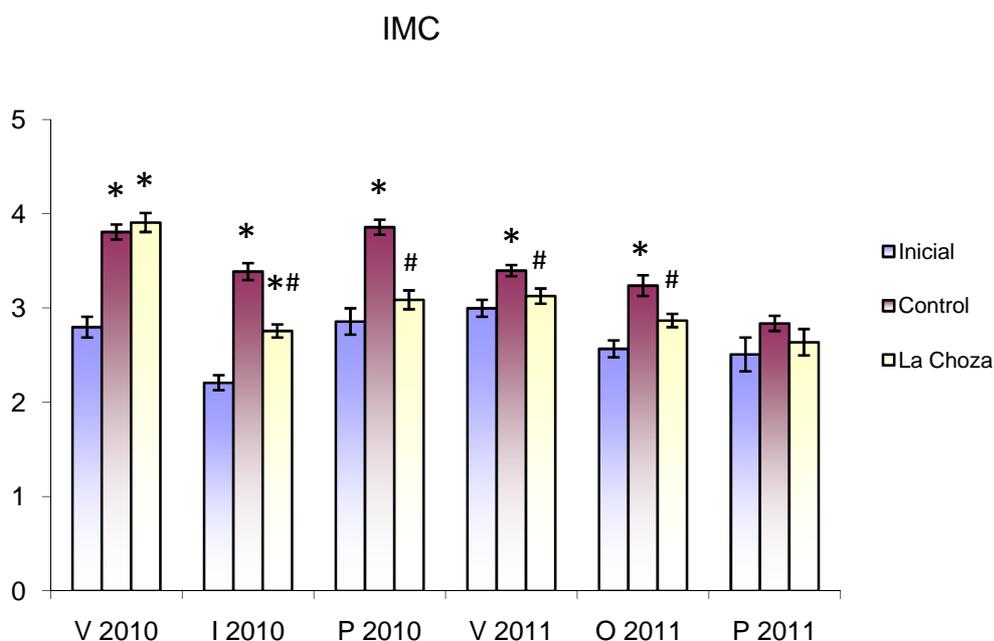


Figura 8.6: Índice de masa corporal (IMC) \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en sedimento completo (V: verano; I: invierno; P: primavera; O: otoño) (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

Análisis del IMC discriminando los datos en función del origen de los animales

A excepción de los animales expuestos al sedimento de La Choya provenientes de cultivo primera generación, tanto los controles como los expuestos incrementaron el

IMC en relación al tiempo inicial. El incremento de los controles fue de 17%, 22% y 43% mientras que el aumento de los animales expuestos al sedimento de La Choza fue de 9%, 7% y 25%, para cultivos *indoor*, primera generación y *outdoor*, respectivamente. A su vez, se observaron diferencias significativas entre los controles y los animales tratados en los tres casos (Fig. 8.7 y Tablas 102, 103 y 104 del Anexo I).

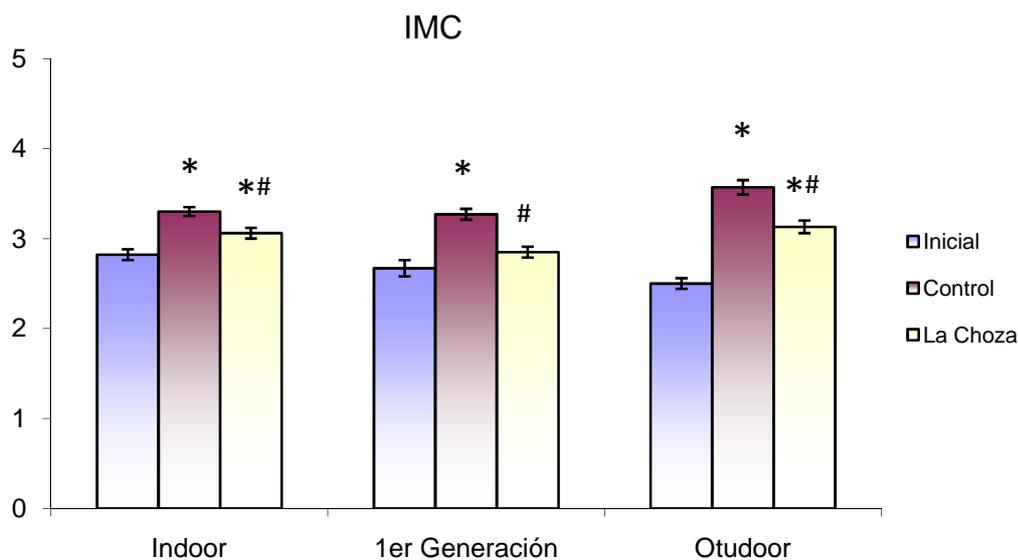


Figura 8.7: Índice de masa corporal (IMC) promedio \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en sedimento completo según origen de los animales. (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

8.4.1.2 Agua de poro

En la Tabla 8.7 se muestran las concentraciones de metales pesados en MHW (control) y agua de poro para las diferentes estaciones de muestreo.

		Cd	Zn	Cu	Cr	Pb	Fe	Mn
Control	MHW	<0,001	0,043	0,074	<0,001	0,015	<0,10	<0,05
V 2010	Choza	<0,001	0,070	0,006	0,002	0,004	---	---
I 2010	Choza	<0,001	0,043	0,01	<0,001	0,012	0,82	0,60
P 2010	Choza	<0,001	0,071	0,01	<0,001	0,024	2	0,57
V 2011	Choza	<0,001	0,045	0,018	<0,001	0,034	0,92	0,52
O 2011	Choza	<0,001	0,040	0,01	<0,001	0,028	0,94	0,54
P 2011	Choza	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
Ley 24051 (µg/L)		0,2-4		2-4	2-30	1-7	nd	
CEQG (µg/L)		0,017	30	2-4	nd	1-7	30	Nd

Tabla 8.7: Contenido de metales pesados en la muestras de MHW y agua de poro (mg/L) (n=1). nd: no determinado. Las últimas dos filas corresponden a los Niveles Guía para la protección de la vida acuática en agua dulce.

En cuanto a las determinaciones de Cu y Zn en MHW (control), a pesar de superar los Niveles Guía establecidos para la protección de la vida acuática en agua dulce (Ley 24051; CEQG, 2013), la concentración fue marcadamente inferior a la CL10 (10 días) para Cu (Tabla 5.8, capítulo 5) y CL50 (96 h) para Zn (Peluso, 2011) informadas para esta especie. Si bien el Pb también excedió los Niveles Guía, la concentración determinada se encontró muy por debajo de la CL50 (10 días) determinada para juveniles de *H. curvispina* (ensayos preliminares, datos no reportados). Si bien en varios de los experimentos la concentración de Cu, Zn, Pb y Fe en agua de poro superó los Niveles Guía, probablemente dichos metales no se encontraron biodisponibles debido a que no se registraron efectos sobre la supervivencia ni sobre el crecimiento de los anfípodos (Tabla 8.9, Figs. 8.8, 8.9 y 8.10).

Los parámetros fisicoquímicos en los medios de ensayo a tiempos iniciales y finales se muestran en la Tabla 8.8. El OD y el pH no presentaron variaciones significativas entre los distintos tiempos y los diferentes muestreos. La dureza fue más elevada en agua de poro que en los controles y se mantuvo en general constante durante el tiempo de ensayo. El N-NH₄⁺ incrementó en los controles a tiempo final en un rango de 0,9 a 2,6 mg/L en relación al tiempo inicial, mientras que en agua de poro a tiempo inicial los valores de éste parámetro estuvieron entre 7 y 11 mg/L disminuyendo a lo largo del tiempo de exposición hasta valores de 0 a 0,4 mg/L. Sin embargo, a pesar de ser valores elevados, la supervivencia de los animales expuestos al agua de poro no se vio afectada en ninguno de los experimentos realizados (Tabla 8.9).

	Tratamiento	Tiempo	OD (mg/L)	pH	Dureza (mgCaCO ₃ /L)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)
VERANO 2010	MHW	Ti	8,1	7,6	90	0,0
	MHW	Tf	8,3±0,2	8,0±0,0	100±10	1,8±1,0
	Agua de Poro	Ti	8,7	7,9	120	7,8
	Agua de Poro	Tf	8,3±0,1	8,9±0,1	240±0	0,0±0,0
INVIERNO 2010	MHW	Ti	8,7±0,1	8,3±0,0	90±0	0,0
	MHW	Tf	8,3±0,3	7,9±0,1	90±0	0,9±0,0
	Agua de Poro	Ti	8,7±0,0	9,3±0,0	170±0	9,0±1,1
	Agua de Poro	Tf	7,8±0,3	8,8±0,1	180±0	0,2±0,1
PRIMAVERA 2010	MHW	Ti	8,6±0,0	7,9±0,1	90±0	0,0
	MHW	Tf	8,0±0,0	7,6±0,1	90	1,2
	Agua de Poro	Ti	8,2±0,1	8,8±0,0	150±0	7,8±0,0
	Agua de Poro	Tf	6,1±0,5	8,5±0,1	140	0,3
VERANO 2011	MHW	Ti	8,4±0,0	7,3±0,0	90±0	0,0
	MHW	Tf	8,4±0,0	7,8±0,0	90±0	1,9±0,1
	Agua de Poro	Ti	8,3±0,0	9,0±0,1	150±10	7,0±1,1
	Agua de Poro	Tf	8,3±0,0	9,0±0,1	150±10	0,0±0,0
OTOÑO 2011	MHW	Ti	8,4±0,0	8,2±0,0	100±0	0,0
	MHW	Tf	8,7±0,0	8,8±0,1	90±10	1,5±0,2
	Agua de Poro	Ti	8,3±0,0	9,4±0,0	240±10	11,0±0,0
	Agua de Poro	Tf	8,6±0,2	8,1±0,2	230±20	0,1±0,0
PRIMAVERA 2011	MHW	Ti	8,2±0,0	8,2±0,1	90±0	0,0
	MHW	Tf	7,9±0,0	8,1±0,1	110±10	2,6±0,2
	Agua de Poro	Ti	7,9±0,2	9,0±0,1	170±0	11,0±1,1
	Agua de Poro	Tf	7,7±0,1	9,0±0,0	190±10	0,1±0,0

Tabla 8.8: Parámetros fisicoquímicos en agua sobrenadante registrados a tiempo inicial y final de ensayo (n=1-3).

Los porcentajes de sobrevivencia de los controles estuvieron siempre por encima del 90%, cumpliendo con los criterios de aceptabilidad. No se registraron diferencias significativas para este parámetro entre los animales expuestos a agua de poro en los diferentes experimentos, respecto de su correspondiente grupo control (Tabla 8.9).

Tratamientos	Control	La Choza
Verano 2010	97±6	100±0
Invierno 2010	98±5	95±6
Primavera 2010	93±6	93±6
Verano 2011	97±6	100±0
Otoño 2011	93±6	70±17
Primavera 2011	90±0	100±0

Tabla 8.9: Sobrevivencia (%) ± DE a tiempo final de ensayo (n=3-4) de juveniles de *H. curvispina* expuestos a MHW y agua de poro.

En relación a los controles, en ningún ensayo se observó un efecto adverso por exposición a agua de poro sobre la biomasa de los anfípodos (Fig. 8.8). En los ensayos de V 2010 e I 2010 los animales expuestos tanto a MHW como a agua de poro incrementaron su peso significativamente en relación al grupo inicial, mientras que en el resto de los experimentos no hubo diferencias significativas (Tablas 84, 87, 90, 93, 96 y 99 Anexo I).

Con respecto a la longitud, se observó una respuesta diferencial entre los distintos ensayos (Fig. 8.9 y Tablas 85, 88, 91, 94, 97 y 100 Anexo I). En los experimentos realizados en I 2010 y V 2011, se observó un incremento de este parámetro en relación al grupo inicial, tanto de los individuos control como de los expuestos a agua de poro, pero no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Los animales del grupo control del ensayo de V 2010 crecieron significativamente en relación al grupo inicial, pero no hubo diferencias significativas con los expuestos a agua de poro. En los ensayos de P 2010 y O 2011 no hubo diferencias significativas entre tratamientos, ni en relación al tiempo inicial de ensayo. Finalmente, en P 2011 se observó que tanto los anfípodos controles como los expuestos a agua de poro se diferenciaron significativamente del grupo inicial, y a su vez hubo diferencias entre los dos grupos tratados, incrementando en mayor medida en longitud los animales expuestos a agua de poro.

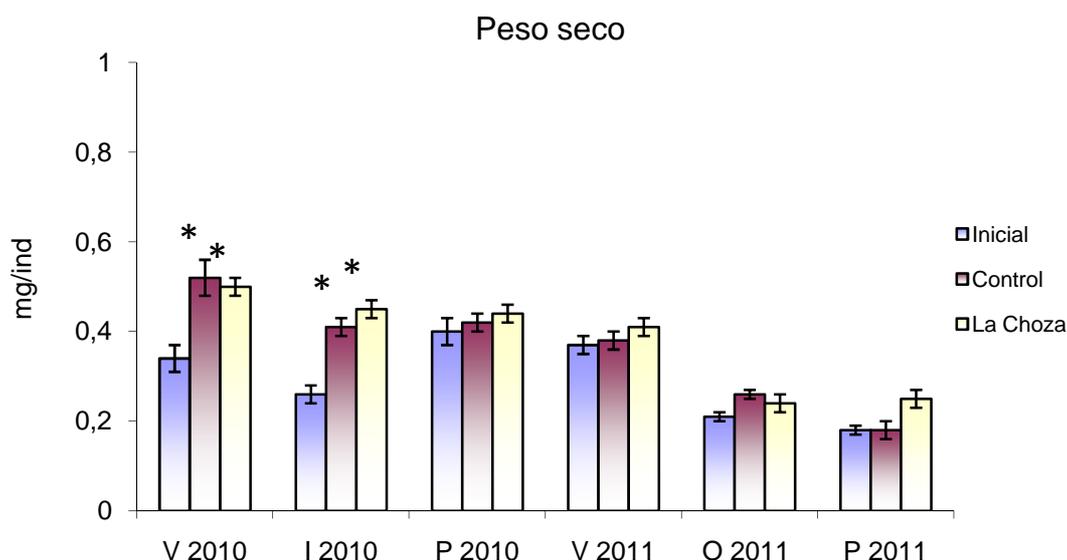


Figura 8.8: Peso seco promedio \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en MHW y agua de poro (V: verano; I: invierno; P: primavera; O: otoño) (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

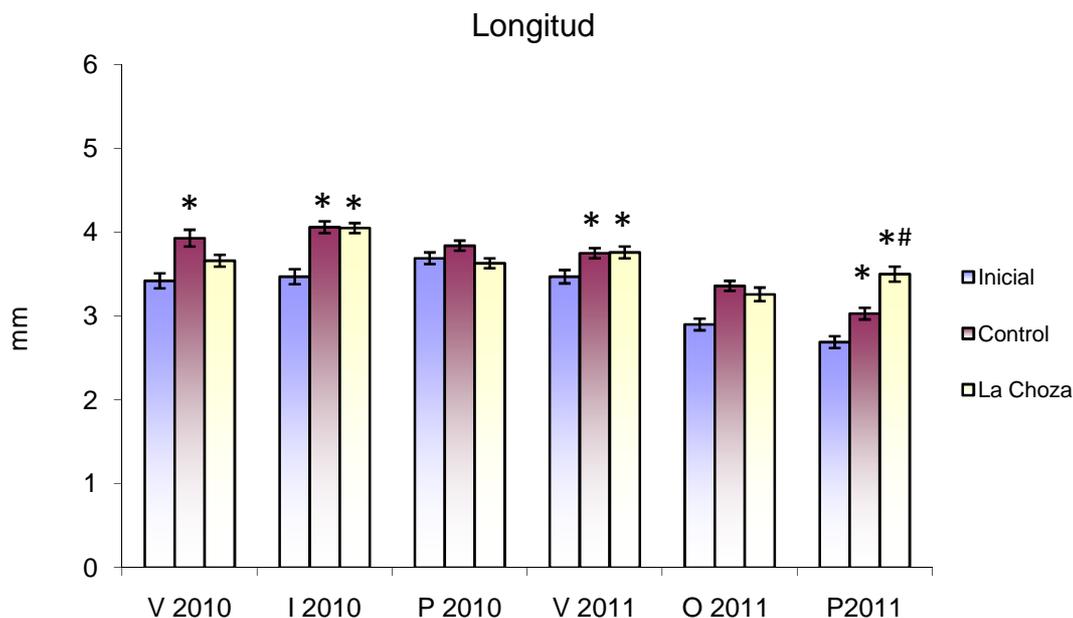


Figura 8.9: Longitud promedio \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en MHW y agua de poro (V: verano; I: invierno; P: primavera; O: otoño) (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

Con respecto al IMC (Fig. 8.10) también se observó una respuesta diferencial entre ensayos (Tablas 86, 89, 92, 95, 98 y 101 Anexo I). En los experimentos de V 2010 e I 2010 se observó un IMC significativamente mayor tanto en los controles como en los animales expuestos a agua de poro, en relación a sus correspondientes grupos iniciales, indicando un mejor estado de salud de los animales a tiempo final de exposición. En P 2010 si bien no se observaron diferencias significativas entre el grupo inicial y el control, el IMC de los animales expuestos a agua de poro fue significativamente más elevado que a tiempo inicial.

En los experimentos de O 2011 y P 2011 los animales del grupo inicial mostraron un IMC mayor al de los grupos controles y tratados, indicando un deterioro del estado general de los animales expuestos durante 10 días a MHW y agua de poro. En el ensayo de V 2011 también se observó un mayor IMC del grupo inicial en relación al control.

Con respecto a la diferencia en este parámetro entre los grupos controles y los expuestos a agua de poro, sólo se observaron diferencias significativas en los ensayos de V 2010, I 2010 y P 2010, siendo mayor el IMC de los animales ensayados con agua de poro.

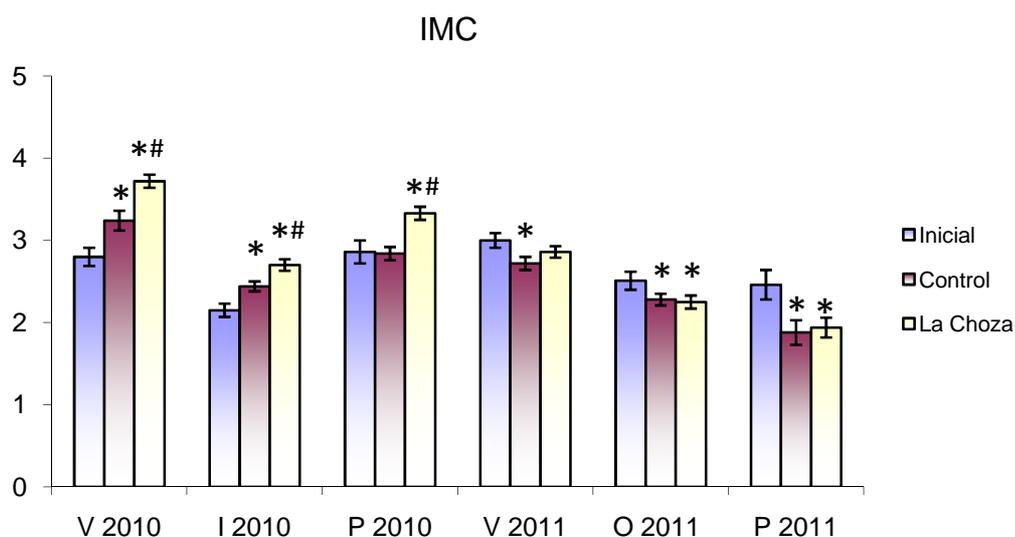


Fig. 8.10: Índice de masa corporal (IMC) \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en MHW y agua de poro (V: verano; I: invierno; P: primavera; O: otoño) (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

Para cada estación del año evaluada no hubo diferencias significativas en cuanto a longitud (parámetro que se utilizó para seleccionar los individuos experimentales) entre los grupos iniciales de los ensayos con sedimento completo y agua de poro. Esto es esperable dado que provienen del mismo *pool* de aclimatación. A su vez, no se detectaron diferencias significativas en el IMC de los grupos iniciales de todos los ensayos realizados, a excepción del IMC del grupo inicial del ensayo de I 2010, que fue significativamente menor y se diferenció de los IMC de los grupos iniciales de V 2010, P 2010 y V 2011. Sin embargo, es de esperar que el IMC de dicho grupo sea menor, considerando que los animales provienen de un cultivo *outdoor* y fueron colectados durante el invierno, época del año con menor disponibilidad de alimento y condiciones climáticas adversas en este tipo de cultivos.

Análisis del IMC discriminando los datos en función del origen de los animales

A diferencia de lo observado en los ensayos con sedimento completo donde en todos los casos, independientemente del origen de los animales, los controles incrementaron su IMC en comparación al tiempo inicial, en los experimentos con agua de poro sólo en los anfípodos provenientes de cultivos *outdoor* se observó el mismo efecto, aunque

en un porcentaje mucho menor (incremento del 13%). En el caso de los animales provenientes de cultivos *indoor* se observó una disminución del 11% en el IMC de los controles en relación al tiempo inicial de ensayo, mientras que en los animales obtenidos en primera generación de cultivos *indoor* no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 8.11). En los animales expuestos a agua de poro, sólo se observó un incremento significativo del 29% en relación al grupo inicial en los animales provenientes de cultivos *outdoor*. Este grupo a su vez presentó un IMC significativamente superior al de su correspondiente grupo control. Los animales expuestos a agua de poro provenientes de los dos orígenes restantes no se diferenciaron de sus respectivos controles (Fig. 8.11). Los resultados del análisis estadístico se encuentran en las Tablas 105, 106 y 107 del Anexo I.

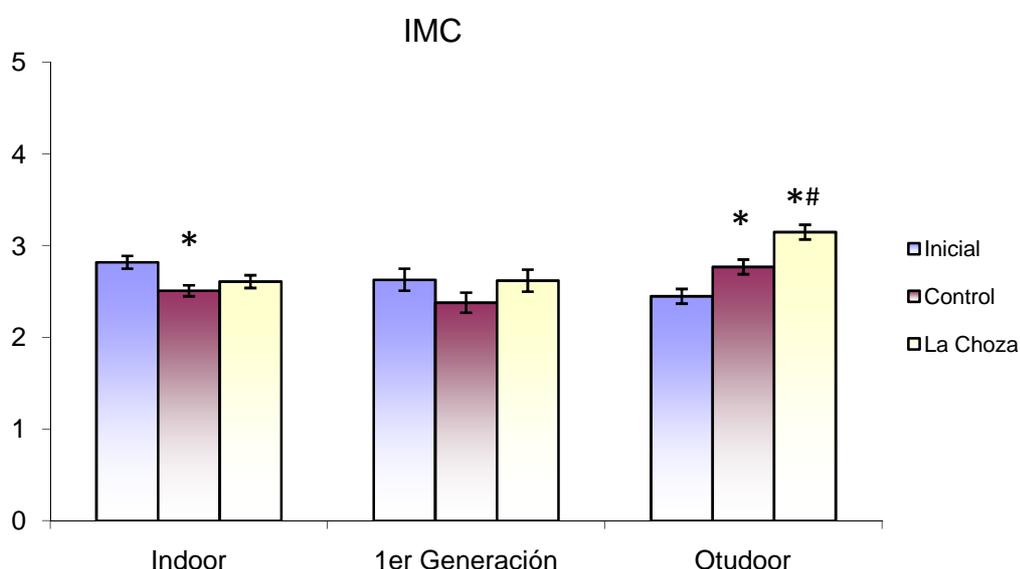


Figura 8.11: Índice de masa corporal (IMC) promedio \pm EEM de juveniles de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en MHW y agua de poro según el origen de los animales. (*) indica diferencias significativas con el grupo inicial; (#) indica diferencias significativas con el grupo control.

8.4.2 Ensayos biomarcadores

Los parámetros fisicoquímicos del agua sobrenadante se muestran en la Tabla 8.10. Estos parámetros no mostraron una marcada variación entre las muestras de verano y primavera. Con excepción del nitrógeno amoniacal, los parámetros estuvieron dentro del rango aceptable para condiciones de bioensayo estándar (USEPA, 2000; EC, 2013). Las concentraciones de N-NH_4^+ mostraron variabilidad entre controles, pero

con valores dentro del rango aceptable para la supervivencia de *H. curvispina* (ítem 4.4 capítulo 4 y Anexo II).

		OD (mg/L)	pH	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	N
Bioensayo Verano 2010						
Ti	Control	7,7 ± 0,6	8,3 ± 0,1	140 ± 10	0,2 ± 0,1	4-5
	La Choza	6,6 ± 0,5	8,1 ± 0,1	110 ± 0	6,9 ± 0,6	4-5
Tf	Control	5,0 ± 1,0	8,4 ± 0,1	300 ± 30	6,1 ± 1,0	4-5
	La Choza	4,8 ± 0,4	8,5 ± 0,1	170 ± 10	0,3 ± 0,1	4-5
Bioensayo Primavera 2010						
Ti	Control	7,0 ± 0,8	8,0 ± 0,2	160 ± 0	3,0 ± 0,3	2-5
	La Choza	7,9 ± 0,1	8,2 ± 0,0	90 ± 0	5,9 ± 0,5	2-5
Tf	Control	8,2 ± 0,1	8,8 ± 0,0	260 ± 20	6,5 ± 0,3	2-5
	La Choza	8,0 ± 0,3	8,5 ± 0,0	130 ± 10	5,9 ± 1,1	2-5

Tabla 8.10: Parámetros fisicoquímicos en el OW en sedimentos control y La Choza registrados a tiempo inicial y final de ensayo. Valores expresados como media ± SD; n: número de determinaciones; Ti: tiempo inicial; Tf: tiempo final.

La Tabla 8.11 muestra el resumen de los valores de los biomarcadores y las relaciones relativas entre los grupos control (Las Flores) y los expuestos al sedimento de La Choza, para ambos bioensayos. Se observaron diferencias en las actividades de CAT, SOD y ETS en las muestras correspondientes a los controles. Sin embargo, aunque la respuesta diferencial entre controles fue evidente, en los grupos expuestos al sedimento de La Choza y sus respectivos controles, se observó un incremento significativo en la actividad antioxidante y el daño oxidativo. También hubo una reducción en la actividad de ETS. Debido al *background* de variación estacional en la respuesta bioquímica de *H. curvispina* (Dutra *et al.*, 2008) y los diferentes *stock* de *pooles* de animales utilizados, la evaluación de la respuesta al sedimento de La Choza fue relativa a su control concurrente.

En las pruebas de primavera y verano, la actividad de CAT y SOD y los niveles de TBARS incrementaron en los animales expuestos al sedimento de La Choza en magnitudes comparables. La actividad CAT en los sedimentos de La Choza mostró un incremento de 1,4 - 1,6 veces en relación al control. SOD incrementó 9,7 veces (verano) y 5,3 veces (primavera), y TBARS aumentó 3,2 - 3,4 veces en primavera y verano, respectivamente. En relación al control, la actividad de ETS en los grupos de

La Choza disminuyó a una tasa de 0,6. Con excepción de SOD, que fue más activa durante el ensayo de verano, no hubo diferencias significativas entre ensayos en los biomarcadores.

Se evidenció un incremento en el daño oxidativo y en las defensas antioxidantes en los grupos expuestos al sedimento de La Choza. Además, cambios en la actividad de ETS mostraron una depresión de la actividad metabólica en animales expuestos al sedimento de La Choza.

Bioensayo Verano 2010				
	Control	La Choza	La Choza/Control	n
CAT ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg Prot}$)	29,64 \pm 4,15	47,57 \pm 5,61(*)	1,6	5
SOD (U/mg Prot)	15,37 \pm 1,45	149,32 \pm 53,39(*)	9,7	5
TBARS (nmol/mg de Prot)	6,14 \pm 0,55	19,68 \pm 2,89(*)	3,2	5
ETS ($\mu\text{l de O}_2/\text{mgww}/\text{h}$)	2,37 \pm 0,08	1,56 \pm 0,60(*)	0,65	20
Bioensayo Primavera 2010				
	Control	La Choza	La Choza/Control	n
CAT ($\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg Prot}$)	36,30 \pm 0,77	51,21 \pm 1,11(*)	1,4	5
SOD (U/mg Prot)	6,69 \pm 0,20	35,23 \pm 1,85(*)	5,3	5
TBARS (nmol/mg Prot)	5,09 \pm 0,25	17,22 \pm 0,39(*)	3,4	5
ETS ($\mu\text{l de O}_2/\text{mgww}/\text{h}$)	1,26 \pm 0,48	0,89 \pm 0,49(*)	0,7	20

Tabla 8.11: Puntos finales medidos sobre juveniles de *H. curvispina* en los ensayos de biomarcadores a tiempo final de exposición. Valores expresados como media \pm DE, n: número de determinaciones. (*) diferencias significativas respecto del control ($p < 0,05$).

8.5 Discusión

Situado en la cuenca alta del río Reconquista, el arroyo La Choza proporciona la mayor carga contaminante al cauce del río. Ello es principalmente consecuencia de la descarga de aguas residuales desde una planta de tratamiento como también desde de un pequeño parque industrial ubicado cerca de la desembocadura del arroyo. En este sitio se emplazan, entre otras, una industria agroquímica y un establecimiento de faena de aves de corral, que descargan de forma continua efluentes en el arroyo. Los estudios en este sitio mostraron elevados valores de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5) y de sólidos en suspensión indicando contaminación orgánica (Rigacci *et al.*, 2013).

La composición del sedimento de los arroyos La Choza y Las Flores resultó comparable al de los restantes cursos de agua de la región, a causa de la semejanza de los sustratos geológicos.

La exposición a sedimentos del arroyo La Choza no afectó significativamente la sobrevivencia de *H. curvispina* en relación a los controles. Cuando la supervivencia fue evaluada como punto final en pruebas de toxicidad de sedimentos en estudios previos, esta especie probó ser sensible a la contaminación por metales (Peluso *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012). Aunque los sedimentos del arroyo La Choza presentaron una elevada polución microbiológica, particularmente de coliformes fecales (López *et al.*, 2013), los sedimentos colectados para este estudio resultaron en niveles bajos de contaminación por metales (Tabla 8.4), lo que podría explicar parcialmente el bajo efecto sobre la sobrevivencia de los anfípodos. El contenido de pesticidas organoclorados y organofosforados estuvo por debajo del límite de detección. Estos resultados sugieren que bajo nuestras condiciones experimentales la supervivencia de *H. curvispina* no fue un punto final sensible.

Los parámetros de crecimiento determinados permitieron observar efectos sobre los anfípodos por exposición al sedimento del arroyo La Choza. Al emplear la longitud como parámetro evaluador de efecto, se observaron diferencias entre el sedimento control y el proveniente del arroyo La Choza en dos de los ensayos realizados (I 2010 y V 2011), en tanto que con la biomasa, además, se determinaron diferencias entre ambos tratamientos en P 2010. Sin embargo, el IMC (que integra los dos parámetros anteriores) resultó el parámetro más efectivo, dado que se obtuvieron diferencias significativas entre los anfípodos expuestos a ambos sedimentos en cuatro de los ensayos realizados (I 2010, V 2011, P 2011 y O 2011). Por lo tanto el IMC permitió

una discriminación más efectiva entre tratamientos que la longitud y la biomasa evaluadas por separado. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en los capítulos 5 y 6 del presente trabajo.

Sin embargo, los resultados de estos experimentos deben analizarse tomando en consideración no solo la muestra evaluada sino la capacidad de respuesta de los organismos de ensayo en función de su estatus fisiológico (*fitness*) dependiente, en parte, de la estacionalidad y las condiciones de cultivo. La estacionalidad resulta una variable ineludible en organismos procedentes de cultivos *outdoor* (V 2010 e I 2010), pero asemeja con mayor realismo situaciones de campo. Varios estudios han demostrado en anfípodos colectados en campo una alta variabilidad temporal en la respuesta a diferentes tóxicos (Kater *et al.*, 2000; Menchaca *et al.*, 2010). Asumiendo que el grado de contaminación de las muestras de sedimento del arroyo La Choza fue relativamente comparable entre sí (Tablas 8.2, 8.3, 8.4, 8.5 y 8.10) la respuesta diferencial en el crecimiento de los organismos debe enfocarse sobre su capacidad homeostática. En el presente estudio, los animales ensayados en V 2010 e I 2010, mostraron una respuesta diferencial en cuanto a los parámetros de crecimiento. En el ensayo de verano los animales de los grupos control y expuestos incrementaron su longitud, biomasa e IMC de manera comparable. Por el contrario en el ensayo de invierno, se determinaron diferencias significativas en los tres parámetros evaluados entre ambos grupos experimentales (Figs. 8.4, 8.5 y 8.6). Estos resultados sugieren un mayor nivel de vulnerabilidad de los animales colectados de cultivos *outdoor* durante el invierno, época del año con menor disponibilidad de alimento y condiciones climáticas adversas en este tipo de cultivos.

En relación al efecto de las condiciones de cultivo (laboratorio vs. campo) sobre la sensibilidad de los anfípodos a diversos poluentes, en la literatura se observa una amplia variabilidad de respuesta. Robinson *et al.* (1988) informaron que los anfípodos (*R. abronius*) cultivados en laboratorio fueron más sensibles a cadmio que individuos colectados del campo. Meador (1993) también reportó que anfípodos cultivados en laboratorio y expuestos a Cd presentaron una mayor sensibilidad (menor CL50) comparada con anfípodos colectados en el campo. En ese estudio el incremento en la sensibilidad de los anfípodos provenientes de cultivo correlacionó con una reducción en los niveles de lípidos. En contraste, otros estudios informaron que la sensibilidad de los anfípodos cultivados en laboratorio a cadmio (*Ampelisca abdita* y *Corophium multisetosum*) y a amonio (*Corophium volutator*) fue comparable a la de los animales recolectados en campo (Redmond *et al.* 1994; Peters & Ahlf 2005; Ré *et al.* 2009). El mismo resultado fue informado por Kater *et al.* (2000) en ensayos realizados con C.

volutator expuestos a Cd. Al comparar la sensibilidad de *C. multisetosum* cultivado en laboratorio con individuos recolectados en el campo mediante exposición a sedimentos con diferente grado de contaminación, Menchaca *et al.* (2010) observaron que los anfípodos provenientes de laboratorio presentaron menor mortalidad que los de campo, siendo por lo tanto, menos sensibles.

Si se considera el IMC como parámetro integrador del estado general de los animales, en nuestros resultados se observó una respuesta relativamente similar entre los anfípodos cultivados en condiciones de laboratorio (*indoor*) y los provenientes de primera generación de cultivos *indoor*. En tres de los cuatro ensayos (P 2010, V 2011 y O 2011) se observó una respuesta diferencial entre los animales de los grupos control y expuestos. En cuanto al ensayo de P 2011, si bien la diferencia no resultó significativa, se observó la misma tendencia que en el resto de los experimentos (Fig. 8.6). Como se mencionó previamente, en el caso de los cultivos *outdoor* la respuesta a su vez se vio afectada por la estacionalidad.

Debe considerarse que el uso de anfípodos provenientes de cultivos *outdoor* conlleva una serie de inconvenientes. En primer lugar, dependiendo de la época del año, la densidad de organismos requerida para los bioensayos puede no estar disponible debido a su ciclo biológico y no es factible obtener cohortes para ensayos. Es decir que el material biológico si bien es más comparable a las poblaciones silvestres, permitiendo así obtener respuestas más realistas, ello es en detrimento de la estandarización de los protocolos de ensayo y el aumento de variabilidad de respuestas inter e intralaboratorio.

En relación a los experimentos con agua de poro, en ninguno de los ensayos realizados se observó mortalidad significativa en relación al control, y a diferencia de los resultados obtenidos en los experimentos realizados con sedimento completo, tampoco se registraron efectos sobre los parámetros de crecimiento. Debe considerarse que los ensayos de toxicidad con agua de poro no evalúan la toxicidad causada por la ingesta de sedimentos que es una ruta de exposición importante para algunos organismos (Lee B-G *et al.*, 2000; King *et al.*, 2005). Las pruebas de toxicidad con sedimento completo son ambientalmente más realistas que las de agua de poro, dado que la estructura de los sedimentos es relativamente mantenida y todas las rutas de exposición, incluidas el agua sobrenadante, el agua de poro, las partículas de sedimento y el alimento están presentes (Lee B-G *et al.*, 2000, Simpson *et al.*, 2004). A su vez también debe considerarse que al analizar los resultados considerando el cultivo de origen de los animales, en los experimentos realizados con agua de poro,

los controles incrementaron su IMC en comparación al tiempo inicial, sólo en los ensayos realizados con anfípodos provenientes de cultivos *outdoor*. Contrariamente, en los experimentos realizados con sedimento completo, en todos los casos el IMC incrementó en los controles en relación al tiempo inicial (siendo mayor en los anfípodos provenientes de cultivos *outdoor*). Por lo tanto esta especie resulta más apropiada para la realización de bioensayos en matriz sólida y esto podría influir en la ausencia de respuesta y en la variabilidad observada en estos ensayos.

Aun cuando no se obtienen efectos estadísticamente significativos con ensayos tradicionales, respuestas subletales pueden ser detectadas por medio de biomarcadores. Los dos ensayos evaluados (Verano 2010 y Primavera 2010) fueron realizados con juveniles de *H. curvispina* bajo idénticas condiciones experimentales después de un periodo de aclimatación, pero el *pool* de organismos usados en cada caso difirió en su origen. En el ensayo de primavera, los animales provinieron de cultivo *indoor* (primera generación), mientras que los animales empleados en el ensayo de verano provinieron de cultivos *outdoor*.

En el ensayo de verano los animales de los grupos control y expuestos incrementaron su longitud, biomasa e IMC de manera comparable. Por el contrario en el ensayo de primavera, ambos grupos, control y expuestos, no incrementaron en longitud sugiriendo ausencia de ecdisis durante el periodo experimental; solo los controles incrementaron en peso y presentaron un IMC significativamente más elevado que los anfípodos ensayados con sedimento del arroyo La Choza (Figs. 8.4, 8.5 y 8.6). Estos resultados sugieren un mayor nivel de vulnerabilidad de los animales provenientes de cultivo *indoor*.

En relación a los biomarcadores de estrés oxidativo, en el ensayo de verano los controles mostraron una actividad antioxidante más elevada que en los controles de primavera pero, no se observaron diferencias significativas en los valores de TBARS en relación a un posible daño oxidativo (ver Tabla 8.11). Estos resultados llevan a preguntarse acerca de la representatividad de la respuesta a nivel poblacional y destacan la dificultad de establecer líneas de base confiables para estos biomarcadores. La información acerca de los efectos de la polución sobre el estrés oxidativo en anfípodos no es muy abundante. Los trabajos de Timofeyev *et al.* (2006 a, b) con cinco especies de anfípodos del Lago Baikal evaluaron el potencial estrés oxidativo de la materia orgánica y demostraron un incremento significativo en la peroxidación lipídica y la actividad de catalasa. En otro estudio (Timofeyev & Steinberg, 2006) evaluaron la respuesta del estrés oxidativo en especies con hábitats

divergentes del mismo lago (especies que habitan en aguas poco profundas y en aguas profundas). Ellos hallaron una respuesta diferencial entre especies habitantes de la zona litoral y las de profundidad y concluyeron que el ambiente estable de las zonas profundas no prevé presión o estrés suficiente para generar respuestas de defensa antioxidante. Ellos también evaluaron una posible especificidad en sistemas antioxidantes entre especies paleárticas versus endémicas concluyendo que la diferencia en la actividad enzimática depende con mayor probabilidad de variaciones interespecíficas más aún que de las condiciones ambientales específicas. Este es un importante tópico que debe ser estudiado a futuro. Por otro lado, Timofeyev *et al.* (2009) mostró que la duración del período de aclimatación puede alterar los patrones de respuesta. Esto debe ser considerado cuando se diseñan estudios en laboratorio utilizando animales provenientes del ambiente natural. Curiosamente, la exposición de anfípodos a los contaminantes puede desencadenar una respuesta anticipatoria para superar el estrés oxidativo mediante la actividad de la SOD. Estos resultados enfatizan la importancia de entender las interacciones entre respuesta antioxidante a diferentes estresores y mecanismos fisiológicos de daño oxidativo (Gorokhova *et al.*, 2013).

La actividad SOD en juveniles de *H. curvispina* fue comparable a la obtenida para juveniles de otros anfípodos, poliquetos, bivalvos, decápodos y equinodermos (Correia *et al.*, 2002). Los mismos autores reportaron mucha más variabilidad entre especies para actividad CAT con hasta dos órdenes de magnitud de diferencia. Los valores de CAT observados en *H. curvispina* en este estudio fueron cercanos a los publicados para otros crustáceos (Correia *et al.*, 2003). Anguiano *et al.* (2012) recientemente observaron un incremento significativo de la actividad de CAT en *H. curvispina* expuesta al pesticida orgsnofosforado metil azinpho.

Es importante tener en consideración que la producción de ROS puede ocurrir por exposición a contaminantes, pero también se producen durante la respiración aeróbica; por lo tanto, una elevada actividad metabólica puede resultar en elevados niveles de ROS (Hoguet & Key, 2008). Respecto a la variabilidad de respuestas, la variación estacional de los parámetros biológicos dentro de las poblaciones no debe descartarse. Incluso, cultivos criados durante generaciones en el laboratorio no están completamente “silenciados”. Dutra *et al.* (2007, 2008) informaron variaciones metabólicas estacionales en *Hyalella*. Las pruebas en estos estudios fueron realizadas durante una etapa metabólicamente activa y en el periodo del año durante el cual las poblaciones naturales tiene máxima biomasa (Poretti *et al.*, 2003; García, 2009). Es

posible, por lo tanto, que los anfípodos juveniles en este estudio hayan estado sujetos a una mayor competencia por el alimento y el sustrato.

A pesar de la variabilidad observada entre ambos ensayos, la magnitud de la diferencia en la respuesta relativa de los biomarcadores a sus controles concurrentes fue comparable (Tabla 8.11).

Los animales expuestos al sedimento de La Choza mostraron alta actividad antioxidante debido al incremento de la actividad de CAT y SOD, acompañada de altos niveles de peroxidación lipídica.

La actividad del sistema de transporte de electrones (ETS) demuestra una disminución significativa de la actividad metabólica de los animales expuestos a los sedimentos prueba. Los valores de ETS observados en este estudio fueron comparables a aquellos reportados para otros anfípodos, dafnias y anostrácodos (Simčić & Brancelj, 2003, 2004; Simčić *et al.*, 2005, 2012). La determinación de ETS es factible de realizar en pequeñas muestras de tejido individual y es un parámetro promisorio para incluir como biomarcador del estado metabólico en bioensayos estándar con anfípodos. La diferencia entre nuestros dos controles representa una clara indicación de la variabilidad no relacionada al tratamiento, y es probablemente el resultado del diferente *fitness* del *pool* de organismos usados en ambos casos; los valores más elevados de ETS de los animales del *pool* del ensayo de verano podrían confirmar esta apreciación (Tabla 8.11).

Es importante notar que los parámetros subletales (longitud y biomasa) y los biomarcadores mostraron una variabilidad significativa que puede ser atribuida a otras razones más que a la exposición al estresor. Por lo tanto, se requiere de otros parámetros que evalúen objetivamente la calidad de las muestras ambientales con interpretaciones inequívocas que puedan ser usados en estudios de evaluación de monitoreo ambiental. Independientemente de la posible cuantificación de diferentes agentes tóxicos, es difícil establecer relaciones de causa-efecto para los organismos prueba. Así, es crucial establecer programas de monitoreo que incluyan parámetros que puedan extrapolar razonablemente los resultados de ensayos realizados en condiciones experimentales de laboratorio a condiciones naturales. En resumen, los anfípodos tienen muchos factores que complican la selección de biomarcadores de toxicidad. En crustáceos, factores tales como diferencias filogenéticas entre taxas, actividad locomotora, tamaño corporal, morfogénesis y ciclo de muda tienen impacto sobre el metabolismo. Existe también el impacto de las variables ambientales, tal como el estado nutricional, pH, temperatura, salinidad y presión osmótica (Anger, 2001). Sin embargo, los biomarcadores son importantes en investigación toxicológica

debido a que ayudan en general a la evaluación de riesgo y pueden ser usados como una señal de alerta temprana (Hoguet & Key, 2008).

Conforme a la literatura y a los datos provistos en este estudio, bajo nuestras condiciones experimentales, *H. curvispina* resultó una especie principalmente recomendable para bioensayos ecotoxicológicos con muestras de sedimentos naturales.

En relación a los parámetros bioquímicos, se propone como práctica estándar la expresión de los resultados en valores relativos a los controles concurrentes. Los biomarcadores medidos representan un primer registro para juveniles de *H. curvispina* expuestos a sedimentos contaminados bajo condiciones estandarizadas de laboratorio. Si bien es necesario profundizar tanto en la evaluación de respuestas subletales como en el conocimiento biológico de la especie, en campo y en laboratorio, el uso de estos parámetros demuestra una mayor sensibilidad y un más preciso ajuste de evaluación de efectos que el obtenido por el ensayo estándar de sobrevivencia y crecimiento, y se revelan más contundentes en relación a la evaluación de efectos proponiéndose su implementación en estudios de biomonitoreo de sedimentos.

CAPITULO 9

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA RESPUESTA DE LOS ORGANISMOS DE ENSAYO EN SITUACIONES CONTROL: APORTES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UNA LINEA DE BASE

9.1 Introducción

Durante el desarrollo de esta tesis, se estandarizaron y optimizaron las condiciones de cría de los organismos prueba y se realizaron un total de 34 bioensayos, en diferentes matrices, con animales de disímil origen de cultivo y de diferentes edades. El análisis del total de los ensayos permite una visión global acerca de las respuestas de estos animales en el contexto de ensayos de ecotoxicidad, que se discuten de manera detallada en los capítulos correspondientes. Dicho análisis, además aporta necesariamente un bagaje de información acerca del estado “óptimo” o “saludable” de los organismos de ensayo en condiciones de control.

En este capítulo se han agrupado los controles de los distintos ensayos para su análisis a fin de aportar información biológica sobre la especie prueba, establecer líneas de base para diferentes puntos finales y así contribuir a la normatización de bioensayos de ecotoxicidad, con anfípodos nativos, disminuyendo la incertidumbre de respuestas esperables en controles.

9.2 Objetivos

- Evaluar el estado general de los anfípodos expuestos a condiciones control en medio acuoso (MHW) y sedimento del arroyo Las Flores (SED), mediante el IMC.

- Comparar las reservas energéticas de los grupos controles a tiempo final de ensayo en matriz acuosa (MHW) y sólida (SED).

9.3 Materiales y Métodos

La metodología empleada en la totalidad de los bioensayos fue descrita en el capítulo 3 y en los ítems Materiales y Métodos correspondientes a los capítulos 5, 6, 7 y 8.

Para las comparaciones realizadas se aplicó el *test* de Student (previa constatación de la normalidad y homocedasticidad de los datos) o la prueba de Wilcoxon. Se utilizó el Programa Infostat (Di Rienzo, 2012).

9.4 Resultados

9.4.1 Comparación del Índice de Masa Corporal entre grupos controles e iniciales

9.4.1.1 Ensayos en matriz acuosa

Los resultados que se muestran a continuación forman parte de los experimentos presentados en el **Capítulo 5** y corresponden a los controles de los siguientes ensayos realizados con *Hyalella curvispina*:

- Cd-1; ensayo con juveniles expuestos a Cd en medio acuoso (MHW).
- Cd-2; ensayo con machos jóvenes expuestos a Cd en medio acuoso (MHW).
- Cd-3; ensayo con machos mayores expuestos a Cd en medio acuoso (MHW).
- Cu-2; ensayo con juveniles expuestos a Cu en medio acuoso (MHW).
- Cu-3; ensayo con machos mayores expuestos a Cu en medio acuoso (MHW).

Se realizó la comparación del Índice de Masa Corporal (IMC) del grupo inicial (tiempo cero de ensayo) y el correspondiente a los controles luego de 10 días de exposición.

La Tabla 9.1 muestra los resultados de los análisis estadísticos para el parámetro considerado.

Ensayos	Control I vs C	p	Inicial (n)	Control (n)
Cd-1	T= 4,19 *	<0,001	49	75
Cd-2	W= 311,5	0,42	15	30
Cd-3	T= 0,32	0,75	20	33
Cu-2	W= 668,5	0,20	20	38
Cu-3	T= 0,01	0,99	20	15

Tabla 9.1: IMC de *H. curvispina* a tiempo inicial y luego de 10 días de exposición en matriz acuosa. Resumen de las significatividades estadísticas para cada ensayo. Para todos los experimentos, a excepción de Cd-3 y Cu-2 a los que se le aplicó la prueba de Wilcoxon, el IMC cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. T: estadístico de la prueba de T; W: estadístico de la prueba de Wilcoxon; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. I: grupo inicial; C: grupo control; (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la totalidad de los experimentos realizados en matriz acuosa, a excepción de los anfípodos utilizados en el Ensayo Cd-1, el IMC no mostró diferencias significativas entre el grupo inicial y los animales que permanecieron durante 10 días en MHW (controles) (Tabla 9.1 y Fig. 9.1 (A – E)).

El análisis de los resultados en función del estadio de la especie (Juveniles y Machos) y unificando la totalidad de los datos (*Todos los datos*) de los 5 experimentos realizados se muestra en la Tabla 9.2.

Ensayos	Control I vs C	p	Inicial (n)	Control (n)
Juveniles	T= 3,07 *	0,003	69	113
Machos	W= 3892	0,34	55	78
Todos los datos	T= 18770	0,30	124	191

Tabla 9.2: IMC de *H. curvispina* a tiempo inicial y luego de 10 días de exposición en matriz acuosa. Resumen de las significatividades estadísticas. Para todos los ensayos, a excepción de la comparación correspondiente a Machos a la que se le aplicó la prueba de Wilcoxon, el IMC cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. T: estadístico de la prueba de T; W: estadístico de la prueba de Wilcoxon; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. I: grupo inicial; C: grupo control; (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al unificar los datos según el estadio de *H. curvispina*, el IMC mostró un aumento significativo en juveniles a tiempo final de exposición (en tanto que para machos no se

detectan diferencias significativas. A su vez, el agrupamiento del total de datos encubre la diferencia registrada en juveniles (Tabla 9.2, Fig. 9.2 C).

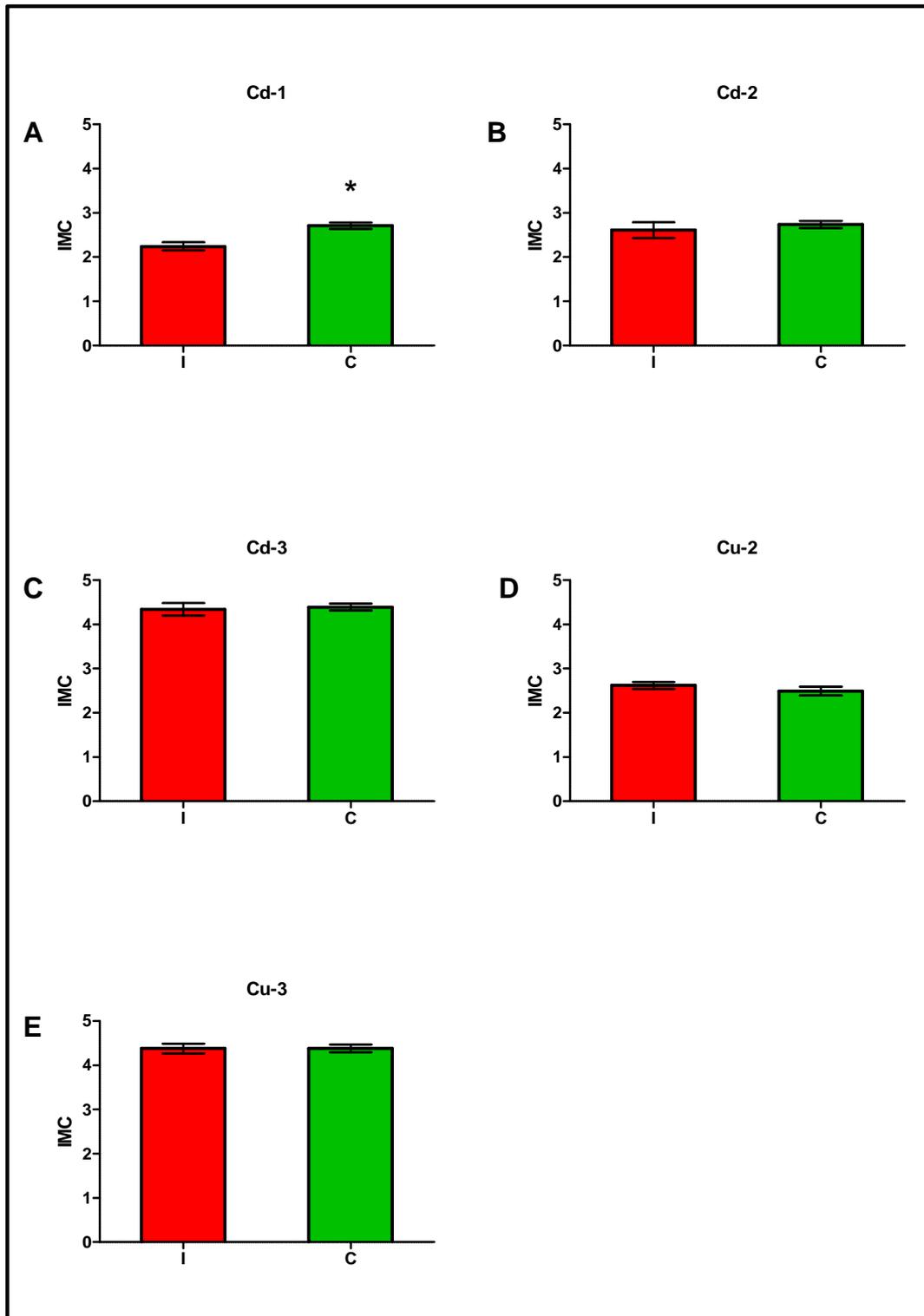


Figura 9.1: Índice de Masa Corporal (IMC) de los grupos iniciales (I) y controles (C) de los experimentos realizados en matriz acuosa (MHW) (A – E). Valores expresados como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre ambos grupos. Nivel de significancia $p < 0,05$.

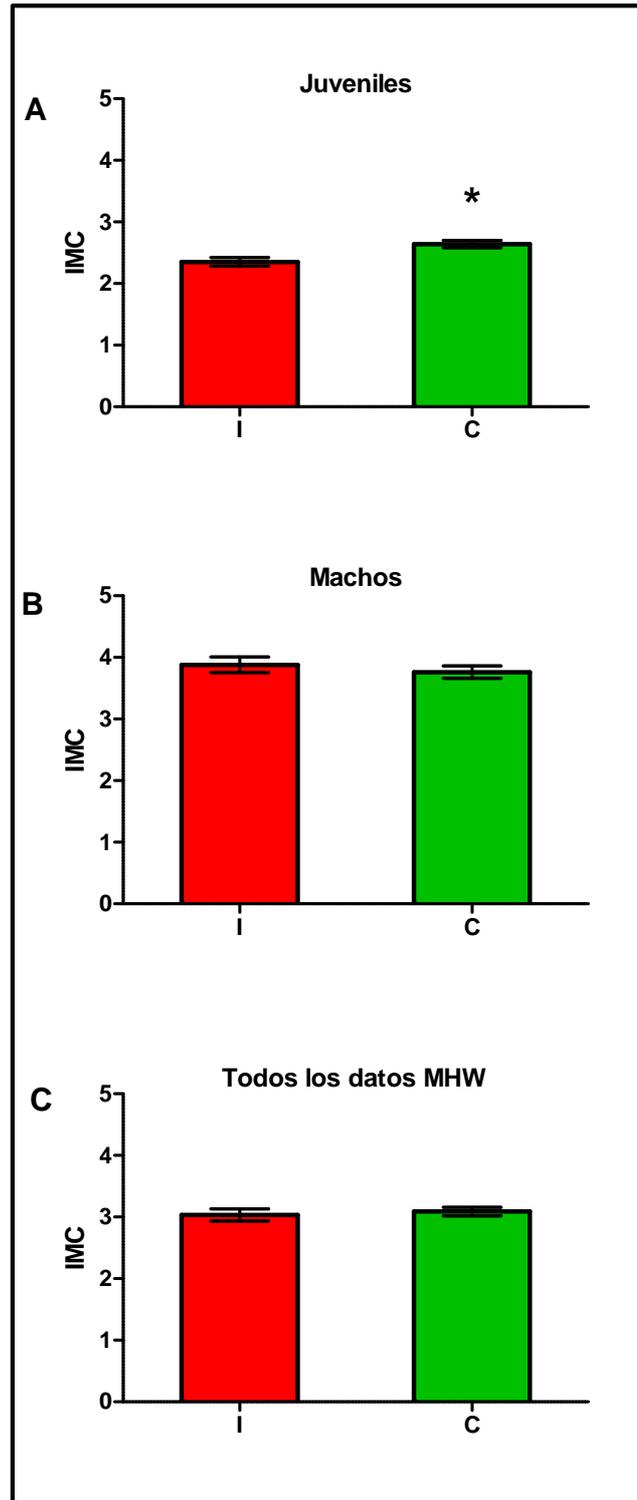


Figura 9.2: Índice de Masa Corporal (IMC) de los grupos iniciales (I) y controles (C) para juveniles (A), machos (B) y la totalidad de los datos (C) de los experimentos realizados en matriz acuosa. Valores expresados como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre ambos grupos. Nivel de significancia $p < 0,05$.

9.4.1.2 Ensayos en matriz sólida

Los resultados que se muestran a continuación forman parte de los experimentos presentados en el **Capítulo 6** y corresponden a los siguientes ensayos realizados con *Hyalella curvispina* (Hc) y *Hyalella pseudoazteca* (Hp):

- Cd-1; ensayo con juveniles de Hc expuestos a sedimento adicionado con Cd.
- Cd-2; ensayo con machos mayores de Hc expuestos a sedimento adicionado con Cd.
- Cu-1; ensayo con juveniles de Hc expuestos a sedimento adicionado con Cu.
- Cu-2; ensayo con machos mayores de Hc expuestos a sedimento adicionado con Cu.
- Cu-3; ensayo con juveniles de Hp expuestos a sedimento adicionado con Cu.
- Cu-4; ensayo con machos de Hp expuestos a sedimento adicionado con Cu.

Se realizó la comparación del Índice de Masa Corporal (IMC) del grupo inicial (tiempo cero de ensayo) y el correspondiente a los controles luego de 10 días de exposición. La tabla 9.3 muestra los resultados de los análisis estadísticos para el parámetro considerado.

Ensayos	Control I vs C	p	Inicial (n)	Control (n)
Cd-1	T=1,99 *	0,040	48	62
Cd-2	T= 5,25 *	<0,001	22	33
Cu-1	T= 5,99 *	<0,001	28	33
Cu-2	T= -1,05	0,30	15	35
Cu-3	T= 2,48 *	0,02	29	41
Cu-4	T= 2,89 *	0,006	13	36

Tabla 9.3: IMC de *H. curvispina* y *H pseudoazteca* a tiempo inicial y luego de 10 días de exposición en sedimento control. Resumen de las significatividades estadísticas. En todos los ensayos el IMC cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. T: estadístico de la prueba de T; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. I: grupo inicial; C: grupo control; (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

El IMC mostró diferencias significativas entre los animales del grupo control y sus correspondientes grupos iniciales en cinco de los seis experimentos realizados utilizando sedimento como matriz de ensayo (Tabla 9.3, Fig. 9.3 (A - F)).

Se analizaron los resultados considerando los datos en función del estadio de la especie utilizada (Juveniles y Machos) y unificando la totalidad de los datos (*Todos los datos*) de los 4 experimentos realizados con *H. curvispina*.

La tabla 9.4 muestra los resultados de los análisis estadísticos para el parámetro considerado.

Ensayos	Control I vs C	p	Inicial (n)	Control (n)
Juveniles	T= 3,89 *	<0,001	76	95
Machos	T= 2,05 *	0,04	37	68
Todos los datos	W= 13038 *	<0,001	113	163

Tabla 9.4: IMC de *H. curvispina* a tiempo inicial y luego de 10 días de exposición en sedimento control. Resumen de las significatividades estadísticas. En todos los ensayos, a excepción de la comparación correspondiente a *Todos los datos* a los que se le aplicó la prueba de Wilcoxon, el IMC cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. Los valores de IMC de la comparación entre Machos fueron previamente transformados (log10). T: estadístico de la prueba de T; W: estadístico de la prueba de Wilcoxon; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. I: grupo inicial; C: grupo control; (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

A diferencia de los resultados obtenidos en los ensayos en matriz acuosa, al exponer los animales en sedimento control durante 10 días, en todos los casos se observó un incremento significativo del IMC de los controles en relación al tiempo inicial (Tabla 9.4, Fig. 9.4 (A –C)).

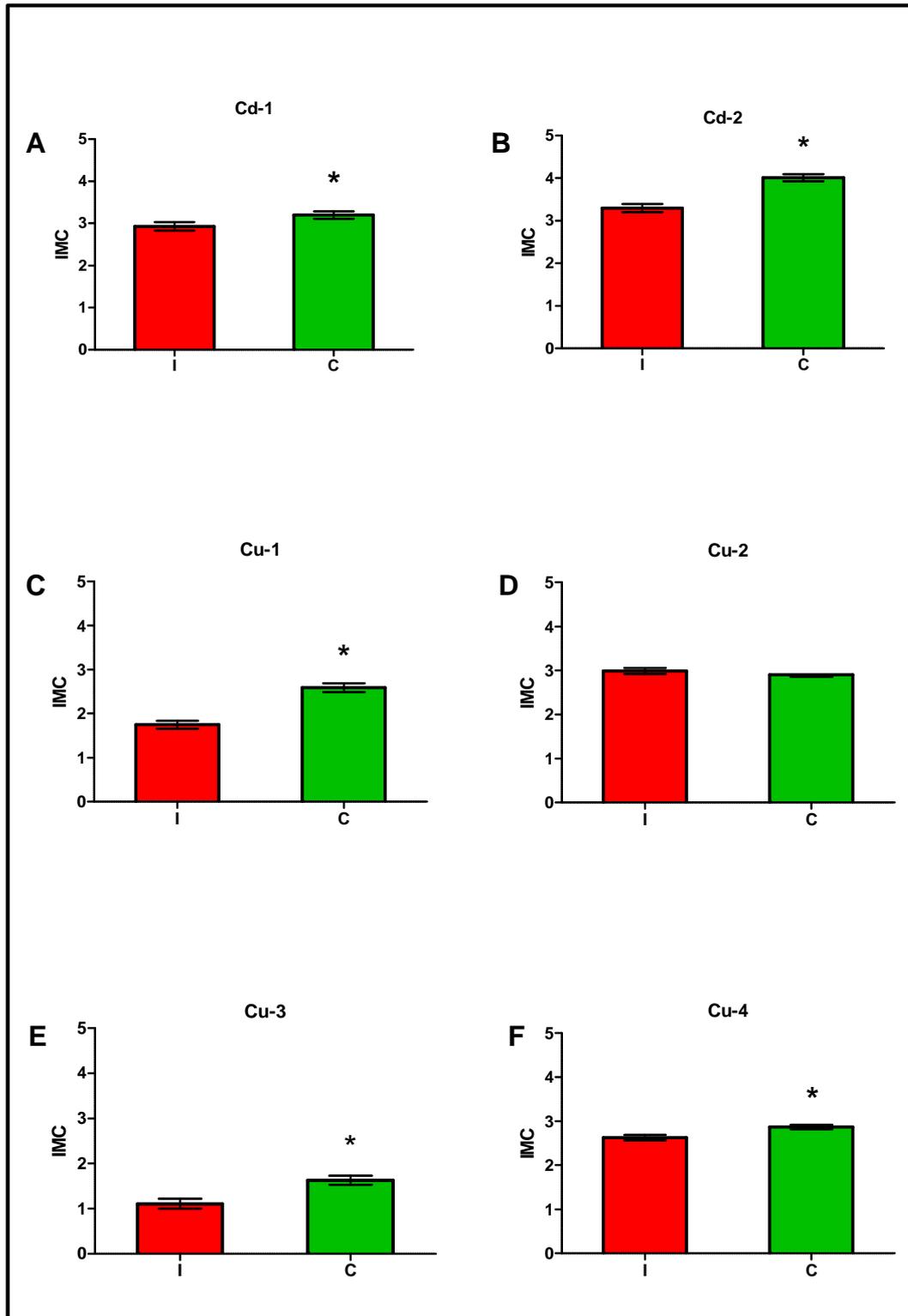


Figura 9.3: Índice de Masa Corporal (IMC) de los grupos iniciales (I) y controles (C) de los experimentos realizados en matriz sólida (A – F). Valores expresados como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre ambos grupos. Nivel de significancia $p < 0,05$.

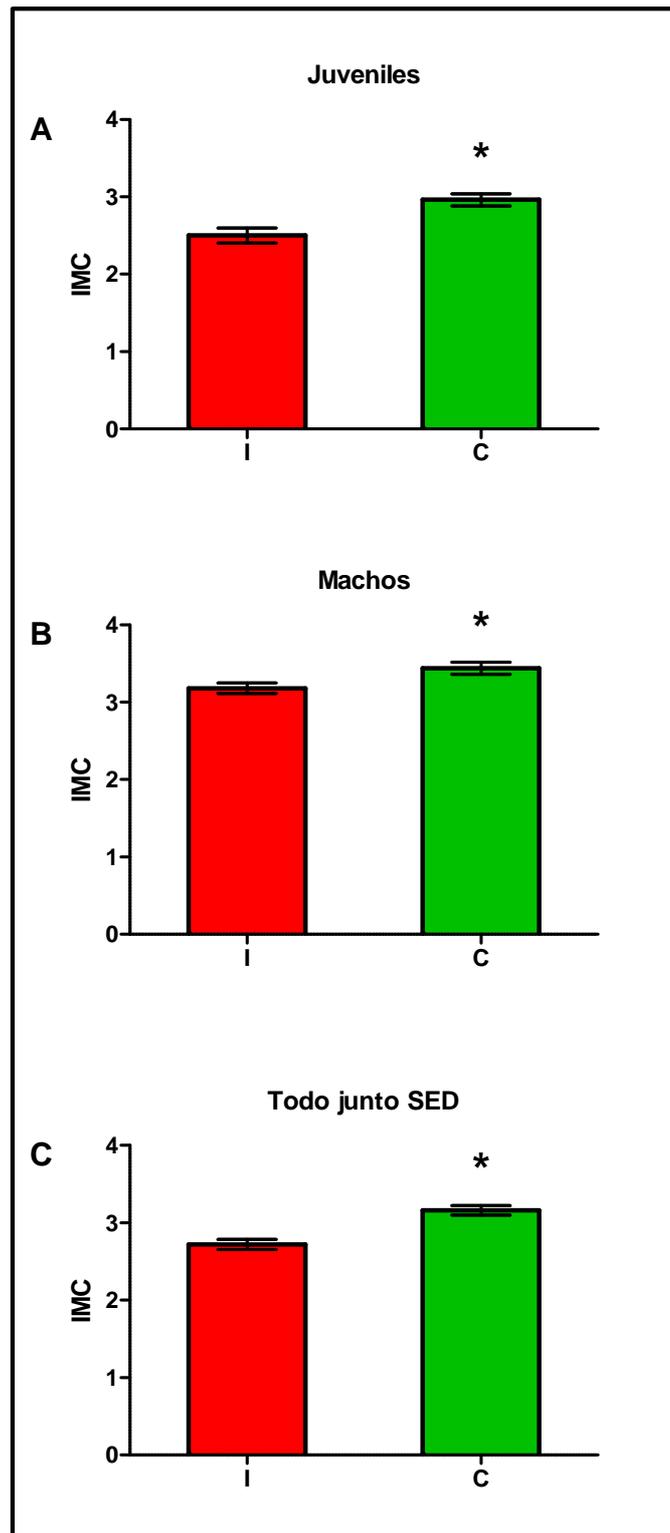


Figura 9.4: Índice de Masa Corporal (IMC) de *H. curvispina* de los grupos iniciales (I) y controles (C) para juveniles (A), machos (B) y la totalidad de los datos (C) de los experimentos realizados en matriz sólida. Valores expresados como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre ambos grupos. Nivel de significancia $p < 0,05$.

9.4.1.3 Ensayos en matriz acuosa y sólida: incidencia del cultivo de origen

Los resultados que se muestran a continuación forman parte de los experimentos presentados en el **Capítulo 8** y corresponden a los siguientes ensayos realizados con juveniles de *Hyalella curvispina*:

-*Indoor* (MHW); ensayo con individuos provenientes de cultivos *indoor* en los que se evaluó efectos sobre los anfípodos por exposición a de agua de poro.

-*Indoor* (SED); ensayo con individuos provenientes de cultivos *indoor* en los que se evaluó efectos sobre los anfípodos por exposición a muestras ambientales de sedimento.

-1er Generación (MHW); ensayo con individuos provenientes de cultivos 1er generación en los que se evaluó efectos sobre los anfípodos por exposición a de agua de poro.

-1er Generación (SED); ensayo con individuos provenientes de cultivos 1er generación en los que se evaluó efectos sobre los anfípodos por exposición a muestras ambientales de sedimento.

-*Outdoor* (MHW); ensayo con individuos provenientes de cultivos *outdoor* en los que se evaluó efectos sobre los anfípodos por exposición a de agua de poro.

-*Outdoor* (SED); ensayo con individuos provenientes de cultivos *outdoor* en los que se evaluó efectos sobre los anfípodos por exposición a muestras ambientales de sedimento.

Se realizó la comparación del Índice de Masa Corporal (IMC) del grupo inicial (tiempo cero de ensayo) y el correspondiente a los controles luego de 10 días de exposición en MHW o sedimento control, según el origen de los animales.

La tabla 9.5 muestra los resultados de los análisis estadísticos para el parámetro considerado.

Ensayos	Control I vs C	p	Inicial (n)	Control (n)
Indoor (MHW)	T= -3,19 *	0,002	33	57
1er Generación (MHW)	W= 1797	0,13	35	56
Outdoor (MHW)	T= 2,78 *	0,006	44	67
Indoor (SED)	W= 6884 *	<0,001	85	145
1er Generación (SED)	W= 1190 *	<0,001	34	64
Outdoor (SED)	T= 10,25 *	<0,001	42	67

Tabla 9.5: IMC de *H. curvispina* según el cultivo de origen, a tiempo inicial y luego de 10 días de exposición en matriz sólida o acuosa. Resumen de las significatividades estadísticas. El IMC de los ensayos *Indoor* (MHW) y los dos *Outdoor* cumplió los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. Los valores del IMC de los ensayos *Outdoor* fueron previamente transformados (log10). A los tres ensayos restantes se les aplicó la prueba de Wilcoxon. T: estadístico de la prueba de T; W: estadístico de la prueba de Wilcoxon; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. I: grupo inicial; C: grupo control; MHW: agua moderadamente dura; SED: sedimento. (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

En los experimentos realizados en matriz acuosa, sólo en los anfípodos provenientes de cultivos *outdoor* se observó un incremento del IMC de los controles en relación al grupo inicial. En el caso de los animales provenientes de cultivos *indoor* se observó el efecto contrario, en tanto que en los anfípodos obtenidos en primera generación de cultivos *indoor* no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 9.5, Fig. 9.5 A).

Contrariamente, en los ensayos con sedimento en todos los casos, independientemente del origen de los animales, los controles incrementaron su IMC en comparación al tiempo inicial (Tabla 9.5, Fig. 9.5 B).

Se analizaron los resultados unificando la totalidad de los datos (*Todos los datos*) de los experimentos realizados en matriz acuosa (MHW) y sólida (SED).

La tabla 9.6 muestra los resultados de los análisis estadísticos para el parámetro considerado.

Ensayos	Control I vs C	p	Inicial (n)	Control (n)
Todos los datos (MHW)	T= -0,66	0,51	112	180
Todos los datos (SED)	W= 22620 *	<0,001	161	276

Tabla 9.6: IMC de *H. curvispina* a tiempo inicial y luego de 10 días de exposición en matriz sólida o acuosa con independencia del cultivo de origen. Resumen de las significatividades estadísticas. Los valores del IMC de los ensayos en agua moderadamente dura (MHW) cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. A los valores del IMC de los ensayos en sedimento (SED) se le aplicó la prueba de Wilcoxon. T: estadístico de la prueba de T; W: estadístico de la prueba de Wilcoxon; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. I: grupo inicial; C: grupo control; (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

Independientemente del cultivo de origen de los animales, los anfípodos mantenidos durante 10 días en sedimento incrementan su IMC significativamente en relación al grupo inicial, en tanto que, los que permanecieron el mismo periodo de tiempo en matriz acuosa no presentaron diferencias significativas para este parámetro entre ambos grupos (Tabla 9.6, Fig. 9.5 (C y D)).

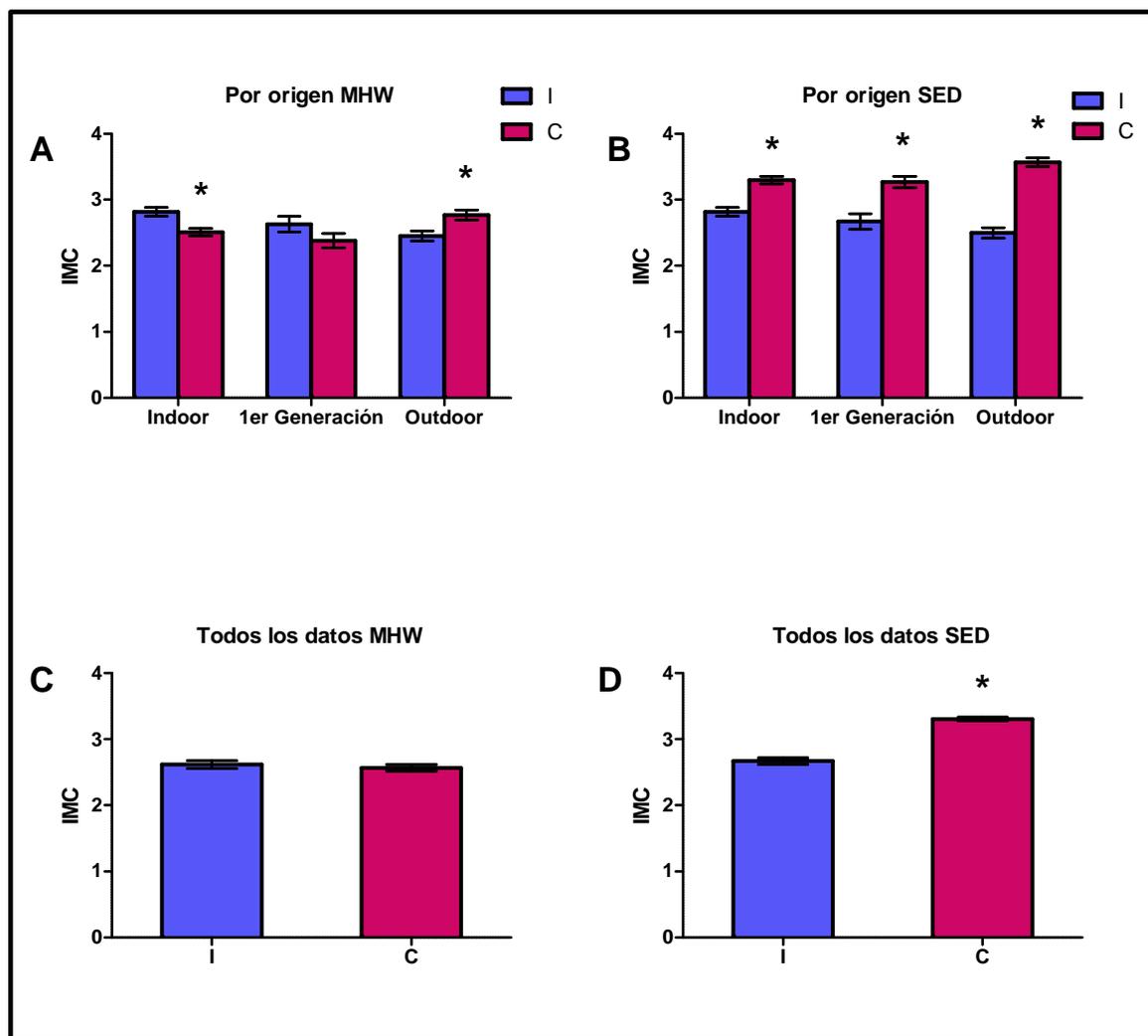


Figura 9.5: Índice de Masa Corporal (IMC) de los grupos iniciales (I) y controles (C) en matriz acuosa (MHW), según el cultivo de origen de los animales (A) y unificando todos los datos (C); y en matriz sólida, según el origen de los animales (B) y unificando todos los datos (D). Valores expresados como media \pm EEM. (*): indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

9.4.2 Comparación de las reservas energéticas entre grupos controles luego de 10 días de exposición en medio acuoso (MHW) y sedimento control (SED)

Se realizó una comparación de las reservas energéticas de los grupos controles a tiempo final de ensayo en matriz acuosa (MHW) y sólida (SED). Los resultados aquí presentados fueron extraídos de los ensayos descritos en el **Capítulo 7**.

La tabla 9.7 muestra los resultados de los análisis estadísticos para los parámetros considerados.

Parámetros	Control MHW vs SED	p	n
Lípidos Totales	T= 15,22 *	<0,001	3
Triglicéridos	T= 8,55 *	0,01	3
Glucógeno	T= 26,43 *	<0,001	3
Proteínas Totales	T= 26,06 *	<0,001	3

Tabla 9.7: Composición nutricional de machos mayores de *H curvispina* luego de diez días de permanencia en matriz acuosa o sólida bajo condiciones estandarizadas de ensayo. Resumen de las significatividades estadísticas. Los parámetros evaluados cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de la prueba de T para muestras independientes. Los valores de lípidos totales y triglicéridos fueron previamente transformados (log10). T: estadístico de la prueba de T; p: nivel de significancia estadística; n: número de réplicas. (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$).

La Fig. 9.6 muestra el contenido de lípidos totales, triglicéridos, glucógeno y proteínas totales de los grupos control de ambos ensayos (MHW y SED). Los niveles de los cuatro parámetros evaluados fueron significativamente superiores en los individuos expuestos a sedimento en comparación con los del ensayo en medio acuoso (4,5 veces para lípidos totales, 2,6 veces para triglicéridos, 4 veces par glucógeno y 3,2 veces para proteínas totales).

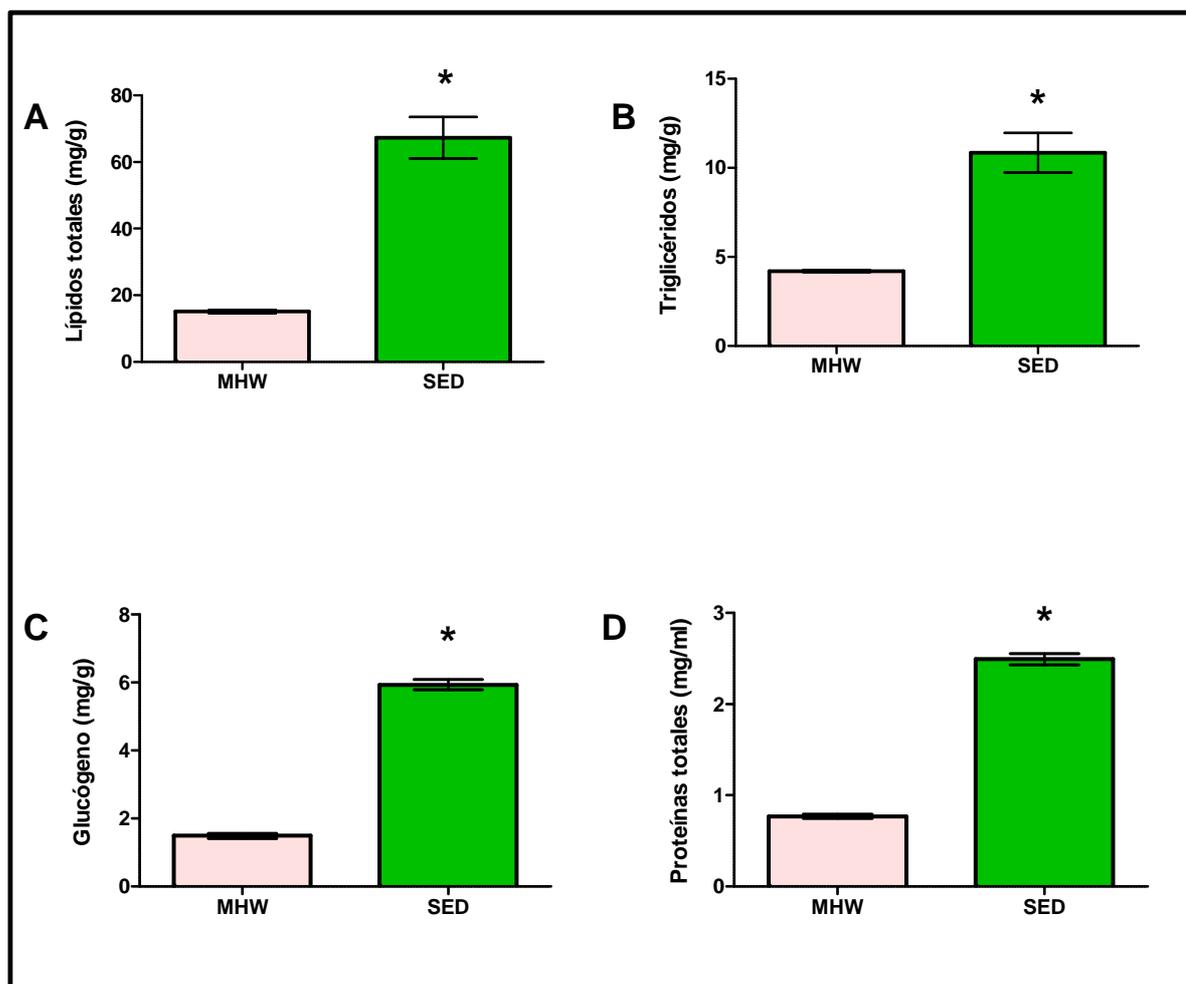


Figura 9.6: Concentración de lípidos totales (A), triglicéridos (B), glucógeno y (D) proteínas totales en machos de *H. curvispina* expuestos durante 10 días en agua moderadamente dura (MHW) y sedimento control (SED). Valores expresados como media \pm EEM. (*) indica diferencias significativas entre ambos grupos. Nivel de significancia $p < 0,05$.

9.5 Conclusiones

El análisis de los resultados permite inferir que el estado general de los animales (reflejado en el IMC) en sedimento, mejoró sustancialmente en relación a los que fueron mantenidos en medio acuoso durante el mismo periodo de tiempo.

A su vez, si bien en general el IMC no presentó diferencias significativas entre los animales expuestos durante 10 días a MHW en relación al tiempo inicial de ensayo, al comparar las reservas energéticas de anfípodos utilizados como controles en experimentos llevados a cabo en matriz acuosa (MHW) y sólida (SED), se observó que todos los parámetros evaluados (Lípidos totales, Triglicéridos, Glucógeno y Proteínas

totales) fueron significativamente más elevados en los individuos que permanecieron en sedimento, en relación a los ensayados en medio acuoso, indicando de manera inequívoca un mejor estado nutricional en los animales mantenidos con sedimento.

Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten inferir que en exposiciones de 10 días de duración y bajo nuestras condiciones experimentales, si bien *H. curvispina* puede ser empleada en bioensayos tanto en matriz sólida como acuosa, la especie resulta más apropiada para la realización de bioensayos en presencia de sedimentos. Es un hecho a considerar que el estado de salud (o *fitness*) cercano al óptimo de los controles es una condición crucial para disminuir el factor de incertidumbre en evaluaciones ecotoxicológicas mediante bioensayos.

Con respecto a *H. pseudoazteca* mantenida por 10 días en sedimento control, la evaluación del IMC que muestra un incremento significativo tanto en juveniles como en machos, en relación a sus respectivos grupos iniciales, indica que el estado general de los animales se ve favorecido por exposición a dicha matriz (Tabla 9.3, Fig. 9.3 E y F). Cabe destacar que en los ensayos presentados en el capítulo 5, tanto juveniles como machos de esta especie no superaron el 90% de sobrevivencia luego de 10 días de exposición en MHW. Por lo tanto, *H. pseudoazteca* resulta una especie apropiada para su uso en bioensayos de 10 días de duración en matriz sólida, pero no es recomendada para su utilización en ensayos en matriz acuosa.

CAPITULO 10

CONCLUSIONES GENERALES

1) Un primer aporte de este estudio fue ajustar una metodología de cultivo de *H. curvispina* en condiciones de laboratorio para su uso en experimentación así como estandarizar la dieta tanto en cultivos como en ensayos. Asimismo se comprobó que ésta especie es relativamente tolerante a elevadas concentraciones de amonio en solución, con un nivel de tolerancia para nitrógeno amoniacal entre 9,5 y 12 mg N-NH₄⁺/L (Capítulo 4).

2) En relación al efecto del cadmio y cobre en solución sobre la sobrevivencia, crecimiento e incorporación de los metales al tejido (Capítulo 5) se concluyó que en general, tanto en la evaluación de sobrevivencia como crecimiento, los juveniles de *H. curvispina* resultaron más sensibles a ambos metales que los machos.

Sobrevivencia y crecimiento son indicadores similarmente sensibles de toxicidad por Cd en *H. curvispina* en tanto que para el Cu, los parámetros de crecimiento fueron indicadores de toxicidad más sensibles que la sobrevivencia.

El Índice de masa corporal (IMC), resultó un punto final de mayor capacidad de discriminación entre tratamientos que los restantes parámetros de crecimiento. Ambas especies mostraron una significativa capacidad de acumular Cd y Cu en tejidos.

Bajo las condiciones experimentales *H. curvispina* probó ser sensible a concentraciones de Cd y Cu ecológicamente relevantes. Los resultados reafirman su importancia como una especie adecuada para ensayos de evaluación ecotoxicológica en cuerpos de agua dentro de su área de distribución. En tanto que *H. pseudoazteca* no cumple los requisitos adecuados para su uso en bioensayos con matriz acuosa.

- 3) En relación a la toxicidad del Cu y Cd en sedimento (Capítulo 6) la sobrevivencia no resulta un punto final sensible. Sin embargo se demostró que ambas especies sufren efectos negativos sobre el crecimiento a las concentraciones de Cd y Cu evaluadas, siendo el IMC el mejor parámetro discriminador. Así, este trabajo provee información sobre efectos toxicológicos del Cd y el Cu adicionados a sedimentos, en dos especies nativas de la región pampeana en Argentina, y contribuye a validar de manera interina el uso en esta región de los SQGs para ambos metales, desarrollados en el hemisferio norte. A su vez, bajo las condiciones experimentales ambas especies probaron ser sensibles a concentraciones de Cd y Cu determinadas dentro de su área de distribución.

- 4) En cuanto al desarrollo de nuevos puntos finales para ensayos con anfípodos (Capítulo 7) se confirmó que la exposición a ambos metales, tanto en solución como en sedimento, afecta de manera significativa a la mayoría de los parámetros evaluados. Si bien de menor relevancia en sedimento que en agua, los resultados obtenidos sugieren una fuerte depleción energética y daño oxidativo por exposición a Cu y Cd en concentraciones ecológicamente relevantes.
En éste trabajo se ajustó e implementó para *H. curvispina* la técnica de sistema de transporte de electrones (ETS) como biomarcador de estado metabólico. Los animales sometidos a estrés por exposición a Cu y Cd mostraron una inhibición significativa de la actividad ETS.

- 5) La evaluación de ecotoxicidad de sedimentos naturales se testeó, con juveniles de *H. curvispina* y sedimento proveniente del arroyo la Choza, mediante bioensayos estacionales de sobrevivencia y crecimiento con sedimento completo y agua de poro y mediante el dosaje de diferentes biomarcadores (Capítulo 8). Los resultados obtenidos permitieron concluir que la sobrevivencia no es un punto final sensible. En relación al crecimiento se confirma que el IMC resulta un parámetro de mayor capacidad discriminante entre tratamientos que la longitud y la biomasa evaluadas por separado. Debe considerarse que en la serie de ensayos estacionales se registró un componente de variabilidad ligado a la estacionalidad, y al cultivo de origen de los animales. Este hecho debe asumirse como un alerta para la planificación de bioensayos de monitoreo.

Los animales expuestos al sedimento de la Chozza mostraron alta actividad antioxidante (incremento de la actividad de CAT y SOD) acompañada de altos niveles de peroxidación lipídica así como una disminución significativa de la actividad metabólica (ETS). A fin de zanjar las posibles diferencias entre ensayos debidas al material biológico y a la estacionalidad, se propone como práctica estándar la expresión de los resultados en valores relativos a los controles concurrentes.

- 6) En relación al establecimiento de líneas de base como contribución para acrecentar el conocimiento biológico de las especies de ensayo se estudiaron algunos de los parámetros utilizados durante este trabajo en situaciones control (Capítulo 9). El análisis de los resultados permite inferir que el estado general de los animales en sedimento (reflejado en el IMC) es sustancialmente mejor que en medio acuoso. A su vez, si bien en general el IMC no presentó diferencias significativas entre los animales expuestos durante 10 días a MHW en relación al tiempo inicial de ensayo, al comparar las reservas energéticas se demostró que los animales mantenidos con sedimento tienen un mejor estado nutricional que los mantenidos en solución acuosa.

En función de estos resultados, se concluye que bajo nuestras condiciones experimentales, si bien *H. curvispina* puede ser empleada en bioensayos tanto en matriz sólida como acuosa, la especie resulta más apropiada para la realización de bioensayos en presencia de sedimentos. Es un hecho a considerar que el estado de salud de los controles es decisivo para disminuir el factor de incertidumbre en evaluaciones ecotoxicológicas mediante bioensayos. Con respecto a *H. pseudoazteca* resulta una especie apropiada para su uso en bioensayos en matriz sólida, pero no es recomendada para su utilización en ensayos en matriz acuosa.

- 7) Por último, se destacan los aportes originales de este trabajo de Tesis:
- ✓ Se reportaron los primeros datos de concentración de Cu y Cd en tejidos, para juveniles y machos de *H. curvispina* expuestos a diferentes matrices de ensayos (MHW, sedimento y agua de poro) adicionadas con dichos metales.
 - ✓ Se realizó un primer aporte a la evaluación del efecto de dos metales en matriz acuosa y sólida, sobre algunos parámetros de estrés oxidativo y metabolismo intermediario en *H. curvispina*.

- ✓ Se aportaron los primeros registros de biomarcadores medidos en juveniles de *H. curvispina* expuestos a sedimentos ambientales contaminados bajo condiciones estandarizadas de laboratorio.
- ✓ Se realizó la primera contribución a la evaluación de toxicidad por metales en dos estadios de la especie *H. pseudoazteca*, expuestos a matriz sólida y acuosa. Se determinaron parámetros tradicionales de efecto y se aportaron los primeros resultados sobre concentración de Cu en tejidos.
- ✓ Se propuso la utilización del IMC como nuevo parámetro evaluador de efecto subletal en bioensayos con matriz acuosa y sólida para ambas especies.
- ✓ Se postuló al ETS como nuevo biomarcador de efecto en bioensayos ecotoxicológicos con *H. curvispina*.
- ✓ Se contribuyó al incremento del conocimiento biológico de las especies de ensayo mediante el análisis de parámetros desarrollados en este trabajo de Tesis.

ANEXO I

RESULTADOS DE LOS ANALISIS ESTADISTICOS

CAPITULO 4

Tabla 1: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 4.2.

Variable	H	P
Sobrevivencia	4,15	0,080

CAPITULO 5

5.4.1.1- Ensayo Cd-1

Tabla 2: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 5.3.

Sobrevivencia	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	2249,04	29,32	<0,0001
Error	22	76,70		

Tabla 3: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 5.3.A

Variable	H	P
Peso	53,20	< 0,0001

Tabla 4: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 5.3.B

Variable	H	P
Longitud	36,16	< 0,0001

Tabla 5: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 5.3.C

Variable	H	P
IMC	9,81	0,02

5.4.1.2- Ensayo Cd-2

Tabla 6: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 5.4

Sobrevivencia	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	2249,04	29,32	< 0,0001
Error	22	76,70		

Tabla 7: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.4.A

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	0,54	15,39	< 0,0001
Error	104	0,03		

Tabla 8: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}), correspondientes a la Figura 5.4.B

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	4,21	19,37	< 0,0001
Error	104	0,22		

Tabla 9: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.4.C

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	1,59	5,46	0,0017
Error	95	0,29		

5.4.1.3- Ensayo Cd-3

Tabla 10: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 5.5.

Sobrevivencia	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	311,11	1,70	0,244
Error	8	183,33		

Tabla 11: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}), correspondientes a la Figura 5.5.A

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	0,01	1,50	0,208
Error	101	0,01		

Tabla 12: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 5.5.B

Variable	H	P
Longitud	2,01	0,733

Tabla 13: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.5.C

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,92	3,05	0,033
Error	83	0,30		

5.4.1.4 Concentración de Cd en tejidos

Tabla 14: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 5.6.

Variable	H	P
J Cd-1	15,02	0,0017

Tabla 15: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 5.6.

Variable	H	P
Mm Cd-3	9,41	0,0003

5.4.1.6- Ensayo Cu-2

Tabla 16: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 5.9.

Variable	H	P
Sobrevivenica	5,69	0,082

Tabla 17: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 5.9.A.

Variable	H	P
Peso	58,22	<0,0001

Tabla 18: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.9.B.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	0,26	3,07	0,018
Error	158	0,09		

Tabla 19: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.9.C.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	9,03	34,00	<0,0001
Error	139	0,27		

5.4.1.7- Ensayo Cu-3

Tabla 20: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 5.10.

Variable	H	P
Sobrevivenica	0,86	>0,999

Tabla 21: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.10.A

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,14	0,99	0,403
Error	57	0,14		

Tabla 22: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.10.B.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,59	2,26	0,091
Error	57	0,26		

Tabla 23: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 5.10.C.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,01	3,34	0,040
Error	38	0,0002		

Tabla 24: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Tabla 5.11.

Cu en tejido	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	15538,22	10,83	0,010
Error	6	1434,32		

CAPITULO 6

6.4.1.1-Ensayo Cd-1

Tabla 25: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 6.4.

Variable	H	P
Sobrevivenica	4,98	0,140

Tabla 26: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.4.A.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	0,22	10,83	<0,0001
Error	275	0,02		

Tabla 27: Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.4.B.

Variable	H	P
Longitud	27,62	<0,0001

Tabla 28: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.4.C.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	5,15	11,41	<0,0001
Error	228	0,45		

6.4.1.2-Ensayo Cd-2

Tabla 29: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 6.5.

Variable	H	P
Sobrevivenica	0,86	0,693

Tabla 30: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}), correspondientes a la Figura 6.5.A.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,09	7,89	<0,0001
Error	120	0,01		

Tabla 31: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.5.B

Variable	H	P
Longitud	8,33	0,040

Tabla 32: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.5.C.

Variable	H	P
IMC	6,29	0,040

6.4.1.3 Concentración de Cd en tejidos:Tabla 33: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}), correspondientes a la Tabla 6.6.

Cd-2 Mm	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	1,79	151,30	<0,0001
Error	12	0,01		

6.4.2.1-Ensayo Cu-1**SEDIMENTO ADICIONADO**

Tabla 34: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 6.7.

Variable	H	P
Sobrevivenica	0,86	0,693

Tabla 35: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.7.A.

Variable	H	P
Peso	19,97	0,0005

Tabla 36: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.7.B.

Variable	H	P
Longitud	2,62	0,624

Tabla 37: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.7.C.

Variable	H	P
IMC	6,01	0,111

AGUA DE PORO

Tabla 38: Resultados de la Prueba de Wilcoxon correspondientes a la Tabla 6.8.

Variable	W	P
Sobrevivenica	3,00	0,20

Tabla 39: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.8.A.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,09	16,74	<0,0001
Error	54	0,01		

Tabla 40: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.8.B.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,42	5,95	0,005
Error	54	0,07		

Tabla 41: Resultados de la Prueba T para muestras Independientes correspondientes a la Figura 6.8.C.

Variable	T	P
IMC	0,16	0,875

6.4.2.2-Ensayo Cu-2

SEDIMENTO ADICIONADO

Tabla 42: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 6.9.

Sobrevivencia	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	30,00	0,44	0,779
Error	15	68,33		

Tabla 43: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.9.A.

Variable	H	P
Peso	8,91	0,063

Tabla 44: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.9.B.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	1,23	6,75	<0,0001
Error	138	0,18		

Tabla 45: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.9.C.

Variable	H	P
IMC	0,89	0,828

AGUA DE PORO

Tabla 46: Resultados de la Prueba T para muestras Independientes correspondientes a la Tabla 6.10.

Variable	T	P
Sobrevivencia	-0,45	0,678

Tabla 47: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.10.A.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,33	4,86	0,011
Error	64	0,07		

Tabla 48: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.10.B.

Variable	H	P
Longitud	4,41	0,110

Tabla 49: Resultados de la Prueba de Wilcoxon correspondientes a la Figura 6.10.C.

Variable	W	P
IMC	555,0	0,565

6.4.2.3 Concentración de Cu en tejidos

Tabla 50: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Tabla 6.11.

Variable	H	P
Cu-2 M-S	8,29	0,041

6.4.3.1-Ensayo Cu-3

Tabla 51: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 6.13.

Sobrevivencia	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	140,0	1,56	0,251
Error	12	90,0		

Tabla 52: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 6.12.A.

Variable	H	P
Peso	21,10	<0,0001

Tabla 53: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.12.B.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,88	10,57	<0,0001
Error	136	0,08		

Tabla 54: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.12.C.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	1,50	5,92	0,004
Error	119	0,25		

6.4.3.2-Ensayo Cu-4

Tabla 55: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 6.14.

Sobrevivencia	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	106,67	0,73	0,503
Error	12	146,67		

Tabla 56: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.13.A.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,12	7,14	0,0002
Error	152	0,02		

Tabla 57: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.13.B.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,65	6,35	0,0004
Error	153	0,10		

Tabla 58: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 6.13.C.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,29	1,96	0,145
Error	124	0,15		

6.4.3.3 Concentración de Cu en tejidos

Tabla 59: Resultados del ANOVA correspondientes a la Tabla 6.15.

Cu-4 M	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	951,58	6,94	0,015
Error	9	137,18		

6.4.4.1 ENSAYOS CON SEDIMENTO COMPLETO- *H. pseudoazteca*

Tabla 60: Ensayo J1

Tratamiento	Longitud	Peso seco
Inicial	2,52 (0,32); n=40	0,086; n=1
Control	2,97 (0,25); n=48	0,164; n=1
10 mg/Kg	2,92 (0,23); n=43	0,148; n=1
50 mg/Kg	2,95 (0,27); n=46	0,162; n=1
100 mg/Kg	2,59 (0,36); n=37	0,129; n=1

n: número de determinaciones. Entre paréntesis: desvío estándar.

Tabla 61: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10})

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	4	1,98	24,03	<0,0001
Error	209	0,08		

Tabla 62: Ensayo J2

Tratamiento	Longitud	Peso seco
Inicial	3,10 (0,42); n=20	0,197; n=1
Control	3,47 (0,30); n=50	0,395 (0,036); n=5
25 mg/Kg	3,28 (0,38); n=48	0,370 (0,041); n=5
75 mg/Kg	3,27 (0,38); n=48	0,302 (0,030); n=5

n: número de determinaciones. Entre paréntesis: desvío estándar.

Tabla 63: Prueba de Kruskal Wallis

Variable	H	P
Sobrevivencia	0,38	0,368

Tabla 64: Resultados del ANOVA

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	11407,20	8,86	0,0043
Error	12	1286,83		

Tabla 65: Resultados del ANOVA

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	3	0,72	5,47	0,0013
Error	162	0,13		

CAPITULO 8

POR ESTACION DE MUESTREO

SEDIMENTO COMPLETO

VERANO 2010

Tabla 66: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.4

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,57	27,06	<0,0001
Error	63	0,02		

Tabla 67: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.5.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	2,75	11,52	0,0001
Error	63	0,24		

Tabla 68: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.6.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	7,68	36,21	<0,0001
Error	63	0,21		

INVIERNO 2010

Tabla 69: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.4.

Variable	H	P
Peso	55,06	<0,0001

Tabla 70: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.5.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	13,08	45,26	<0,0001
Error	93	0,29		

Tabla 71: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.6.

Variable	H	P
IMC	48,84	<0,0001

PRIMAVERA 2010Tabla 72: Resultados del ANOVA (previa transformación log₁₀) correspondientes a la Figura 8.4.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,22	15,90	<0,0001
Error	60	0,01		

Tabla 73: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.5.

Variable	H	P
Longitud	6,49	0,040

Tabla 74: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.6.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	6,08	30,16	<0,0001
Error	60	0,20		

VERANO 2011Tabla 75: Resultados del ANOVA (previa transformación log₁₀) correspondientes a la Figura 8.4.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,18	13,58	<0,0001
Error	81	0,01		

Tabla 76: Resultados del ANOVA (previa transformación log₁₀) correspondientes a la Figura 8.5.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,02	9,90	0,0001
Error	81	0,0002		

Tabla 77: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.6.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	1,06	6,35	0,003
Error	81	0,17		

OTOÑO 2011

Tabla 78: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.4.

Variable	H	P
Peso	19,07	0,0001

Tabla 79: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.5.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	1,22	7,99	0,0008
Error	63	0,15		

Tabla 80: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.6.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	2,14	11,70	<0,0001
Error	63	0,18		

PRIMAVERA 2011Tabla 81: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.4.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,61	23,48	<0,0001
Error	76	0,03		

Tabla 82: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.5.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	4,92	29,59	<0,0001
Error	76	0,17		

Tabla 83: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.6.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,75	1,83	0,167
Error	76	0,41		

AGUA DE PORO**VERANO 2010**

Tabla 84: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.8.

Variable	H	P
Peso	14,88	0,0006

Tabla 85: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.9.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	1,55	7,71	0,0009
Error	75	0,20		

Tabla 86: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.10.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	5,20	18,45	<0,0001
Error	75	0,28		

INVIERNO 2010

Tabla 87: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.8.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,27	19,89	<0,0001
Error	98	0,01		

Tabla 88: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.9.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	3,15	18,84	<0,0001
Error	98	0,17		

Tabla 89: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.10.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	2,25	13,37	<0,0001
Error	98	0,17		

VERANO 2011Tabla 90: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.8.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,01	0,92	0,401
Error	76	0,01		

Tabla 91: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.9.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,01	4,86	0,010
Error	76	0,0001		

Tabla 92: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.10.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,48	2,80	0,067
Error	76	0,17		

OTOÑO 2011

Tabla 93: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.8.

Variable	H	P
Peso	0,68	0,710

Tabla 94: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.9.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,07	0,70	0,499
Error	59	0,11		

Tabla 95: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.10.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,52	3,86	0,027
Error	59	0,14		

PRIMAVERA 2010

Tabla 96: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.8.

Peso	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,01	1,01	0,368
Error	69	0,01		

Tabla 97: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.9.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,32	3,15	0,052
Error	69	0,10		

Tabla 98: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.10.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	2,00	9,96	0,0002
Error	69	0,20		

PRIMAVERA 2011

Tabla 99: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.8.

Variable	H	P
Peso	5,66	0,059

Tabla 100: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.9.

Longitud	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,08	26,18	<0,0001
Error	73	0,0003		

Tabla 101: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.10.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	2,27	4,01	0,022
Error	73	0,57		

POR ORIGEN DE LOS ANIMALES**SEDIMENTO COMPLETO**

INDOOR

Tabla 102: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.7.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	2,44	11,38	<0,0001
Error	152	0,21		

PRMIERA GENERACION

Tabla 103: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.7.

Variable	H	P
IMC	17,00	0,0002

OUTDOOR

Tabla 104: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.7.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	15,00	42,94	<0,0001
Error	159	0,35		

AGUA DE PORO**INDOOR**

Tabla 105: Resultados del ANOVA correspondientes a la Figura 8.11.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	1,00	4,65	0,011
Error	138	0,22		

PRMIERA GENERACION

Tabla 106: Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis correspondientes a la Figura 8.11.

Variable	H	P
IMC	3,10	0,213

OUTDOORTabla 107: Resultados del ANOVA (previa transformación \log_{10}) correspondientes a la Figura 8.11.

IMC	GL	CM	F	P
Tratamiento	2	0,17	17,90	<0,0001
Error	176	0,01		

ANEXO II

RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES DE NITROGENO AMONIAL DETERMINADAS EN TODOS LOS BIOENSAYOS PRESENTADOS EN LA TESIS

Capítulo 5

Ensayo	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	
	Ti	Tf (rango)
CL 50 Juveniles Hc (Cd-1)	0	0,0-0,2
CL 50 Juveniles Hc (Cu-1)	0	0,3-0,6
Crecimiento Juveniles Hc (Cd-2)	0	0,2
Crecimiento Machos Menores Hc (Cd-3)	0	0,1-0,2
Crecimiento Machos Mayores Hc (Cd-4)	0	2,3-3,3
Crecimiento Juveniles Hc (Cu-2)	0	0,8-1,5
Crecimiento Machos Mayores Hc (Cu-3)	0	1,8-2,6

Tabla 1: Rango de concentraciones de nitrógeno amoniacal correspondientes a los bioensayos informados en el **Capítulo 5**. Hc: *Hyalella curvispina*, Ti: tiempo inicial, Tf: tiempo final, Cd: cadmio y Cu: cobre.

Capítulo 6**Sedimento adicionado**

Ensayo	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	
	Ti	Tf
Crecimiento Juveniles Hc (Cd-1)	3,3-4,6	0,1-0,2
Crecimiento Machos Mayores Hc (Cd-2)	5,3-5,7	0,4-1
Crecimiento Juveniles Hc (Cu-1)	4,7-5,8	1,9-3,0
Crecimiento Machos Mayores Hc (Cu-2)	2,3-4,9	0,6-1,1
Crecimiento Juveniles Hp(Cu-3)	1,6-5,7	0,1
Crecimiento Machos Hp(Cu-4)	2,6-5,8	0,4-0,6
Crecimiento Juveniles Hp(Cu-J1) (sedimento completo)	nd	0,1
Crecimiento Juveniles Hp(Cu-J2) (sedimento completo)	1,1-1,5	0,2-1,2

Tabla 2: Rango de concentraciones de nitrógeno amoniacal correspondientes a los bioensayos realizados con sedimento informado en el **Capítulo 6**. Hc: *Hyalella curvispina*, Hp: *H. pseudoazteca*, Ti: tiempo inicial, Tf: tiempo final, Cd: cadmio, Cu: cobre y nd: no determinado.

Agua de poro

Tratamiento	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)			
	Control (MHW)		AP	
	Ti	Tf	Ti	Tf
Crecimiento Juveniles Hc Cu	0	0-0,2	2,7	2,5
Crecimiento Machos Mayores Hc Cu	0	0,8	1,9	3,3

Tabla 3: Concentraciones máximas registradas de nitrógeno amoniacal correspondientes a los bioensayos realizados con agua de poro informado en el **Capítulo 6**. Hc: *Hyalella curvispina*, MHW: agua moderadamente dura; AP: agua de poro, Ti: tiempo inicial, Tf: tiempo final y Cu: cobre.

Capítulo 7

Tratamiento	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	
	Ti	Tf
MHW-Parámetros bioquímicos (Machos Mayores Hc Cd y Cu)	0	3,5-4,7
SPK-Parámetros bioquímicos (Machos Mayores Hc Cd y Cu)	3,5-4,3	9,0-10,0

Tabla 4: Rango de concentraciones de nitrógeno amoniacal correspondientes a los bioensayos realizados en el **Capítulo 7**. Hc: *Hyalella curvispina*, Ti: tiempo inicial, Tf: tiempo final, Cd: cadmio y Cu: cobre.

Capítulo 8**Sedimento completo**

Tratamiento	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	
	Ti	Tf
Control (Las Flores) - Juveniles Hc	0,7-3,0	4,1-7,2
La Choza - Juveniles Hc	5,8-8,7	0,2-5,1

Tabla 5: Rango de concentraciones de nitrógeno amoniacal correspondientes a los bioensayos realizados con sedimento informados en el capítulo 8. Hc: *Hyalella curvispina*, Ti: tiempo inicial y Tf: tiempo final.

Agua de poro

Tratamiento	N-NH ₄ ⁺ (mg/L)	
	Ti	Tf
Control (MHW) - Juveniles Hc	0	0,9-2,6
AP - Juveniles Hc	7,0-11	0-0,3

Tabla 6: Rango de concentraciones de nitrógeno amoniacal correspondientes a los bioensayos realizados con agua de poro informados en el capítulo 8. Hc: *Hyalella curvispina*, MHW: agua moderadamente dura, AP: agua de poro, Ti: tiempo inicial y Tf: tiempo final.

En los experimentos realizados en medio acuoso el nitrógeno amoniacal a tiempo inicial de ensayo fue siempre no detectable. En los bioensayos que se realizaron con individuos juveniles, el N-NH₄⁺ aumentó a tiempo final de ensayo en un rango de 0,2 a 2,6mg/L. Estos valores se encontraron siempre por debajo a las concentraciones ensayadas en el capítulo 4, donde se obtuvo con juveniles un 90% de sobrevivencia a 11,6 mg N-NH₄⁺/L (Tabla 4.5, capítulo 4). Con los anfípodos adultos en general se

obtuvieron valores más elevados de nitrógeno amoniacal (máximo 4,7 mg/L) que los determinados en los ensayos con juveniles. Sin embargo, dichos valores estuvieron muy por debajo de los ensayados en dicho capítulo, con los que se obtuvo un 80% de sobrevivencia (Tabla 4.5, capítulo. 4).

En los ensayos realizados con sedimento procesado del arroyo Las Flores, los resultados obtenidos mostraron variabilidad en el comportamiento del N-NH_4^+ a lo largo del tiempo de experimentación. Mientras que en los ensayos descritos en el Capítulo 6, siempre se observó una disminución del N-NH_4^+ a tiempo final de ensayo, en relación al tiempo inicial, en los ensayos presentados en los Capítulos 7 y 8 (sedimento completo) dicho parámetro fue más elevado a tiempo final de exposición. El mismo efecto fue observado en bioensayos realizados por Peluso (2011) con juveniles de *H. curvispina* expuestos a diferentes muestras de sedimento del río Luján durante 10 días. La autora informó variaciones en la concentración de nitrógeno amoniacal a tiempo inicial y final de ensayo, en diferentes diluciones de la misma muestra (aumentando en algunos casos y disminuyendo en otros) sin un patrón definido. Las concentraciones de N-NH_4^+ más elevadas determinadas en los capítulos mencionados previamente (6, 7 y 8) fueron 10 y 7,2 mg/L (adultos y juveniles, respectivamente). Estos valores estuvieron cercanos a los reportados en los ensayos del capítulo 4, donde se obtuvo un alto porcentaje de sobrevivencia (Tablas 4.4 y 4.5). En cuanto a los experimentos realizados con sedimento proveniente del arroyo La Choza (Capítulo 8), en todos los casos los valores de N-NH_4^+ a tiempo inicial fueron superiores al tiempo final y estuvieron por debajo de la concentración de 11,6 mg/L ensayada en el capítulo 4, donde se obtuvo una sobrevivencia del 90% (juveniles) (Tabla 4.5).

Por último, en los experimentos realizados con agua de poro proveniente de sedimento del arroyo Las Flores (Capítulo 6), los valores de N-NH_4^+ no superaron los 3,3 mg/L. En tanto que en el caso del agua de poro obtenida a partir de sedimento del arroyo La Choza, los valores a tiempo inicial de ensayo siempre fueron elevados, llegando a un máximo de 11 mg/L, disminuyendo marcadamente a tiempo final. Dicho valor se encuentra cercano al ensayado con juveniles en el capítulo 4, donde se obtuvo una sobrevivencia del 90%.

Con respecto a los ensayos realizados con *H. pseudoazteca*, si bien no hay valores de referencia de tolerancia a N-NH_4^+ , en los cuatro experimentos llevados a cabo con sedimento proveniente del arroyo Las Flores adicionado (Tablas 6.13, 6.14, 6.16 y 6.17, capítulo 6), la sobrevivencia de los anfípodos fue superior al 80% (niveles permitidos para bioensayos con sedimento). Las concentraciones de nitrógeno

amoniaco más elevadas fueron similares para juveniles y adultos (5,7-5,8 mg/L), siendo siempre superiores a tiempo inicial de ensayo en relación al tiempo final.

Finalmente, cabe destacar que en todos los bioensayos realizados a lo largo de esta Tesis, a pesar de las elevadas concentraciones de nitrógeno amoniacal registradas en algunos de los mismos la sobrevivencia de los anfípodos no se vio afectada, reforzando los resultados obtenidos en los experimentos informados en el capítulo 4.

ANEXO III

PRODUCCION CIENTIFICA

Trabajos Publicados

Giusto A, Salibián A, Ferrari L. 2014. Biomonitoring toxicity of natural sediments using juvenile *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as test species: evaluation of early effect endpoints. *Ecotoxicology*. 23 (2): 293-303. DOI 10.1007/s10646-013-1173-7.

Giusto A, Ferrari L. 2014. Biochemical responses of ecological importance in males of the austral South America amphipod *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 exposed to waterborne cadmium and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100: 193-200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.001>.

Giusto A, Somma LA, Ferrari L. 2012. Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyalella curvispina*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79:163-169.

Giusto A, Ferrari L. 2008. Copper toxicity on juveniles of *Hyalella pseudoazteca* (González and Watling, 2003). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81: 169-173.

Giusto A, Salibián A, Ferrari L. 2008. Ensayos de toxicidad de sedimentos con *Hyalella pseudoazteca* con cobre como tóxico de referencia. *Biología Acuática*. 24: 103-109.

Manual de procedimiento para el cultivo de *Hyalella curvispina* con fines experimentales de acceso gratuito

Somma L, Giusto A, Ferrari L. 2011. Manual de producción de *Hyalella curvispina* en laboratorio. 1° ed. Utopías, 2011 25 p. + Ebook; 21x29 cm ISBN 978-987-1529-86.

Se presentaron 19 comunicaciones en Reuniones Científicas a nivel nacional e internacional

Giusto A, Ferrari L, Da Silva M, Salibián A. 2012. Toxicidad de sedimentos de la cuenca alta del río Reconquista: monitoreo estacional (2010-2011). En: Libro de Resúmenes, IV Congreso Argentino SETAC, pag. 102. Buenos Aires, Argentina del 16 al 19 de octubre de 2012.

Giusto A, Dutra BK, Oliveira GT, Salibián A, Ferrari L. 2012. Biomarcadores de efecto temprano como puntos finales de evaluación de ecotoxicidad de sedimentos con *Hyalella curvispina*. En: Libro de Resúmenes, IV Congreso Argentino SETAC, pag 242. Buenos Aires, Argentina del 16 al 19 de octubre de 2012.

Giusto A, Mastrangelo MM, Medina L, Ferrari L, Salibián A. 2011. Toxicidad de sedimentos de la cuenca alta del río Reconquista (Argentina): bioensayos con *Hyalella curvispina*. En: X Congreso de SETAC LA-I Congreso Venezolano de Ecotoxicología (Código: 68) – (Edición en CD, pags. 68-69). Cumaná, Venezuela del 11 al 15 de octubre de 2011.

Giusto A, Dutra BK, Oliveira GT, Salibián A, Ferrari L. 2011. Bioensayos de ecotoxicidad de sedimentos naturales: respuestas tempranas de biomarcadores de estrés oxidativo en *Hyalella curvispina*. En: X Congreso de SETAC LA-I Congreso Venezolano de Ecotoxicología, (Código BM: 25) – (Edición en CD, pag. 69). Cumaná, Venezuela del 11 al 15 de octubre de 2011.

Giusto A, Dutra BK, Salibián A, Ferrari L, Oliveira GT. 2011. Biochemical responses and lipoperoxidation on *Hyalella curvispina* (amphipoda, dogielinotidae) exposed to cadmium in water and sediment. En: New frontiers for monitoring european biodiversity: the role and importance of amphipod crustaceans, pag. 71. Palermo, Italia, del 27 al 29 de septiembre de 2011.

Giusto A, Dutra BK, Salibián A, Oliveira GT, Ferrari L. 2011. *Hyalella curvispina* (amphipoda, dogielinotidae) as bioindicator for exposition to copper in water and sediment. En: New frontiers for monitoring european biodiversity: the role and importance of amphipod crustaceans, pag. 70. Palermo, Italia, del 27 al 29 de septiembre de 2011.

Giusto A, Dutra BK, Oliveira GT, Ferrari L. 2011. Estrés oxidativo en *Hyalella curvispina* expuesta a cobre. En: 2da. Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de

la República Argentina, (Código: FA 24)-(Edición en CD). San Juan, 17 al 19 de agosto de 2011.

Giusto A, Dutra BK, Oliveira GT, Ferrari L. 2010. Evaluación de efecto del cobre sobre el metabolismo energético en *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, III Congreso Argentino SETAC, pag. 65.

Eissa BL, Giusto A, Mastrángelo MM, Larrán L. 2010. Evaluación biológica de muestras ambientales del río Reconquista (Pcia. Bs. As.). En Libro de resúmenes, III Congreso Argentino SETAC, pag. 101.

Giusto A, Ferrari L. 2009. Ensayos de toxicidad con agua de poro y sedimento adicionado con cobre en *Hyalella curvispina*. En: Biologist (lima) Vol 7 N° 1-2, special Issue, Jan –Dec 2009, pag 60. Resumen presentado en Congreso SETAC LA Perú.

Mastrángelo M, Giusto A, Somma A, Ferrari L. 2009. Relación entre la especiación y la bioconcentración de cadmio en *Hyalella curvispina*. En: Biologist (lima) Vol 7 N° 1-2, special Issue, Jan –Dec 2009, pag 30. Resumen presentado en Congreso SETAC LA Perú.

Giusto A, Ferrari L. 2008. Ensayos de toxicidad con agua y sedimento adicionados con cadmio en *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, V Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos, pag. 56.

Peluso L, Giusto A, Bulus Rosini GD, Ferrari L, Salibián A. 2008. Ejercicio de intercalibración de bioensayo de toxicidad aguda con *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, II Congreso Argentino SETAC, pag. 173.

Mastrángelo M, Giusto A, Irala D, Salibián A, Ferrari L. 2007. Toxicidad de elutriados de sedimentos bonaerenses: bioensayos con *Bufo arenarum* e *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, VIII Congreso SETAC LA, pag. 79.

Giusto A, Peluso L, Ferrari L, Bulas Rossini GD, Jurado M, Ronco AE, Salibián A. 2007. Evaluación de la toxicidad de sedimentos provenientes de la cuenca del Río de La Plata con *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, XV Congreso Argentino de Toxicología, pag. 43.

Ronco AE, Ferrari L, Bulus Rossini G, Giusto A, Peluso L, Salibián A. 2006. Aplicación de herramientas bioanalíticas en la toma de decisión y el establecimiento de criterios de calidad de sedimentos contaminados. En: Libro de resúmenes, 1er Simposio SETAC Argentina "Ecotoxicología y Contaminación", pag. 21.

Giusto A, Salibián A, Ferrari L. 2006. Evaluación de la ecotoxicidad de sedimentos contaminados con cobre mediante bioensayos con *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, IV Congreso de Ecología y Manejo de Ecosistemas Acuáticos Pampeanos, pag.34.

Giusto A, Salibián A, Ferrari L. 2006. Bioensayos de toxicidad de sedimentos del Río de La Plata con *Hyalella curvispina*. En: Libro de resúmenes, III Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida, pag. 41.

Giusto A, Ferrari L, Salibián A. 2006. Contaminación de sedimentos por cobre: bioensayos con *Hyalella curvispina*. En: Libro de Resúmenes, IX Congreso Brasileiro de Ecotoxicología, pag. 56.

Bibliografía

- Achiorno CL, de Villalobos C, Ferrari L. 2010. Validation test with embryonic and larval stages of *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha): sensitivity to three reference toxicants. *Chemosphere*. 81: 133-140.
- Acosta V, Lodeiros C, Senior W, Martínez G. 2002. Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales en tres zonas litorales de Venezuela. *Interciencia* 27: 686-690.
- Alves de Souza Grinevicius VM. 2006. Avaliação da remediação de efluentes de uma indústria têxtil utilizando bioindicadores e biomarcadores. Tesis de Post-grado en Biotecnología. Universidad Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil, 179 pp.
- Alves LC, Borgmann U, Dixon DG. 2008. Water-sediment interactions for *Hyalella azteca* exposed to uranium-spiked sediment. *Aquat.Toxicol.* 87: 187-199.
- Anger K. 2001. The biology of decapod crustacean larvae. In: *Crustacean issues* 14. Vonk R (Ed.). A A Balkema Publishers, Lisse. pp 419.
- Anguiano OL, Ferrari A, Soleño J, Martínez MC, Venturino A, Pechen de D'Angelo AM, Montagna CM. 2008. Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2117-2123.
- Anguiano OL, Castro C, Venturino A, Ferrari A. 2012. Acute toxicity and biochemical effects of azinphos methyl in the amphipod *Hyalella curvispina*. *Environ Toxicol.* doi:10.1002/tox.21834.
- Ankley GT, Schubauer-Berigan MK, Dierkes JR, Lukasewycs MT. 1991. Sediment toxicity identification evaluation: Phase I (characterization), phase II (identification) and phase III (confirmation) modification of effluent procedures. EPA/600/6-91/007. Environmental Research Laboratory-Duluth, MN.
- APHA. 1989. Toxicity test methods for aquatic organisms, standard methods for the examination of water and wastewater, 17th ed., Washington, DC, Part 8000.
- Arun S, Subramanian P. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcomsoni* during embryonic and larval development. *Comp. Biochem. Physiol. B* 121: 273-277.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1991. Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates. E1383-90, p-20. In: 1991 Annual Book of ASTM Standards- Pesticides, Resource, Recovery Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04., ASTM, Philadelphia, PA.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1993. Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates. E1383-93, p. 1173-1199. In: 1993 Annual Book of ASTM Standards- Pesticides, Resource, Recovery Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.04., ASTM, Philadelphia, PA.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 1995. Standard test methods for measuring the toxicity of sediments-associated contaminants with freshwater Invertebrates. E1706-95, pp. 1285-1199. In: 1995 Annual Book of ASTM Standards- Pesticides, Resource, Recovery Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects, Vol. 11.05., ASTM, Philadelphia, PA.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2003. Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine invertebrates. ASTM Designation: E 1367-03. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

- Atli G, Canli M. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 1884-1889.
- Barata C, Porte C, Baird DJ. 2004. Experimental designs to assess endocrine disrupting effects in invertebrates: A review. *Ecotoxicology.* 13: 511-517.
- Barata C, Lekumberri I, Vila-Escal M, Prat N, Porte C. 2005a. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). *Aquat. Toxicol.* 74: 3-19.
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. 2005b. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140: 175-186.
- Bartlett AJ, Borgmann U, Dixon DG, Batchelor SP, Maguire RJ. 2005. Toxicity and bioaccumulation of tributyltin in *Hyalella azteca* from freshwater harbour sediments in the great lakes basin, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62: 1243-1253.
- Barrera Escorcía G. 2006. Toxicidad del cromo y cadmio en ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin) de la Laguna de Mandinga, Veracruz. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. DF, México, 229 pp.
- Bat L. 1998. Influence of sediment on heavy metal uptake by the polychaete *Arenicola marina*. *Tr. J. Zoology.* 22: 341-350.
- Batley GE, Burton GA, Chapman PM, Forbes VE. 2002. Uncertainties in sediment quality Weight-of-Evidence (WOE) assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 8: 1517-1547.
- Battaglin WA, Fairchild J. 2002. Potential toxicity of pesticides measured in Midwestern streams to aquatic organisms. *Water Sci. Technol.* 45: 95-103.
- Bergmeyer HU. 1985. *Methods of Enzymatic Analysis*. VHC Publisher, Florida.
- Blenkinsopp SA, Gabbott PA, Freeman C, Lock MA. 1991. Seasonal trends in river biofilm storage products and electron transport system activity. *Freshw. Biol.* 26: 21-34.
- Borgmann U. 1978. The effect of temperature and body size on electron transport system activity in freshwater zooplankton. *Can. J. Zool.* 56:634-642.
- Borgmann U. 1994. Chronic toxicity of ammonia to the amphipod *Hyalella azteca*; importance of ammonium ion and water hardness. *Environ. Pollution.* 86: 329-335.
- Borgmann U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquat. Ecosyst. Health.* 3: 277-289.
- Borgmann U. 2003. Derivation of cause-effect based sediment quality guidelines. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 60: 352-360.
- Borgmann U, Munawar M. 1989. A new standardized sediment bioassay protocol using the amphipod *Hyalella azteca* (Saussure). *Hydrobiologia.* 188/189: 425-431.
- Borgmann U, Norwood WP. 1997. Toxicity and accumulation of zinc and copper in *Hyalella azteca* exposed to metal-spiked sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 1046-1054.
- Borgmann U, Ralph KM, Norwood WP. 1989. Toxicity test procedures for *Hyalella azteca*, and chronic toxicity of cadmium and pentachlorophenol to *H. azteca*, *Gammarus fasciatus*, and *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18: 756-764.

- Borgmann U, Norwood WP, Babirad IM. 1991. Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of cadmium in *Hyalella azteca*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48: 1055-1060.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., and Clarke, C. 1993. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. Hydrobiologia. 259: 79-89.
- Borgmann U, Couillard Y, Doyle P, Dixon G. 2005. Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. Environ. Toxicol.Chem. 24: 641–652.
- Boudou A, Inza B, Lemaire-Gony S, Maury-Brachet R, Odin M, Ribeyre F. 1998. Metal bioaccumulation in freshwater systems: experimental study of the actions and interactions between abiotic and contamination factors. In: Ecotoxicology. Schuurmann G. Markert B. (Eds). pp: 451-482.
- Bouskill NJ, Handy RD, Ford TE, Galloway TS. 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65: 342-349.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J. 128: 617-630.
- Brooks SJ, Mills CL. 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Comp. Biochem. Physiol. A 135: 527-537.
- Brown GE, Foster AL, Ostergren JD. 1999. Mineral surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. Colloquium Paper Proc Natl Acad Sci. USA 96, 3388–3395.
- Brown RJ, Galloway TS, Loweb D, Brownea MA, Dissanayake A, Jones MB, Depledge MH. 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquat. Toxicol. 66: 267-278.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipids peroxidation. Methods Enzymol. 52: 302-310.
- Burton GA Jr. 1992. Sediment collection and processing: factors affecting realism. In: Sediment toxicity assesment. Burton GA Jr. (Ed). Lewis Publ., Boca Raton. pp: 167- 182.
- Burton, G.A., 2002. Sediment quality criteria in use around the world. Limnology. pp. 65-75.
- Burton GA Jr, Norberg-King TJ, Ingersoll CG, Benoit DA, Ankley GT, Winger PV, Kubitz J, Lazorchak JM, Smith ME, Greer E, Dwyer JF, Call DJ, Day KE, Kennedy P, Stinson M. 1996. Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. Environ. Toxicol. Chem. 15: 1335-1343.
- Cairns J Jr. 1986. The myth of the most sensitive species. BioScience. 36: 670-672.
- Cammen LM, Corwin S, Christensen JP. 1990. Electron transport system (ETS) activity as a measure of benthic macrofaunal metabolism. Marine Ecol. Prog. Ser. 65: 171-182.
- Campagna AF, Kawamura Rodrigues B, Corrêa Nogueirol R, Fenerich Verani N, Gaeta Espíndola EL, Ferracciú Alleoni LR. 2013. Use of artificial sediment to assess toxicity of chromium on *Chironomus xanthus*, *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*. Acta Limnol. Bras. 25: 42-53.
- Casset MA, Momo FR, Giorgi ADN. 2001. Dinámica poblacional de dos especies de anfípodos y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del río Luján. Ecología Austral. 11: 79 - 85.

- Castiglioni DS, Oliveira GT, Buckup L. 2010. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 156: 436-444.
- Castro H, Ramalheira F, Quintino V, Rodrigues AM. 2006. Amphipod acute and chronic sediment toxicity assessment in estuarine environmental monitoring: An example from Ria de Aveiro. NW Portugal. *Mar. Poll. Bull.* 53: 91–99.
- Cavallieri F. 1955. Anfípodos de agua dulce de la República Argentina. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Bs. As, Argentina, inédita.
- CEQG (Canadian Environmental Quality Guidelines) 2013. Sediment quality guidelines for the protection of aquatic life. <http://ceqgrcqe.ccme.ca/>.
- Chan LPE, Swaminathan R. 1986. Adenosine-triphosphate interferes with phosphate determination. *Clin. Chem.* 32: 1981-1981.
- Chapman PM. 1989. Review: current approaches to developing sediment quality criteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 589-599.
- Chen C, Folt CL. 2000. Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. *Environ. Sci. Tec.* 34: 3878-3884.
- Clement B, Cadier C. 1998. Development of a new laboratory/sediment microcosm test. *Ecotoxicology.* 7: 279-280.
- Cohen JH, Forward R.B.Jr. 2005. Photobehaviour as an inducible defense in the marine copepod *Calanopia americana*. *Limnol. Oceanogr.* 50: 1269-1277.
- Collyard SA, Ankey GT, Hoke RA, Goldenstein T. 1994. Influence of age on the relative sensitivity of *Hyalella azteca* to Diazinon, alkyphenolethoxylates, copper, cadmium, and zinc. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26:110-113.
- Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala-Médioni A, Camus L, Colaço A, Serrão-Santos R, Bebianno MJ. 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiulus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *Sci. Total Environ.* 389: 407–417.
- Correia AD, Lima G, Costa MH, Livingstone DR. 2002. Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity. *Biomarkers.* 7: 101-127.
- Correia AD, Costa MH, Luis OJ, Livingstone DR. 2003. Age-related changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289: 83-101.
- Correia AD, Sousa A, Costa MH, Moura I, Livingstone DR. 2004. Quantification of metallothionein in whole body *Gammarus locusta* (crustacea: amphipoda) using differential pulse polarography. *Toxicol. Environ. Chem.* 86: 23-36.
- Dallinger R. 1994. Invertebrate organisms as biological indicators of heavy metal pollution. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48: 27-31.
- Day K, Kirby R, Reynoldson T. 1995. The effect of manipulations of freshwater sediments on responses of benthic invertebrates in wholesediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:1333-1343.
- De Coen WM, Janssen CR. 2003. The missing biomarker link: relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:1632–1641.

- De Cohen WM, Janssen CR. 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing II. Digestive enzyme activity in *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of cadmium, chromium and mercury. *Chemosphere*. 35: 1053-1067.
- de la Torre FR, Salibián A, Ferrari L. 1999. Enzyme activities as biomarkers of fresh-water pollution: responses of fish branchial (Na⁺/K⁺) ATPase and liver transaminases. *Environ. Toxicol.* 14: 313-319.
- De los Ríos-Escalante P, Morrone JJ, Rivera R. 2010. Distributional patterns of the South American species of *Hyalella* (Amphipoda: Hyalellidae). *Gayana*. 76: 153-161, 2012.
- Depetris PJ. 1995. Los sedimentos fluviales y lacustres: granulometría y contenido de materia orgánica. En: Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio, tomo I. Lopretto EC, Tell G. (Eds.). Ediciones Sur, La Plata, Argentina. pp. 67-78.
- Devol AH, Packard TT. 1978. Seasonal changes in respiratory enzyme activity and productivity in Lake Washington microplankton. *Limnol. Oceanogr.* 23:104-111.
- Di Giulio RT, Benson WH, Sanders BM, van Veld PA. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. pp: 523-561.
- Di Marzio WD, Saenz ME, Alberdi JL, Tortorelli MC. 1999. Assessment of the toxicity of stabilized sludges using *Hyalella curvispina* (Amphipoda) bioassay. *Environ. Contam. Toxicol.* 63: 654-659.
- Di Marzio WD, Sáenz M, Alberdi J, Tortorelli M, Galassi S. 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a fresh water environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61: 380-391.
- Di Marzio WD, Sáenz ME, Alberdi JL, Fortunato N, Cappello V, Montivero C, Ambrini G. 2010. Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 29: 1907-1917.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2012. Infostat, version Grupo Infostat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Donker MH. 1992. Energy reserves and distribution of metals in populations of the isopod *Porcellio scaber* from metal contaminated sites. *Funct. Ecol.* 6: 445-454.
- Doyle SR. 2007. Tasa metabólica y su relación con el tamaño corporal y temperatura ambiente en *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). Tesis. Universidad Nacional de Luján, Bs.As, Argentina. 60pp.
- Doyle S, Momo FR. 2009. Effect of body size and temperature on the metabolic rate of *Hyalella curvispina* (Amphipoda). *Crustaceana*. 82: 1423-1439.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquín M, Babut M, Vasseur P. 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidis*. *Aquat. Toxicol.* 39: 93-110.
- Drouot C, Mouneyrac C, Pellerin J, Péry A. 2008. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. In: *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Amiard JC, Amiard-Triquet C (Eds.). Lavoisier, Paris, pp. 273-289.
- Dutra BK. 2012. Avaliação do impacto no ambiente de compostos hidrossolúveis de *Pinus taeda* e *Araucaria angustifolia* (Coniferae) utilizando indicadores biológicos. Tesis Doctoral, Pontificia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, Brasil. 166 pp.

- Dutra BK, Castiglioni DS, Santos RB, Bond-Buckup G, Oliveira GT. 2007. Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148: 239-247.
- Dutra BK, Fernandes FA, Oliveira GT. 2008. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na⁺/K⁺ ATPase activity of *Hyalella pleoacuta* and *Hyalella curvispina* in bioassays. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147: 179-188.
- Dutra BK, Fernandes FA, Oliveira GT. 2009. Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na⁺/K⁺ ATPase activity of *Hyalella pleoacuta* and *Hyalella curvispina* in bioassays. *Comp. Biochem. Physiol. C* 147: 179-188.
- Dutra BK, Fernandes FA, Failace DM, Oliveira GT. 2011. Effect of roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology*. 20: 255-263.
- Dutra B.K, Santos RB, Bueno AAP, Oliveira GT. 2011a. Effect of the different diets in the biochemical composition, lipid peroxidation and reproductive traits of *Hyalella pleoacuta* and *Hyalella curvispina*. *Animal Biology (Print)*. 61: 349-368.
- EC (Environment Canada). 1990. Guidance Document on Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants. Environmental Protection Series. Report: EPS 1/RM/12.
- EC (Environment Canada). 1994. Guidance Document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological testing. Environmental Protection Series. Report: EPS1/RM/29.
- EC (Environment Canada). 1995. Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Report EPS 1/RM/30: 1-56 Environment Canada, Ottawa.
- EC (Environment Canada). 1997. Environmental Protection Series. Biological test method: test for survival and growth in sediment using freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Report: EPS 1/RM/33.
- EC (Environment Canada). 2013. Biological test method: test for survival and growth in sediment and water using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Report: EPS 1/RM/33 Secon Edition.
- ECB (European Chemicals Bureau). 2003. Technical Guidance Document on Risk Assessment Part II in Support of Commission Directive 93/67/ EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Ispra, Italy: Institute for Health and Consumer Protection, European Commission, Joint Research Centre.
- Edwards PA, Simkiss K. 2005. Dietary influences on the bioaccumulation of pollutants by the annelid, *Lumbriculus variegatus*: experiments comparing artificial particles and natural sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74: 328-334.
- Eisler R. 1985. Cadmium hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Biological Report 85 (1.2). U.S. Fish and Wildlife Service. Maryland, USA, 30 pp.
- Eisler R. 1998. Copper hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. Biological Science Report. U.S. Geological Survey. Maryland, USA, 120 pp.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1984. Estimating concern levels for concentrations of chemical substances in the environment. Environmental effects Branch, Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.

- Esmann M. 1988. ATPase and phosphatase activity of Na⁺K⁺-ATPase: molar and specific activity, protein determination. *Methods Enzymol.* 156: 105-115.
- Espina S, Vanegas C. 2005. Ecotoxicología y contaminación. En: Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Int A, Bottello V, Rendón-von Osten J, Gold-Bouchot G, Agraz-Hernández C. (Eds). Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología. pp: 79-120.
- Fang Y, Yang H, Wang T, Liu B, Zhao H, Chen M. 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 151: 325-333.
- Feijó C, Giorgi A, García ME, Momo F. 1999. Temporal and spatial variability in streams of pampean basin. *Hydrobiologia.* 39: 41-52.
- Feiler U, Kirchesch I, Heininger P. 2004. A new plant-based bioassay for aquatic sediments. *J. Soil. Sediment.* 4: 261-266.
- Ferrari L. 2006. Generalidades sobre ecotoxicología. En Principios de Genética Toxicológica. Mudry M, Carballo M. (Eds.). pp: 393-421.
- Ferrari L, García ME, de la Torre FR, Demichelis SO. 1998. Evaluación ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat. n.s.* 148: 1-16.
- Fidalgo F. 1983. Algunas características de los sedimentos superficiales en la cuenca del Río Salado y en la Pampa Ondulada. Coloquio internacional sobre hidrobiología de grandes llanuras. 1045-1066.
- Figueiredo Fernandes A, Ferreira Cardoso JV, Garcia Santos S, Monteiro SM, Carrola J, Matos P, Fotaínhas Fernandes A. 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesqui. Vet. Bra.* 27:103-109.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Folk RL. 1954. The distinction between grain size and mineral composition in sedimentary rock nomenclature. *J. Geol.* 62: 344-359.
- Frink CR. 1996. A perspective on metals in soils. *J. Soil Contam.* 5: 329-359.
- Funck J, Danger M, Gismondi E, Cossu-Leguille C, Guérold F, Felten V. 2013. Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) exposed to silver. *Aquat. Toxicol.* 142-143: 73-84.
- Furuno K, Suetsugu T, Sugihara N. 1996. Effects of metal ions on lipid peroxidation in cultured rat hepatocytes loaded with a-linolenic acid. *J. Toxicol. Environ. Health.* 48: 121-129.
- Gaetke LM, Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 189: 147-163.
- Gantes HP, Tur NM. 1995. Variación temporal de la vegetación en un arroyo de llanura. *Rev. Brasil. Biol.* 55: 259-266.
- García ME. 2009. Estudio del efecto de la contaminación sobre invertebrados del complejo zoobentónico en arroyos de la llanura pampeana. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Bs.As., Argentina. 322pp.

- García ME, Rodrigues-Capítulo A, Ferrari L. 2010. Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyalella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicity studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 771-778.
- García ME, Rodríguez Capítulo A, Ferrari L. 2012. Age differential response of *Hyalella curvispina* to a cadmium pulse: influence of sediment particle size. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80: 314-320.
- García González P, Souto ME. 1987. Estudio experimental sobre apareamiento y especificidad sexual en "*Hyalella curvispina*" (Amphipoda). *Hidrobiología. Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat. "Bernardino Rivadavia"*, tomo VI, nº 1: 1-11.
- Gariboldi MC. 2010. Evaluación del efecto de contaminantes sobre tejidos de *Corydoras paleatus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae) en un ambiente lótico de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Tesis Universidad Maimónides, Bs.As., Argentina. 168 pp.
- Geary N, Langhans W, Scharrer E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.* 241: 330-335.
- Giorgi ADN, García ME, Feijoó C, Cuevas WO, Gómez Vázquez A. 2000. Estudio comparativo de los principales arroyos afluentes del río Luján (Argentina). En Péfaur, J.E. (Ed.). *Ecología Latinoamericana. Actas del III Congreso Latinoamericano de Ecología*. Editorial Universidad de Los Andes. Mérida. pp: 99-105.
- González E. 2001. Zoogeography and evolutionary patterns of Hyalellidae (Amphipoda: Crustacea). Thesis, University of Marine, Oregon, USA.
- Gonzalez E, Walting L. 2003. A new species of *Hyalella* from Brazil (Crustacea: Amphipoda: Hyalellidae), with redescriptions of three other species in the genus. *J. Nat. Hist.* 37: 2045-2076.
- Gorokhova E, Löf M, Reutgard M, Lindström M, Brita Sundelin B. 2013. Exposure to contaminants exacerbates oxidative stress in amphipod *Monoporeia affinis* subjected to fluctuating hypoxia. *Aquat. Toxicol.* 127: 46-53.
- Graca MA, Rodrigues Capítulo A, Ocón C, Gomez N. 2002. In situ tests for water quality assessment: a case study in Pampean rivers. *Water Res.* 36: 4033-4040.
- Grosso LE, Peralta M. 1999. Anfípodos de agua dulce Sudamericanos. Revisión del género *Hyalella* Schmitt. I. *Acta Zool. Lilloana.* 45: 79-98.
- Gutierrez MF, Paggi JC, Gagneten AM. 2010. Fish infochemicals alter life cycle and growth of a calanoid copepod. *J. Plankton Res.* 32: 47-55.
- Gutierrez MF, Gagneten AM. 2011. Efecto de los metales sobre microcrustáceos de agua dulce. Avances metodológicos y potencialidad de cladóceros y copépodos como organismos test. *Rev. peru. biol.* 18: 389-396.
- Heugens E, Hendriks A, Dekker T, van Stralen N, Admiraal W. 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factor for use in risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 31: 247-284.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Hill IR, Matthiessen P, Heimbach F. 1993. Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, SETAC-Europe.

- Hirt LM, Domitrovic HA, 2002. Toxicidad y respuesta histopatológica en *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a cloruro de cadmio en ensayos agudos y subletales. *Revista Ictiología*. 10:17-32.
- Hoguet J, Key PB. 2008. Baseline activities of four biomarkers in three life-stages of the amphipod, *Leptocheirus plumulosus*. *J. Environ. Sci. Health B*. 43: 465-470.
- Hung TC, Chuand A, Wu SJ, Tsai CCH. 1990. Relationships among the species and forms of copper and biomass along the Erhjin Chi coastal water. *Acta Oceanographica Taiwanica*. 25:65-76.
- Hutchinson TH, Solbe J, Kloepper-Sams PJ. 1998. Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) data base III - Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*. 36: 129-142.
- Ingersoll, C.G. 1995. Sediment Test. In: *Fundamental of aquatic toxicology*. Rand GM (Ed.). Taylor and Francis, Washinton, DC. pp: 231-255.
- Ingersoll CG, Dillon T, Biddinger GR. 1997. Ecological risk assessment of contaminated sediments. SETAC Pellston Workshop on Sediment Ecological Risk Assessment, 1995, Pacific Grove, California. SETAC, Pensacola, FL, USA, 390 pp.
- Ingersoll CG, Brunson EL, Dwyer FJ, Hardesty DK, Kemble NE. 1998. Use of sublethal endpoints in sediment toxicity tests with the amphipod *Hyalella azteca*. *Environ.Toxicol.Chem.*17: 1508-1523.
- Jergentz S, Pessacq P, Mugni H, Bonetto C, Schulz R. 2004. Linking in situ bioassays population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contaminations in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59: 133-141.
- Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*. 6: 817-826.
- Kater BJ, Hannewijk A, Postma JF, Dubbeldam M. 2000. Seasonal changes in acute toxicity of cadmium to amphipod *Corophium volutator*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3032-3035.
- Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G, Mattson MP. 1997. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience*. 80: 685-696.
- Kemble NE, Dwyer FJ, Ingersoll CG, Dawson TD, Norberg-King T. 1999. Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. *Environm. Toxicol. Chem.* 2: 22-230.
- Kenner RA, Ahmed SI. 1975. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 33:119-127.
- King CK, Simpson SL, Smith SV, Stauber JL, Batley GE. 2005. Short-term accumulation of Cd and Cu from water, sediment and algae by the amphipod *Melita plumulosa* and the bivalve *Tellina deltoidalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 287: 177-188.
- King CK, Gale SA, Hyne RV, Stauber JL, Simpson S, Hickey CW. 2006. Sensitivities of Australian and New Zealand amphipods to copper and zinc in waters and metal-spiked sediments. *Chemosphere*. 63: 1466-1476.
- Lee B-G, Griscom SB, Lee J-S, Choi HJ, Koh C-H, Luoma SN, Fisher NS. 2000. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. *Science*. 287: 282-284.

- Lima-Cazorla L, Carranza-Edwards A, Santiago-Pérez S. 2005. Niveles de plomo, zinc, cadmio y cobre en el río Almendares, Ciudad Habana, Cuba. *Rev. Int. Contam. Amb.* 21: 115-124.
- Linde-Arias AR, Inácio AF, Novo LA, de Albuquerque C, Moreira JC. 2008. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environ. Pollut.* 156: 974-979.
- Livingstone DR. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Rev. Med. Vet.* 154: 427-430.
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epidrimicin in mice. *Tumori.* 71: 241-249.
- López OCF, Duverne LB, Mazieres JO. 2013. Microbiological pollution of surface water in the upper-middle basin of the Reconquista river (Argentina): 2010–2011 monitoring. *Int. J. Environment and Health.* 6: 276-289.
- Lopretto EC. 1983. Contribución a la bioecología del anfípodo dulceacuícola *Hyaella pampeana* Cavallieri. Desarrollo embrionario. *Limnobiología.* 2: 471-490.
- Lukancic S, Zibrat U, Mezek T, Jerebic A, Simcic T, Brancelj A. 2010. Effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* L., and *Gammarus fossarum* Koch., to atrazine and imidacloprid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84: 85-90.
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 39: 20-31.
- Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, Mattson MP. 1997. Amyloid betapeptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J. Neurosci.* 17: 1046-1054.
- Marsden ID, Rainbow PS, Smith BD. 2003. Trace metal concentrations in two New Zealand talitrid amphipods: effects of gender and reproductive state and implications for biomonitoring. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 289: 93-113.
- Mastrangelo MM, Dos Santos Afonso M, Ferrari L. 2011. Cadmium toxicity in tadpoles of *Rhinella arenarum* in relation to calcium and humic acid. *Ecotoxicology.* 1-8.
- Mc Loughlin N, Yin D, Maltby L, Wood RM, Yu H. 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2085-2092.
- Meador JP. 1993. The effect of laboratory holding on the toxicity response of marine infaunal amphipods to cadmium and tributyltin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 174: 227-242.
- Mebane CA. 2006. Cadmium risks to freshwater life: derivation and validation of low-effect criteria values using laboratory and field studies. Scientific Investigations Report 2006–5245, US Geological Survey.
- Menchaca I, Belzunce MJ, Franco J, Garmendia JM, Montero N, Revilla M. 2010. Sensitivity comparison of laboratory-cultured and field-collected amphipod *Corophium multisetosum* in toxicity tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84: 390-394.
- Meyer E, Walter A. 1980. Methods for the estimation of protein, lipid, carbohydrate and chitin levels in fresh water invertebrates. *Arch. Hydrobiol.* 113: 161-177.

- MESL (MacDonald Environmental Sciences Ltd.). 2001. *Hyalella azteca* sediment toxicity test, solid-phase microtox toxicity test, metals analyses of whole sediment and pore water, and physical characterization of sediments of the Calcasieu estuary, Louisiana. Report for CDM Federal Programs Corporation, 73pp.
- Milani D, Reynoldson TB, Borgmann U, Kolasa J. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 845-854.
- Misra HP, Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 274: 3170-3175.
- Moriarty F. 1988. *Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems.* 2ª Edición. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- Mugni H, Ronco A, Bonetto C. 2011. Insecticide toxicity to *Hyalella curvispina* in runoff and stream water within a soybean farm (Buenos Aires, Argentina). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 350-54.
- Naimo TJ. 1995. A review of the effects of heavy-metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology.* 4: 341-362.
- Naqvi SM, Vaishnavi C. 1993. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol. C* 105: 347-361.
- Naylor C, Rodrigues C. 1995. Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere.* 31: 3291-3303.
- Nebeker AV, Onjukka ST, Cairns MA, Krawczyk DF. 1986. Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in cadmium-spiked water and sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 5: 933-938.
- Neff J. 1984. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 319: 132-136.
- Norberg-King T. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: the inhibition concentration (Icp) approach. National effluent toxicity assessment center, Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minnesota, Technical Report 03-93.
- Nowood WP, Borgmann U, Dixon DG, Wallace A. 2003. Effects of metal mixtures on aquatic biota: a review of observations and methods. *Humann and Ecol. Risk Assess.* 9: 795-811.
- NRC (Committee on Biological Markers of the National Research Council). 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74:3-9.
- Ochoa DM, González JF. 2008. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 55: 115-126.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 1981. Test Guideline 452. Chronic toxicity studies. In: OECD Guideline for the testing of chemicals. Organization for economic cooperation & development, Paris.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 1993. Guidelines for the testing of chemicals. Vol. 1 y 2, Paris, Francia.
- Oliveira GT, Fernandes FA, Bueno AAP, Bond-Buckup G. 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 147: 600-606.

- Onyatta JO, Huang PM. 1999. Chemical Speciation and bioavailability index of cadmium for selected tropical soils in Kenya. *Geoderma*. 91: 87-101.
- Ossana NA. 2011. Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 206 pp.
- Owens TG, King FD. 1975. The measurement of respiratory electron transport-system activity in marine zooplankton. *Mar. Biol.* 30:27-36.
- Packard TT. 1971. The measurement of respiratory electron transport activity in marine plankton. *J. Mar. Res.* 29:235-244.
- Pasteris A, Vecchi M, Reynolgsen TB, Bonomi G. 2003. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): a comparison of the 28 day reproductive bioassay a 6-month cohort experiment. *Aquat. Toxicol.* 65:253-265.
- Pastorinho MR, Telfer TC, Soares AMVM. 2009. Amphipod susceptibility to metals: Cautionary tales. *Chemosphere*. 75: 1423-1428.
- Peluso L. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Bs.As., Argentina. 170pp.
- Peluso L, Giusto A, Bulus Rosini GD, Ferrari L, Salibián A, Ronco AE. 2011. *Hyalella curvispina* (amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Fresen. Environ. Bull.* 20: 372-376.
- Perlata M, Grosso E. 2009. Crustacea, Syncárida, Amphipoda y Decapoda. En *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos sistemática y biología*. Domínguez E, Fernández HR (Eds.). Fundación Miguel Lillo Tucumán Argentina. pp. 469-496.
- Peters C, Ahlf W. 2005. Reproduction of the estuarine and marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas) in laboratory for toxicity testing. *Chemosphere*. 59: 525-536.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2007. Ribosomal genes as early targets of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. *Sci. Total Environ.* 373: 113-121.
- Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G. 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 408: 1598-1603.
- Planelló R, Servia MJ, Gómez-Sande P, Herrero O, Cobo F, Morcillo G. 2013. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environ. Toxicol.* 1-13. doi: 10.1002.
- Poretti T, Casset MA, Momo F. 2003. Composición química y dinámica poblacional de. *Biología Acuática*. 20: 2001-2004.
- Porta A. 1996. Contaminación ambiental: uso de indicadores bioquímicos en evaluaciones de riesgo ecotoxicológico. *Acta Bioq. Clín. Latin.* 30: 67-79.
- Pourahmad J, O'Brien PJ, Jokar F, Daraei B. 2003. Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol. In Vitro.* 17: 803-810.
- Rambabu JP, Rao MB. 1994. Effect of an organochlorine and three organophosphate pesticides on glucose, glycogen, lipid, and protein contents in tissues of the freshwater snail *Bellamya dissimilis* (Müller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 142-148.

- Rand GM, Wells PG, McCarty LS. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Fundamental of aquatic toxicology. Rand GM. (Ed.). Taylor and Francis, Washinton, DC. pp. 3-66.
- Ré A, Freitas R, Sampaio L, Rodriguez AM, Quintino V. 2009. Estuarine sediment acute toxicity testing with the European amphipod *Corophium multisetosum* Stock, 1952. Chemosphere. 76: 1323-1333.
- Redmond AM, Lamberson JO, Cole FA, Swartz C. 1994. Preliminary culture and life-cycle experiments with the benthic amphipod *Ampelisca abdita*. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1355-1365.
- Reynoldson TB, Day KE, Clarke C, Milani D. 1994. Effects of indigenous animals on chronic endpoints in freshwater sediment toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 13: 973-977.
- Ribeiro R, Kelly LA, Goncalves F, Burton Jr GA, Soares AMVM. 1999. New artificial sediment for *Chironomus riparius* toxicity testing. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63: 691-697.
- Ribeiro S, Sousa JP, Nogueira AJA, Soares AMVM. 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 49: 131-138.
- Rigacci LN, Giorgi ADN, Vilches CS, Ossana NA, Salibián A. 2013. Effect of a reservoir in the water quality of the Reconquista River, Buenos Aires, Argentina. Environ. Monit. Assess. 185: 9161-9168.
- Robinson AM, Lamberson JO, Cole FA, Swartz RC. 1988. Effects of culture conditions on the sensitivity of a phoxocephalid amphipod, *Rhepoxynius abronius*, to cadmium in sediment. Environ. Toxicol. Chem. 7: 953-959.
- Rodríguez Capítulo A. 1984. Incidencia del arsénico en parámetros biológicos de *Palaemonetes argentinus nobili* (Decapoda Natantia). Limnobiós 2:609-612.
- Roman YE, De Schamphelaere KAC, Nuyen LTH, Janssen CR. 2007. Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: sensitivity comparison and preliminary risk assessment. Sci. Total Environ. 387: 128-140.
- Ronco AE, Sobrero MC, Alzuet PR, Bulus Rossini GD, Dutka B. 1995. Screening for sediment toxicity in the Río Santiago basin: A base line study. Environ. Toxic. Water. 10: 35-39, 1995.
- Ronco A, Díaz Báez C, Pica Granados Y. 2004. Conceptos generales. En: Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de la calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Castillo Morales G. (Ed). IMTA (México)-IDRE (Canadá), México. pp17-22.
- Ronco A, Peluso L, Jurado M, Bulus Rosini GD, Salibián A. 2008. Screening of sediment pollution in tributaries from the southwestern coast of the Rio de la Plata estuary. Lat. Am. J. Sedimentol. Basin. Anal. 15: 67-75.
- Salibián A. 2006. Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. In: Reviews of Environmental contamination and Toxicology. Ware GW (Ed.).Springer, New York, pp. 35-65.
- Sancho E, Ferrando MD, Fernandez C, Andreu E. 1998. Liver energy metabolism of *Anguilla anguilla* after exposure to fenitrothion. Ecotoxicol. Environ. Saf. 41: 168-175.
- Sandrini JZ, Regoli F, Fattorini D, Notti A, Ferreira Inácio A, Linde-Arias AR, Laurino J, Bairy ACD, Marins LF, Monserrat JM. 2006. Temporal responses to cadmium in the estuarine polychaete *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): sub cellular distribution and oxidative stress generation. Environ. Toxicol. Chem. 25: 1337-1344.

- Sandrini JZ, Lima JV, Regoli F, Fattorini D, Notti A, Marins LF, Monserrat JM. 2008. Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70: 115-120.
- Servia MJ, Pery ARR, Heydorff M, Garric J, Lagadic. 2006. Effects of copper on energy metabolism and larval development in the midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology* 15: 229-240.
- Shepherd GM. 1994. *Neurobiology*, 3RD ED., Oxford University Press, New York.
- Sherry, J. P. 2003. The role of biomarkers in the health assessment of aquatic ecosystems. *Aquat. Ecosyst. Health Manage.* 6: 443-440.
- Shuhaimi-Othman M, Pascoe D. 2007. Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66: 29-35.
- Shuhaimi-Othman M, Pascoe D, Abas A. 2002. Bioconcentration of cadmium by freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Proceedng of the Regional Symposium on Environmental Natural Resources, Malasya*. Omar R, Alí Rahman Z, Latif MT, Lihan T, Adam JH (Eds.). pp: 637-646.
- Sibly A, Calow P. 1989. A life-cycle theory or responses to stress. *Biol. J. Linn. Soc.* 7: 101-116.
- Silva J, Fuentealba C, Bay-Schmith E, Larrain A. 2007. Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* 71: 135-141.
- Silva Castiglioni D, Dutra BK, Cahansky A, Rodriguez E , Oliveira GT, Bond-Buckup G. 2010. Variations in biochemical composition and lipoperoxidation levels of *Hyalella bonariensis* maintained in laboratory with different diets. *Animal Biology.* 60:349-360.
- Simčič T, Brancelj A. 2001. Seasonal dynamics of metabolic activity of the Daphnia community in Lake Bled (Slovenia). *Hydrobiologia.* 442: 319-328.
- Simčič T, Brancelj A. 2002. Intensity of mineralization processes in mountain lakes in NW Slovenia. *Aquat. Ecol.* 36:345-354.
- Simčič T, Brancelj A. 2003. Estimation of the proportion of metabolically active mass in the amphipod *Gammarus fossarum*. *Freshw. Biol.* 48:1093-1099.
- Simčič TT, Brancelj A. 2004. Respiratory electron transport system (ETS) activity as an estimator of the thermal tolerance of two Daphnia hybrids. *J. Plankton Res.* 26: 525-534.
- Simčič T, Lukancic S, Brancelj A. 2005. Comparative study of electron transport system activity and oxygen consumption of amphipods from caves and surface habitats. *Freshw. Biol.* 50: 494-501.
- Simčič T, Pajk F, Vrezec A, Brancelj A. 2012. Size scaling of whole body metabolic activity in the noble crayfish (*Astacus astacus*) estimated from measurements on a single leg. *Freshw. Biol.* 57: 39-48.
- Simpson SL. 2005. An exposure-effect model for calculating copper effect concentrations in sediments with varying copper binding properties a synthesis. *Environ. Sci. Technol.* 39: 7089-7096.
- Simpson SL, King CK. 2005. Exposure-pathway models explain causality in whole sediment toxicity tests. *Environ. Sci. Technol.* 39: 837-843.
- Simpson SL, Roland MGE, Stauber JL, Batley GE. 2003. Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.

- Simpson SL, Angel BM, Jolley DF. 2004. Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests. *Chemosphere*. 54: 597-609.
- Sorensen EMB, Acosta D, Nealon DG. 1985. Effects of cadmium and calcium on the fluidity of plasma membranes. *Toxicol. Lett.* 25: 319-326.
- Sorensen FF, Weeks JM, Baatrup E. 1997. Altered locomotory behavior in woodlice (*Oniscus asellus* (L.)) collected at a polluted site. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 685-690.
- Sorensen PW, Schoenfuss HL, Adelman IR, Swackhamer DL. 2001. Assessing the effects of endocrine disruptors (EDCs) from a St. Paul sewage treatment plant on sperm viability and testicular development in fish: adding a new dimension to an existing project. *WCR Research*. pp. 35-37.
- Sornom P, Felten V, Médoc V, Sroda S, Rousselle P, Beisel JN. 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ. Pollut.* 158: 1288-1295.
- Sroda S, Cossu-Leguille C. 2011. Effects of sublethal copper exposure on two gammarid species: which is the best competitor? *Ecotoxicology* 20: 264-273.
- Stanley JK, Brooks BW, La Point TW. 2005. A comparison of chronic cadmium effects on *Hyalella azteca* in effluent-dominated stream mesocosms to similar laboratory exposures in effluent and reconstituted hard water. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 902-908.
- Stoeppler M. 1991. Cadmium. In: *Metals and their compounds in the environment*. Marian E. (Ed.). VGH, Weinheim, Germany. pp: 803-851.
- Stohs SJ, Bagghi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free. Radic. Biol. Med.* 18: 321-336.
- Suedel BC, Rodgers JH. 1994. Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.
- Suter GW II. 1993. *Ecological risk assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 538 pp.
- Timbrell LA. 2009. *Principles of biochemical toxicology*, 4th edn. Informa Healthcare, New York.
- Timofeyev MA, Steinberg CEW. 2006. Antioxidant response to natural organic matter (NOM) exposure in three Baikalean amphipod species from contrasting habitats. *Comp. Biochem. Physiol. B* 145: 197-203.
- Timofeyev MA, Shatilina ZM, Kolesnichenko AV, Kolesnichenko VV, Steinberg CEW. 2006a. Specific antioxidant reactions to oxidative stress promoted by natural organic matter in two amphipod species from Lake Baikal. *Environ. Toxicol.* 21: 104-110.
- Timofeyev MA, Shatilina ZM, Kolesnichenko AV, Bedulina DS, Kolesnichenko VV, Pflugmacher S, Steinberg CEW. 2006b. Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus lacustris* and *Gammarus tigrinus* (Sexton). *Sci. Total Environ.* 366: 673-681.
- Timofeyev MA, Protopopova M, Pavlichenko V, Steinberg CE. 2009. Can acclimation of amphipods change their antioxidative response. *Aquat. Ecol.* 43: 1041-1045.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1991. Standard Operating Procedure for the Culture of *Hyalella azteca*. J. Denny and S. Coolyard, Oct.25, 1991 draft, 19p. Environmental Research laboratory, USEPA, Duluth, MN, (Unpublished Report). 1991a-b.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1991. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Report EPA-600/4-90/027, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati, OH. (1991c).
- USEPA (Environmental Protection Agency). 1992. Sediment classification methods compendium. Office of Science and Technology. Report: EPA 823-R-92-006.
- USEPA (Environmental Protection Agency). 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. First Edition. EPA/600/R-94/024, Duluth, MN.
- USEPA (Environmental Protection Agency). 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates Second Edition. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA 600/R-99/064.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2007. Framework for metals risk assessment. EPA 120/R-07/001. Washington, DC. Office of the Science Advisor.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2012. Linking Restoration Practices to Water Quality Parameters. En: <http://water.epa.gov/type/watersheds/archives/chap3.cfm>.
- Vaithyanathan P, Ramanathan A, Subramanian V. 1993. Transport and distribution of heavy metals in Cauvery River. *Water Air Soil Pollut.* 71: 13-28.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13:57-149.
- Van der Ven LTM, Wester PW, Vos JG. 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in *zebrafish*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 908-913.
- Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11: 256-265.
- Vellinger C, Gismondi E, Felten V, Rousselle P, Mehennaoui K, Parant M, Usseglio-Polatera P. 2013. Single and combined effects of cadmium and arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda): Understanding the links between physiological and behavioural responses. *Aquat. Toxicol.* 140-141: 106-16.
- Venturino A, Montagna CM, de D'Angelo AMP. 2007. Risk assessment of Magnacide® H herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 3: studies on native species. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 176-182.
- Verrhiest GJ, Cortes S, Clément BC, Montuelle B. 2002. Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments. *Chemosphere.* 46: 961-974.
- Viarengo A, Canesi L, Martinez P, Peters L, Livingstone D. 1995. Prooxidant processes and antioxidant defense systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 111: 119-126.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology.* 192: 95-117.
- Wang F, Goulet RR, Chapman PM. 2004. Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature. *Chemosphere.* 57: 1713-1724. Weber CI. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th edn. Environmental Monitoring Systems Laboratory, US-EPA 600/4-90/027.

Widdows J, Donkin P. 1992. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, first ed. Gosling E. (Ed.). Elsevier, London. pp. 383-424.

Winger PV, Lasier PJ, White DH, Seginak JT. 2000. Effects of contaminants in dredge material from the lower Savannah River. *Arch Environ Contam Toxicol.* 38:128-136.

Zar JH. 1999. *Statistical Analysis*. Prentice Hall, NY. 662 pp.