

**Universidad Nacional de La Plata**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
Departamento de Ciencias Biológicas



**Evaluación de efectos biológicos y  
biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos  
del Río de la Plata y afluentes**

**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR  
María Leticia Peluso**

**DIRECTORA: Dra. Alicia Estela Ronco**  
**Co-DIRECTOR: Dr. Alfredo Salibián**

Desarrollada en el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente,  
CIMA, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas,  
Universidad Nacional de la Plata

**2011**

**Agradecimientos**

*A la ANPCyT y CONICET por las becas otorgadas.*

*A mis directores, Alicia Ronco y Alfredo Salibián por confiar en mí, por guiarme y brindarme siempre su apoyo durante estos años de trabajo.*

*Al Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA) por brindarme lugar de trabajo, especialmente a Gustavo Bulus Rossini por la confianza y el apoyo incondicional durante toda mi carrera.*

*Al Programa de Ecofisiología Aplicada de la Universidad Nacional de Luján por incorporarme en la realización de tareas dentro del Proyecto de ANPCyT.*

*A todos mis compañeros de trabajo, los actuales y los que estuvieron, por la buena predisposición, las charlas, los mates, y porque todos de alguna u otra forma colaboraron para que este trabajo sea posible.*

*A mi esposo Guillermo Natale, por transmitirme cada día su pasión y dedicación por la tarea científica. Le agradezco sus palabras de aliento en los momentos críticos y la ayuda brindada en el trabajo y en lo cotidiano, y en especial por todos estos años juntos y por enseñarme que todo es posible con esfuerzo y amor por lo que hacemos.*

*A mis padres, muy especialmente, por darme la posibilidad de estudiar e incentivar-me a hacerlo y por estar siempre presentes, ayudándome en todo momento brindándome su amor incondicionalmente.*

*A Cielo y Carlos, por la invaluable ayuda que me brindaron, especialmente en esta última etapa de mi vida.*

*A mis hermanos y a toda mi familia por ocuparse de mis pequeños en los momentos en que más lo necesité, los cuales no fueron pocos....*

*Le agradezco a Anahí Silvestro por su colaboración en la realización de bioensayos en el laboratorio y por la ayuda brindada en el mantenimiento de los anfípodos.*

*A Agata Peluso, Raúl Herrera y Nicolás Notarangelo, les agradezco la ayuda brindada en la edición de este manuscrito.*

*Y muy especialmente a mis hijos, Matu y Lu por ser los soles que me dan la energía necesaria para comenzar cada día....*

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Introducción general</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Importancia de los sedimentos en ambientes acuáticos</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Geoquímica de los sedimentos y biodisponibilidad de contaminantes</b>	<b>3</b>
<b>I.3 Biota asociada a los sedimentos</b>	<b>5</b>
<b>I.4 Estrategias de evaluación de efectos de sedimentos contaminados</b>	<b>5</b>
I.4.1 Ensayos de toxicidad	9
<b>I.5 Antecedentes de contaminación en sedimentos</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Hipótesis y Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>II.1 Hipótesis general de trabajo</b>	<b>17</b>
II.1.1 Hipótesis específicas	17
<b>II.2 Objetivos Generales</b>	<b>17</b>
II.2.1 Objetivos particulares	18
<b>II.3 Estrategia y diseño experimental empleado en el estudio</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Descripción de <i>Hyalella curvispina</i> como organismo prueba para el estudio de efectos biológicos de contaminantes en sedimentos. Condiciones de cría y mantenimiento, estudio de parámetros poblacionales.</b>	<b>20</b>
<b>III.1 Introducción</b>	<b>20</b>
III.1.2 Especies utilizadas en ensayos de toxicidad estandarizados	20
III.1.3 Selección de organismos autóctonos	21
<b>III.2 Especie prueba: <i>Hyalella curvispina</i> Shoemaker, 1942</b>	<b>24</b>
III.2.1 Ubicación sistemática	25
III.2.2 Biología y distribución	25
<b>III.3 Obtención y mantenimiento en laboratorio de individuos de <i>H. curvispina</i></b>	<b>26</b>
III.3.1 Recolección de individuos en campo	26
III.3.2 Mantenimiento en laboratorio	27
<b>III.4 Experimentos de alimentación y reproducción de <i>H. curvispina</i> en condiciones de laboratorio</b>	<b>29</b>
III.4.1 Metodología	29
III.4.2 Resultados y discusión	31
<b>III.5 Cultivo en laboratorio</b>	<b>35</b>

**CAPÍTULO IV**

<b>Ensayos de toxicidad aguda de metales pesados y glifosato con <i>H. curvispina</i> en agua</b>	<b>38</b>
IV.1 Introducción	38
IV.2 Metodología	40
IV.2.1 Metodología general de ensayo de toxicidad	41
IV.2.2 Ensayos de toxicidad con compuestos puros: cobre, mercurio y glifosato.	44
IV.2.3 Ejercicio interlaboratorios con tóxicos de referencia	45
IV.3 Resultados y discusión	46
IV.3.1 Ensayos de toxicidad con compuestos puros	46
IV.3.2 Ejercicio interlaboratorios con tóxicos de referencia	55

**CAPÍTULO V**

<b>Evaluación ecotoxicológica de sedimentos con adiciones de mercurio y la influencia de la matriz sobre su biodisponibilidad con <i>H. curvispina</i> como organismo prueba</b>	<b>60</b>
V.1 Introducción	60
V.1.1 Sedimentos adicionados	60
V.1.2 Antecedentes generales del mercurio como contaminante	62
V.1.3 Antecedentes de contaminación con mercurio a nivel regional	67
V.2 Metodología	68
V.2.1 Sedimentos utilizados en los bioensayos	69
V.2.2 Diseño experimental y metodología de ensayo	69
V.2.3 Análisis estadístico	72
V.3 Resultados y discusión	72
V.3.1 Experimento 1: sedimento formulado con MO	73
V.3.2 Experimento 2: sedimento formulado con y sin MO y sedimento del A <sup>o</sup> J. Blanco.	75

**CAPÍTULO VI**

<b>Caracterización fisicoquímica y ecotoxicológica de sedimentos de fondo de afluentes del Río de la Plata</b>	<b>84</b>
VI.1 Introducción	84
VI.2 Selección de los sitios de estudio	85
VI.3 Metodología	92
VI.3.1 Toma y preservación de muestras de sedimentos	92
VI.3.2 Caracterización fisicoquímica	93
VI.3.3 Caracterización ecotoxicológica de sedimentos: ensayos de toxicidad con sedimento completo	96
VI.4 Resultados	99
VI.4.1 Sedimentos del Río de la Plata y arroyos afluentes (Grupo A)	99
VI.4.2 Sedimentos de la Cuenca del Río Luján (Grupo B)	111
VI.5 Discusión	121

**CAPÍTULO VII**

<b>Análisis e interpretación de resultados del estudio de los efectos biológicos y la caracterización fisicoquímica de sedimentos. Propuestas para la categorización de peligrosidad de muestras.</b>	<b>124</b>
---	------------

<b>VII.1 Introducción</b>	<b>124</b>
<b>VII.2 Metodología</b>	<b>125</b>
VII.2.1 Análisis de componentes principales	125
VII.2.2. Índice de calidad sedimentos (SQI)	125
VII.2.3 Índice Ecotoxicológico de Peligrosidad de Sedimentos	126
<b>VII.3 Resultados</b>	<b>127</b>
VII.3.1 Análisis de Componentes Principales	127
VII.3.2 Índice SQI	132
VII.3.3 Índice Ecotoxicológico de Peligrosidad de Sedimentos	134
<b>VII.4 Discusión</b>	<b>136</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>Conclusiones generales</b>	<b>138</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>141</b>
<b>Anexo</b>	<b>164</b>

## RESUMEN

Durante las últimas tres décadas se han utilizado numerosas estrategias orientadas a la evaluación, manejo y remediación de los sedimentos contaminados. La calidad de los mismos es un problema relevante y complejo cuando se deben introducir estrategias de protección de los sistemas acuáticos, o proyectar obras de dragado y disposición del refulado para mantener canales de navegación. Estas evaluaciones son complejas debido a la variabilidad que presentan los sedimentos en cuanto a sus características físicas, químicas, geoquímicas y biológicas.

El presente trabajo de tesis presenta los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la calidad de sedimentos utilizando una estrategia integrada, química-ecotoxicológica, estudiando efectos letales y subletales sobre un anfípodo representativo de las comunidades zoobentónicas en América del Sur, *Hyalella curvispina* por medio de bioensayos de toxicidad en condiciones controladas de laboratorio.

Se describen los experimentos realizados para obtener información sobre las tasas de crecimiento y reproducción de *H. curvispina* en laboratorio. La especie se adaptó fácilmente a las condiciones de cultivo y se determinaron las tasas de crecimiento y reproducción de dicha especie, que se utilizan como variables de respuestas subletales para la evaluación de efectos en bioensayos de toxicidad. A su vez, se describen de forma detallada las condiciones para mantener cultivos en laboratorio de manera continua mediante una técnica que permite disponer de individuos para su utilización como organismo prueba.

Se estudió la variabilidad en las respuestas biológicas de *H. curvispina* por exposición a tóxicos puros, adoptando una metodología estandarizada para *H. azteca* en bioensayos de toxicidad agudos en matriz acuosa. Los juveniles de *H. curvispina* resultaron sensibles a los metales pesados Cu, Cr, Hg y Zn, y al herbicida Glifosato, con una sensibilidad comparable a la de otras especies de invertebrados utilizados como organismos prueba. Para garantizar la reproducibilidad de la metodología utilizada, se efectuó un ejercicio interlaboratorios entre dos grupos participantes, realizando ensayos de toxicidad con seis muestras ciegas de tóxicos de referencia. La variabilidad encontrada inter-laboratorio se consideró aceptable y los resultados obtenidos son de importancia como base para el estudio de la sensibilidad de la especie.

Se seleccionó al mercurio para el estudio de su toxicidad y biodisponibilidad en sedimentos formulados artificialmente y naturales adicionados con dicho metal, sobre *H. curvispina* en

relación al contenido de materia orgánica y los niveles guías disponibles para dicho elemento. Los LOECs (menor concentración donde se observa efecto) calculados para el mercurio en este estudio fueron mayores a los niveles guía disponibles, tanto para la supervivencia como para el crecimiento como puntos finales en exposición crónica al sedimento adicionado. Por otro lado, los efectos tóxicos del mercurio sobre la supervivencia de *H. curvispina* en bioensayos con sedimentos adicionados con dicho elemento, en ausencia de materia orgánica en la matriz, son muy superiores a los registrados en presencia de materia orgánica. Estos resultados mostraron que la materia orgánica en el sedimento es un factor determinante sobre el efecto tóxico del mercurio.

Se realizó una primera evaluación de la toxicidad de sedimentos en sitios correspondientes a ríos y arroyos afluentes del Río de la Plata con diferentes grados de deterioro ambiental utilizando bioensayos de toxicidad en laboratorio con sedimento completo con *H. curvispina* como organismo prueba, además de la caracterización fisicoquímica de las muestras evaluadas. Los resultados de las evaluaciones indicaron severos efectos letales asociados a la contaminación química en las muestras obtenidas en el Riachuelo, el Canal Oeste, el A<sup>o</sup> Larena (Parque Industrial Pilar) y en algunos sectores del río Luján. A su vez, la herramienta bioanalítica utilizada también permitió detectar niveles de contaminación intermedia en algunos sitios como la desembocadura del Río Luján y el Arroyo del Gato. Los resultados del análisis exploratorio de los datos utilizando metodologías estadísticas de análisis multivariado indican que existen correlaciones entre los contaminantes, principalmente los metales Cu, Cr y Zn y la toxicidad que se evidenció en la especie prueba en las exposiciones de 10 días a las muestras de sedimento evaluadas.

Los datos de la caracterización química de las muestras de sedimentos, junto a la evaluación simultánea de efectos biológicos en los ambientes estudiados, fueron utilizados para desarrollar un Índice original ecotoxicológico de categorización de peligrosidad (IEPS). Su aplicación a las muestras ambientales estudiadas mostró muy buena correspondencia entre la contaminación química detectada y los efectos registrados en los bioensayos de toxicidad. Dicho índice permitió categorizar sitios de alta peligrosidad en arroyos, ríos y canales, que atraviesan sectores urbanos o industriales, advirtiendo sobre la urgente necesidad de introducir estrategias para su remediación y control. La prueba de toxicidad con *H. curvispina* es propuesta como una herramienta estratégica para la generación de información ecotoxicológica de base para el diseño de criterios y modelos de protección, en forma complementaria a los análisis químicos de las muestras.

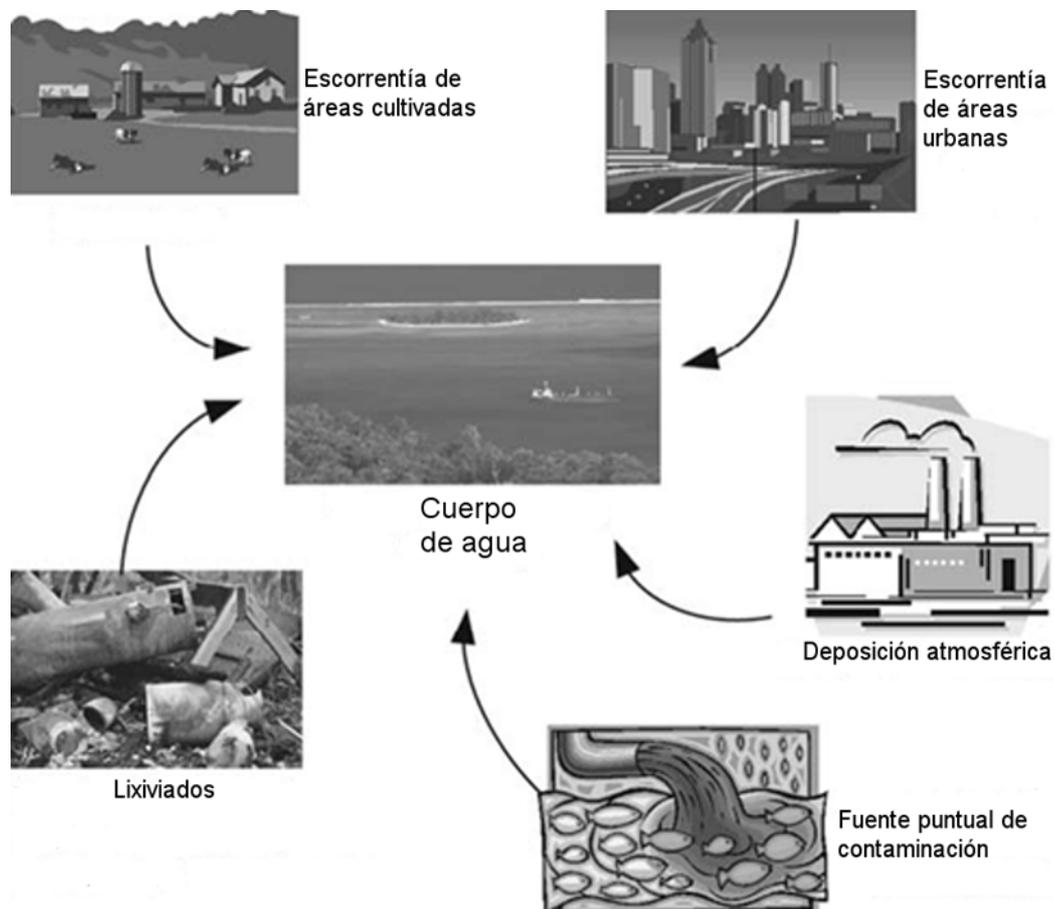
# CAPÍTULO I

## Introducción general

### I.1 Importancia de los sedimentos en ambientes acuáticos

La actividad humana genera grandes cantidades de desechos tóxicos que son liberados al ambiente, ingresando a los diferentes compartimentos de los ecosistemas, ya sea aire, agua, suelo o biota, dependiendo su destino de las propiedades fisicoquímicas, movilidad y persistencia de los compuestos que la integran (Shaw & Chadwich, 1998). Los cuerpos de agua reciben directa o indirectamente descargas de contaminantes como consecuencia de las diferentes actividades antrópicas que tienen lugar en las cercanías de los mismos (Figura I.1).

Cuando los desechos tóxicos son vertidos a un cuerpo de agua, dichos compuestos se particionan entre la fase acuosa y la fase particulada, siendo éstas formadoras de sedimentos a lo largo del tiempo (Rand *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 2006). De esta manera los sedimentos se comportan como aceptores finales de contaminantes pudiendo actuar como fuentes secundarias de contaminación (Burton, 2002). Los contaminantes asociados a los sedimentos pueden ser resuspendidos de forma natural, por procesos físicos o biológicos (bioturbación), o por la actividad humana, tal como frecuentemente ocurre en la actividad de dragado (USEPA, 1998; Sprovieri *et al.*, 2007). Estos mecanismos generan la removilización y redistribución de los contaminantes a la columna de agua desde los sedimentos (Walker *et al.*, 2006; Hill, 2010).



**Figura I.1: Esquema general de las fuentes de contaminación sobre los ambientes acuáticos**

En los ambientes acuáticos el material particulado transporta los compuestos químicos desde la columna de agua hacia los sedimentos de fondo (Mackay, 2001), de esta forma las concentraciones de contaminantes en el sedimento superan a las de la fracción disuelta, tanto para el caso de los metales pesados, como para compuestos orgánicos (Horowitz, 1985; Verrengia Guerrero *et al.*, 1994; Kreimer *et al.*, 1996; Bilos *et al.*, 1998; Mountouris *et al.*, 2002; Verrengia Guerrero *et al.*, 2003; Bartlett *et al.*, 2004). En el caso particular de los metales pesados, las concentraciones en sedimentos pueden ser entre tres a seis órdenes de magnitud a las correspondientes a la columna de agua del sitio (Horowitz, 1986; Bryan & Langston, 1992).

Los sedimentos presentan generalmente una mezcla de materiales en términos de sus características físicas, químicas y biológicas. Están constituidos principalmente por cuatro

componentes. El agua intersticial o agua de poro, la cual llena los espacios entre las partículas sólidas de la matriz, puede ser mayor al 50% en sedimentos superficiales. El componente inorgánico está constituido por los fragmentos de rocas y minerales producto de la erosión de los materiales terrestres. El componente formado por la materia orgánica ocupa una pequeña fracción en la totalidad de la composición, la conforman mezclas de proteínas, carbohidratos, lípidos y sustancias húmicas. Por último, los materiales derivados antropogénicamente incluyen diversos tipos de contaminantes. Como resultado de este último proceso, algunos sedimentos pueden acumular cantidades significativas de materiales peligrosos, lo cual hace que se consideren contaminados. Un sedimento contaminado se puede definir como aquel material acumulado en el fondo de cuerpos de agua conteniendo sustancias químicas en exceso, en relación a criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad, o que pueden tener efectos adversos en el ambiente o en la salud humana (Ingersoll, 1995; Burton, 2002)

## **I.2 Geoquímica de los sedimentos y biodisponibilidad de contaminantes**

La mayoría de los contaminantes orgánicos (HAPs, plaguicidas, PCBs), debido a su naturaleza hidrofóbica, se asocian fuertemente a las partículas del sedimento y a la materia orgánica (Kukkonen & Landrum, 1996), por lo tanto las propiedades de la superficie de las partículas y la proporción de materia orgánica se relacionan con la biodisponibilidad de los mismos (Davies *et al.*, 1999; Haitzer *et al.*, 1999; Verrengia Guerrero *et al.*, 2003; Kukkonen *et al.*, 2003; Rust *et al.*, 2004; Sormunen, 2008).

Por otra parte, existen numerosos estudios sobre los factores que afectan la capacidad de los sedimentos para captar y concentrar compuestos iónicos, principalmente metales y metaloides (As, Zn, Cu, Cd, Hg, Pb, entre otros). Las principales variables que determinan la concentración de metales son el potencial "redox", la granulometría (Horowitz, 1985; Ronco *et al.*, 2001), concentración de coloides (óxidos de Mn, Fe y Al) (Bendell-Young *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2002, Camilion *et al.*, 2003), la concentración de carbono orgánico y sulfuros (Di Toro *et al.*, 1992; Chapman *et al.*, 1998; Besser *et al.*, 2004).

La granulometría del material (tamaño de grano), es un factor importante en la capacidad de retención de los metales. Existe una fuerte correlación positiva entre la disminución del tamaño de grano y la concentración de metales (Horowitz, 1986). Esta correlación se debe tanto a factores físicos como mineralógicos (composicionales). Las partículas de arcillas (< 2-4  $\mu\text{m}$ ) poseen una elevada área específica, determinando reacciones de superficie que

favorecen las interacciones de metales con el sedimento. Como consecuencia los sedimentos de grano fino son importantes sumideros de algunos constituyentes inorgánicos.

Los metales en sedimentos pueden estar complejados como carbonatos o aluminosilicatos, adsorbidos a óxidos de hierro y manganeso, o formando complejos orgánicos. El pH y el potencial "redox" juegan un rol muy importante en las asociaciones de los metales con los óxidos. Por ejemplo, a pHs bajos los metales son desplazados de los óxidos por los iones hidrógeno (Triverdi *et al.*, 2000). Algunos procesos químicos que determinan la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos están controlados directa o indirectamente por el nivel de oxígeno de la matriz. En sedimentos de fondo aeróbicos, la presencia de hidróxidos de hierro, manganeso, aluminio y el carbono orgánico tienden a disminuir la biodisponibilidad de metales (Bendell-Young *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2002, Camilion *et al.*, 2003). Se encontraron correlaciones negativas entre el contenido de carbono orgánico en el sedimento, los efectos tóxicos y la bioacumulación de metales en organismos expuestos. Ello muestra una disminución de la fracción de metal disponible para el ingreso a los organismos (Besser *et al.*, 2003; Gorski *et al.*, 2008).

En sedimentos anóxicos, la biodisponibilidad de algunos metales (cadmio, cromo, níquel, plomo y zinc), estaría regulada por la concentración de sulfuros (Di Toro *et al.*, 1992; Chapman *et al.*, 1998), la presencia de cantidades lo suficientemente elevadas promueven la formación de sulfuros metálicos, de muy baja solubilidad. Consecuentemente, los niveles de metales disueltos en el agua intersticial se mantienen bajos, disminuyendo así su disponibilidad (Di Toro *et al.*, 1990; Berry *et al.*, 1996). De esta manera, el tratamiento de los sedimentos con ácidos débiles permite la formación de sulfuros ácidos volátiles (AVS) y la extracción simultánea de metales (SEM), parámetros utilizados como una medida de biodisponibilidad. Di Toro *et al.* (1992), argumentan que para valores de SEM/AVS menores a 1, los metales precipitan como sulfuros, disminuyendo su potencial tóxico para las especies bentónicas. Sin embargo, este cociente no puede ser utilizado como herramienta general para predecir toxicidad de otros metales, además de los cinco antes mencionados, para los cuales este criterio fue desarrollado (Long *et al.*, 1998). La mayoría de los autores consideran que no se puede utilizar sólo este enfoque para predecir la toxicidad de metales en sedimentos, sin tener en cuenta la complejación de metales con otros componentes de la matriz, como por ejemplo carbono orgánico y óxidos de Fe y Mn (Mahony *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1998; Correia & Costa, 2000; Ogendi *et al.*, 2007; Burton *et al.*, 2007). A su vez, se deben considerar otras rutas de exposición a los metales además de la fase disuelta (agua intersticial). Por ejemplo, Lee *et al.* (2000), estudiando la biodisponibilidad de metales sobre

varias especies observaron que estaría influenciada en mayor medida por la ingesta de la fase particulada.

### **I.3 Biota asociada a los sedimentos**

La flora y fauna asociada a los sedimentos contribuye al funcionamiento de los ecosistemas acuáticos. Los organismos *bentónicos*, por ejemplo, son aquellos asociados al fondo del cuerpo de agua, particularmente los invertebrados bentónicos poseen una riqueza específica y biomasa abundantes y constituyen un eslabón fundamental en las redes tróficas, ya que son los intermediarios entre los productores primarios y detritos y los consumidores superiores. A la contaminación de los sedimentos y el deterioro del ecosistema se le asocian efectos adversos en la biota, en algunos casos evidentes y en otros difíciles de detectar. Por ejemplo, las comunidades de invertebrados bentónicas pueden verse alteradas, disminuyendo y modificando su riqueza específica (incluso desaparecer por completo). Estos cambios pueden alterar ciertas funciones del ecosistema como el flujo de energía, la productividad y los procesos de descomposición (Griffith *et al.*, 2001). En otros casos los efectos son directos como la presencia de algunos contaminantes asociados al sedimento (hidrocarburos, PCBs, mercurio y plaguicidas), en organismos que ocupan el último eslabón en la cadena trófica, mediante mecanismos de bioacumulación y biomagnificación (Adams *et al.*, 1992; Burton *et al.*, 2003; Newman & Clements, 2008).

### **I.4 Estrategias de evaluación de efectos de sedimentos contaminados**

Durante las últimas tres décadas se han utilizado numerosas estrategias orientadas a la evaluación, manejo y remediación de los sedimentos contaminados. La calidad de los mismos es un problema relevante y complejo cuando se deben introducir medidas de protección de los sistemas acuáticos, o proyectar obras de dragado y disposición del refulado para mantener canales de navegación con profundidad adecuada. Estas operaciones suelen asociarse con la incorporación de contaminantes a la columna de agua, aumento de la disponibilidad de los mismos y riesgo asociado (Yong, 1995; USEPA, 1995; INA, 1998; Gomez & Sabell, 2002). Estas evaluaciones son complejas debido a la variabilidad que presentan los sedimentos en cuanto a sus características físicas, químicas, geoquímicas y biológicas, las cuales fueron descritas en párrafos anteriores. A su vez, no se cuenta con una metodología consistente y unificada para la evaluación y el manejo adecuado de los sedimentos.

La calidad de los sedimentos se ha determinado históricamente a partir de mediciones de la concentración total de los compuestos individuales y comparados con valores de base o de referencia. Sin embargo, la cuantificación de los contaminantes por si 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. Este es un concepto muy importante en Ecotoxicología, ya que los tóxicos que no se encuentran biodisponibles, no se encuentran libres para ser incorporados por los organismos y por tanto no causar efectos adversos sobre los mismos (Newman & Unger, 2003).

Para determinar que un cuerpo de agua está contaminado se realizan evaluaciones de riesgo ecológico. Para las evaluaciones de los sedimentos se han generado y aplicado metodologías que incluyen la medición de contaminación en la matriz, la evaluación de efectos biológicos con bioensayos de toxicidad (en laboratorio o *in situ*), el empleo de biomarcadores, la medición de residuos de contaminantes en tejidos de organismos y la utilización de índices biológicos sobre las comunidades bentónicas. En general, se han desarrollado diferentes enfoques para poder evaluar el grado en que los compuestos químicos asociados a los sedimentos pueden causar efectos adversos sobre la biota acuática. La forma más difundida de evaluación es la comparación con niveles guías de calidad.

La necesidad de contar con reglamentaciones que asistan la gestión de control ambiental, se han ido generando valores numéricos de concentraciones de referencia para la evaluación de la peligrosidad de sedimentos. Por tal motivo diferentes agencias y países han desarrollado y propuesto *niveles guía de calidad de sedimentos* (NGCS) (incluyendo criterios, objetivos y/o estándares de calidad). Cuando se derivan niveles guía, se trabaja sobre los supuestos de que dichos valores pueden ser utilizados como medidas directas de los efectos potenciales de la contaminación en sedimentos sobre los organismos bentónicos. Estos valores han tenido numerosas aplicaciones, incluyendo diseños de programas de monitoreo, interpretación de datos históricos, evaluación de las necesidades de estudios detallados de calidad de sedimentos, estudio de la calidad de materiales a dragar, evaluaciones de riesgo ecológico y remediación entre otras (MacDonald *et al.*, 2000). Los países que han desarrollado NGCS han considerado las siguientes estrategias de derivación de valores:

- Empírica y estadística, derivados de bases de datos conteniendo información toxicológica y concentración de contaminantes asociados con sitios de estudio específicos (Smith *et al.*, 1996; Long & Morgan, 1991; CCME, 1999).
- Teórica o mecanística, teniendo en cuenta la biodisponibilidad a partir de equilibrios de partición (Di Toro *et al.*, 1991; USEPA, 2005).
- Consenso, agrupando niveles derivados por diferentes metodologías y generando un valor nuevo (MacDonald *et al.*, 2000).

A partir de estos enfoques se han desarrollado diversos niveles de referencia, algunos de los cuales se resumen en la tabla I.1.

**Tabla I.1. Criterios de calidad de sedimentos**

Documento		Criterio	Método de derivación
<b>Holanda</b>	Estándares de calidad de sedimentos IADC/CEDA, 1997	<b>VR</b> Valor de referencia <b>MPC<sub>sed</sub></b> Concentración máxima permitida <b>VI</b> Valor de intervención	VR= MPC <sub>sed</sub> /100 MPC <sub>sed</sub> , enfoque <u>teórico</u> , determinado por normalización a carbono orgánico
<b>Canadá</b>	Canadian Council of Ministers of the environment CEQG, 2002	<b>ISQG</b> Guía interina de calidad de sedimentos <b>PEL</b> Nivel de efecto probable	Enfoque <u>estadístico</u> , derivado utilizando datos de bases efectos biológicos para sedimentos
<b>EEUU</b>	Long & Morgan, 1991	<b>ERL</b> rango bajo de efecto <b>ERM</b> rango medio de efecto	Enfoque <u>estadístico</u> , derivado utilizando datos de bases efectos biológicos para sedimentos
<b>EEUU</b>	MacDonald, 2000	<b>TEC</b> Umbral de efecto probable <b>PEC</b> Concentración de efecto probable	A partir de <u>medias geométricas</u> de valores derivados por diferentes métodos.
<b>Australia N. Zelanda</b>	ANZECC/ARMCANZ 2000	<b>Niveles guía interinos de Australia y N. Zelanda</b>	Enfoque <u>estadístico</u> , derivado utilizando datos de bases efectos biológicos para sedimentos

Los NGCS proveen una base para la interpretación de los datos químicos del sedimento total, a partir de las concentraciones individuales de contaminantes que pueden causar efectos adversos sobre los organismos bentónicos. Si bien estos niveles pueden ser muy útiles para determinar si la concentración de determinado compuesto excede el umbral de toxicidad aguda o crónica, los sedimentos suelen estar contaminados con mezclas de contaminantes. Una de las desventajas de la utilización de niveles de referencia es que no

se tiene en cuenta la biodisponibilidad (Janssen *et al.*, 2003). Se plantean una serie de incertidumbres a la hora de utilizar estos valores en las evaluaciones ambientales, en general asociadas a la capacidad que tienen los mismos para predecir presencia o ausencia de toxicidad, o establecer relaciones causa-efecto (Chapman *et al.*, 1999; Long, 2000; Hesie, 2009). Por tal motivo, se necesitan otras herramientas para incorporar los riesgos para los organismos bentónicos asociados a la exposición a sedimentos contaminados. Un ejemplo es, precisamente, el empleo de información ecotoxicológica (Burton, 2002; Heise, 2009).

Si bien existen numerosos antecedentes de contaminación en sedimentos de cuerpos de agua tanto marinos, estuariales y de agua dulce para nuestro país (Colombo *et al.*, 1990; Kreimer *et al.*, 1996; CEMR, 1999; Ronco *et al.*, 2001; Gomez & Sabell, 2002; Marcovecchio, 2004; Carsen *et al.*, 2005; Colombo *et al.*, 2006) y para ambientes contaminados en Brasil (DeValls & Chapman, 1998; Cesar *et al.*, 2006), Chile (Rudolph *et al.*, 2002; Ahumada *et al.*, 2008; Aguirre-Martinez *et al.*, 2009) y Uruguay (Muniz *et al.*, 2004), no se han desarrollado estándares de calidad de sedimentos en la región (Nascimento, 2007). En nuestro país se han realizado algunos estudios preliminares con el objetivo de generar niveles guía de calidad, además de desarrollar herramientas de diagnóstico para la evaluación de sedimentos contaminados (INA, 1998; Ronco *et al.*, 2005). Un ejemplo de ello es el proyecto común entre Argentina y Uruguay, orientado a generar pautas comunes de evaluación de riesgo asociado a la disposición de los sedimentos de dragado (FREPLATA, 2002). Para el caso particular de la franja costera del Río de la Plata se han realizado evaluaciones de riesgo (Ronco *et al.*, 1993; Ronco *et al.*, 1995; Kreimer *et al.*, 1996; AGOBSA-SHN, 1997; INA 1999), que dan cuenta de la importancia de seguir desarrollando estudios para poder crear políticas de manejo sustentable.

Una forma de realizar evaluaciones de sedimentos ampliamente difundida es la Triada de Calidad de Sedimentos (sigla en inglés SQT) (Burton, 2002). Dicha metodología fue aplicada por primera vez en Puget Sound (EEUU de Norteamérica) por Long & Chapman (1985) y luego fue muy utilizada en numerosas evaluaciones de ambientes marinos y de agua dulce de Norte América (Hunt *et al.*, 2001; Chapman *et al.*, 2002; Grapentine *et al.*, 2002a), Europa (DeValls & Chapman, 1998; Hollert *et al.*, 2002; Beiras *et al.*, 2003; Lahr *et al.*, 2003; Riba *et al.*, 2004) y Sudamérica, principalmente en Brasil (Abessa *et al.*, 2008; Choueri *et al.*, 2009, Cesar *et al.*, 2009). La tríada de calidad de sedimentos provee diferentes líneas de evidencia que incluyen, contar como mínimo, con la concentración de contaminantes en el sedimento, la toxicidad asociada y la composición de la comunidad bentónica correspondiente al ambiente en particular. También se suelen incluir concentraciones de contaminantes en el

tejido de los organismos para determinar procesos de bioacumulación y biomagnificación (Borgmann *et al.*, 2001).

A su vez, para evaluar la peligrosidad relativa de sedimentos (categorización), se pueden utilizar índices, mediante los cuales se logran unificar resultados de múltiples bioensayos de toxicidad (batería de bioensayos), junto a información fisicoquímica, en un único valor (Bombardier & Bermingham, 1999; Bombardier, 2005; Krebs, 2005)

Por tanto, el grado de contaminación de un sitio en particular se evalúa generalmente comparando los niveles de contaminantes medidos, la descripción de las comunidades bentónicas, y bioensayos de toxicidad en campo (*in situ*) o en condiciones de laboratorio, comparando sedimentos del sitio a ser evaluado con los provenientes de sectores no contaminados del área, cuando esto es posible. Los diferentes sedimentos utilizados en las comparaciones se denominan *prueba*, *control* y de *referencia*. Se considera un *sedimento prueba* al sedimento cuya calidad quiere ser evaluada, o sedimento problema. 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. Un *sedimento de referencia* también se puede obtener de un sitio que presente un nivel bajo o moderado de contaminantes, los cuales representan los niveles de base de contaminación en el área de estudio (Lee *et al.*, 1989; USEPA, 1992). Este debe ser lo más parecido posible en sus características fisicoquímicas al sedimento prueba (USEPA, 1992).

#### **I.4.1 Ensayos de toxicidad**

Dentro de las ciencias ambientales la Ecotoxicología contempla el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes sobre especies representativas de los ecosistemas acuáticos, mediante la realización de ensayos de toxicidad tanto en laboratorio como ensayos en el campo (*in situ*). Los mismos son útiles como indicadores de las relaciones entre el efecto y la exposición a los tóxicos bajo condiciones definidas, controladas y reproducibles (Adams, 2003). En este sentido son considerados una importante herramienta de diagnóstico para el estudio del impacto de diferentes contaminantes sobre la biota (Blaise, 2000; Burton & Landrum, 2003). A partir de la realización de ensayos de toxicidad en laboratorio se puede examinar la toxicidad potencial de una matriz contaminada, por exposición aguda o crónica, de los que se pueden obtener, por ejemplo,

medidas de mortalidad, inhibición del crecimiento y efectos en la reproducción de los organismos.

El objetivo principal de la utilización de *ensayos de toxicidad con sedimentos* es poder determinar su peligrosidad sobre la fauna bentónica asociada. Dichos ensayos se pueden llevar a cabo para determinar:

- la relación entre los efectos tóxicos y la biodisponibilidad
- las interacciones entre los contaminantes presentes en el sedimento
- la distribución espacio-temporal de contaminación
- la peligrosidad de materiales provenientes de dragado
- la efectividad de manejo y remediación de ambientes deteriorados

Existen metodologías estandarizadas recomendadas por ciertos Organismos internacionales como Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (*U.S. Environmental Protection Agency - US EPA*), la Agencia Ambiental Canadiense (*Environmental Canada - EC*), la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (*Organization for Economic Cooperation and Development -OECD*), junto a organismos de estandarización y racionalización como *American Society for Testing and Materials* (ASTM), además en nuestro país se encuentra disponible la norma Argentina IRAM, para llevar a cabo ensayos de toxicidad (OECD, 1993; ASTM, 1997; US. EPA, 1994, 1998, 2000, 2001; EC, 1997, 1999; IRAM, 2003). Estos procedimientos también proporcionan recomendaciones para la toma, manipulación y conservación de muestras y selección de tóxicos de referencia para ser utilizados en los ensayos de toxicidad.

Los ensayos de toxicidad en laboratorio para evaluar efectos de contaminantes asociados a los sedimentos utilizan diferentes organismos que incluyen algas, bacterias, moluscos, anélidos, insectos, crustáceos y peces (Giesy & Hoke, 1989; Ingersoll, 1995). Para la evaluación de contaminación se pueden utilizar cuatro fases del sedimento, que reflejan diferentes condiciones de exposición a los tóxicos en las pruebas de toxicidad. Los bioensayos sobre agua de poro (agua intersticial) proveen información sobre la toxicidad de las sustancias disueltas en la fase acuosa (Ingersoll, 1995). Los eluriados/elutriados de sedimentos pueden dar información sobre los efectos tóxicos potenciales de los contaminantes sorbidos a las partículas de sedimentos (Burton & MacPherson, 1995). Los bioensayos con sedimento completo proveen una metodología que permite evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes para los organismos bentónicos (Landrum & Robbins, 1990; Riba *et al.*, 2004). Por último la exposición de los organismos a extractos

orgánicos a partir del sedimento, constituyen el peor escenario de exposición, ya que hacen más biodisponibles a compuestos lipofílicos (True & Heyward, 1990).

La elección del nivel biótico y el tipo de ensayo de toxicidad (fase del sedimento empleada), se basa principalmente en los objetivos de estudio y en variables referidas a la factibilidad en la realización de los ensayos (costos, practicidad, etc.). Esto influye en la elección de ensayos empleando solo un nivel biótico. La mayor cantidad de trabajos relacionados con la evaluación de sedimentos de muestras ambientales se realizan con especies pertenecientes a un nivel biótico, lo contrario a lo que ocurre en ensayos aplicados a las evaluaciones del medio líquido (Blaise & Féraud, 2005). A su vez todas las fases del sedimento deberían ser evaluadas con una batería de ensayos para tener un mejor conocimiento de la toxicidad total del sedimento. Sin embargo se suelen seleccionar no más de dos fases, de acuerdo con la capacidad de cada laboratorio para la realización de los ensayos. Los organismos más utilizados corresponden a invertebrados bentónicos (ver tabla I.2), esto se relaciona con el hecho de que la fase más empleada para conducir ensayos de toxicidad sea el sedimento completo (Nebeker *et al.*, 1984; Munawar *et al.*, 1999; Bettinetti *et al.*, 2003; Giusto & Ferrari, 2008; Hintzen *et al.*, 2009)

**Tabla I.2: Frecuencias de utilización de los diferentes niveles bióticos en los bioensayos de toxicidad en evaluaciones de sedimentos (tomado de Blaise & Féraud, 2005)**

Ensayos de toxicidad con:	Número y Frecuencia (%)
Algas	16/222 (7,2)
Bacterias	53/222 (23,9)
Invertebrados	136/222 (61,3)
Peces	9/222 (4,1)
Plantas acuáticas	2/222 (<1)
Protozoos	1/222 (<1)
Semillas	5/222 (2,3)

Dentro de los invertebrados, los organismos de agua dulce más utilizados en las evaluaciones de la toxicidad de sedimentos incluyen las siguientes especies bentónicas y de la columna de agua: *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, *C. riparius*, *Hexagenia limbata* y *Tubifex tubifex*. Para dichas especies se encuentran disponibles protocolos estandarizados por diferentes organismos internacionales, los cuales fueron mencionados anteriormente. En nuestro país, debido a la ausencia de planes de gestión y de protocolos nacionales para la realización de bioensayos

de toxicidad, las evaluaciones de ambientes contaminados se realizan con criterios poco unificados en lo referido al tipo de matriz utilizada, puntos finales de evaluación y principalmente no se han desarrollado metodologías validadas que contemplen la utilización de especies nativas en dichas evaluaciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a emplear el anfípodo de distribución Sudamericana *H. curvispina* como organismo prueba en algunas evaluaciones ecotoxicológicas, principalmente en ensayos *in situ* para determinar efectos producidos por plaguicidas en áreas de cultivos (Jergentz *et al.*, 2004; Venturino *et al.*, 2007; Anguiano *et al.*, 2008; Mugni, 2009). A su vez se ha utilizado en bioensayos de laboratorio tanto para evaluaciones de sensibilidad a tóxicos (Di Marzio *et al.*, 1994; García *et al.*, 2010) como en evaluaciones de muestras ambientales (Di Marzio *et al.*, 2005; Giusto & Ferrari, 2008)

Otra estrategia que se puede utilizar para el estudio de efectos biológicos en el ambiente son los ensayos de toxicidad *in situ*, con organismos de campo o laboratorio en dispositivos con encierro (jaulas, tubos, etc), emplazados en los sitios de estudio. Los ensayos de toxicidad *in situ* no cuentan con una metodología estandarizada (Burton *et al.*, 2005), sin embargo poseen la ventaja de reducir las interferencias asociadas al muestreo y manipulación en laboratorio de las muestras de sedimentos y de esta forma reducir la incertidumbre asociada con las extrapolaciones de los resultados de laboratorio, en relación a lo que ocurre en el campo (Chappie & Burton, 2000; Burton *et al.*, 2005). En tal sentido, hay autores que observaron sensibilidades iguales o mayores en ensayos de laboratorio comparados con sensibilidades *in situ* (DeWitt *et al.*, 1999; Hose *et al.*, 2006). Esta metodología es utilizada en ambientes donde el cuerpo de agua recibe escorrentías con posibles pulsos de contaminantes, por ejemplo aplicaciones de agroquímicos en cultivos (Matthiessen *et al.*, 1995; Schulz, 2003; Jergentz *et al.*, 2004, 2005). Estos eventos serían muy difíciles de reproducir en laboratorio y extrapolar los resultados al campo.

Hay autores que sugieren que el estudio de la estructura de las comunidades bentónicas posee mayor sensibilidad a la contaminación que los bioensayos en laboratorio durante un tiempo corto de exposición (Hyland *et al.*, 2003; Wenning, 2004). Sin embargo, la estructura y función de una comunidad bentónica puede estar alterada por numerosos factores naturales además de la contaminación específica del sedimento (por ejemplo: granulometría del material, cambios físicos en el agua, recursos limitados o interacciones biológicas y efectos de erosión). Ambos tipos de factores pueden actuar en conjunto generando los cambios observados en las comunidades bentónicas de sitios contaminados.

Cada una de las metodologías utilizadas en la evaluación de efectos biológicos asociados a la contaminación de sedimentos presentan sus ventajas y limitaciones. De acuerdo al objetivo particular en cada tipo de estudio se recomienda la utilización de alguno de ellos. Como se mencionó anteriormente cuando se requiere una evaluación integral de los riesgos que presenta la contaminación de sedimentos en un área determinada, o la categorización de peligrosidad de los mismos, se recomienda la integración de las evaluaciones ecotoxicológicas y de las comunidades bentónicas, además de la caracterización química de las matrices a evaluar (Losso *et al.*, 2004; Abessa *et al.*, 2008; McPherson *et al.*, 2008).

### **I.5 Antecedentes de contaminación en sedimentos**

De acuerdo a las diferentes fuentes de contaminación, los cuerpos de agua reciben cargas contaminantes de diversas clases, tanto compuestos orgánicos como inorgánicos, y cada uno con diferentes características físico-químicas. A su vez, la forma y el destino de cada tipo de contaminante va a depender de las características del ambiente receptor, y como se mencionó anteriormente los sedimentos son el destino final para la mayoría de estos compuestos, esto hace que los estudios y evaluaciones de riesgos asociados a esta fase sean muy complejos y difíciles de abordar.

Los contaminantes orgánicos incluyen los insecticidas y herbicidas, y los productos y desechos de procesos industriales. Algunos son de origen natural y otros son moléculas sintéticas que no se encuentran en la naturaleza. Estos compuestos poseen un amplio rango de propiedades físico-químicas y de persistencia en el ambiente. Se pueden nombrar una gran cantidad de compuestos que son liberados al ambiente, y se generan nuevos productos continuamente. Dentro de los contaminantes que se encuentran habitualmente y los más estudiados se pueden nombrar los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorados (PCBs) y polibromados, pesticidas organoclorados, dioxinas, dibenzofuranos, insecticidas organofosforados (clorpirifos, metilparatión, diazinon entre otros) y piretroides y herbicidas aromáticos (paraquat, atrazina).

Por otro lado, los metales son elementos que se encuentran presentes en la naturaleza, estos se consideran contaminantes cuando las concentraciones superan los valores naturales a causa de las actividades antrópicas. Los metales pueden ingresar a la atmósfera, al agua y a los ambientes terrestres en los desechos de industrias de manufacturas, minería, productos de combustión y agroquímicos. Las industrias de manufactura química (clor-alcali, ácidos inorgánicos, pigmentos, sulfato de cobre) son

fuentes potenciales de contaminación por metales en ambientes acuáticos (Manahan, 2000). Las combustiones de petróleo, incineraciones de desechos, manufacturas de acero y hierro, por ejemplo, generan contaminación atmosférica, los metales pueden ser transportados en la fase gaseosa o sorbidos a las partículas y así ingresar a los ambientes acuáticos o terrestres por deposición.

Existen numerosos estudios que demuestran la contaminación en sedimentos de sistemas de agua dulce producto de las actividades mineras (Moore & Luoma, 1990; Lacerda, 1997; Artaxo *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002; Shuhaimi-Othman, 2008). La actividad minera es un ejemplo claro de contaminación, principalmente por metales pesados. Los metales que se encuentran en los desechos (arsénico, cadmio, cobre, plomo, zinc y plata) ingresan a los arroyos y ríos como solutos y particulado, y contaminan sedimentos del río aguas abajo de la zona de producción minera (Moore & Luoma, 1990). Por ejemplo, las extracciones de oro, al utilizar mercurio y cianuro como métodos de separación, han producido contaminación en sistemas de agua dulce. El Río Amazonas es una de las regiones más estudiadas en relación a la contaminación por mercurio producto de dicha actividad (Lacerda, 1997; Artaxo *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002).

Los sedimentos contaminados son un problema ambiental serio en numerosos puertos, bahías, estuarios y ríos de todo el mundo. Por ejemplo en sitios urbanos, la calidad de los sedimentos puede impactar sobre los recursos pesqueros locales, las actividades recreacionales y en el deterioro del ambiente, lo cual genera problemas tales como riesgos ecológicos y para la salud humana, y restricciones en la disposición de materiales de dragado entre otros (USEPA, 1998; Hesie, 2009).

En el hemisferio Norte, desde hace tres décadas, se ha comenzado a prestar atención a la contaminación presente en los sedimentos de fondo. Los ambientes estuariales suelen ser sitios de interés ya que reciben descargas de contaminantes de diversas fuentes que se acumulan en los sedimentos (Huh *et al.*, 1992). La bibliografía es extensa en relación al estudio de la contaminación de sedimentos en estuarios de todo el mundo (Gomez-Parra *et al.*, 2000; O'Day *et al.*, 2000; Mirlean *et al.*, 2001; Spencer *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 2006; De Marco *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2008).

A fines de los '80 se creó una Comisión Internacional para declarar "áreas de interés" en la región de los Grandes Lagos Laurentian en EEUU de Norteamérica y Canadá, ya que considera el ambiente como severamente degradado. En los últimos años esta Comisión declaró a los sedimentos contaminados como la mayor fuente de contaminantes en la

cadena trófica de los Grandes Lagos; a su vez esta problemática fue identificada como el mayor impedimento para la remediación de las “áreas de interés”. Por otra parte en Europa se formó la European Sediment Research Network (SedNet, 2002) para el desarrollo de niveles guía para el manejo de sedimentos fluviales, basado en estudios multidisciplinarios y coordinados entre 21 países europeos.

Las zonas de puertos, las cuales generalmente están ubicadas en la desembocadura de grandes ríos en zonas urbanas, suelen ser ambientes con un elevado grado de deterioro ambiental tanto de sus aguas como sedimentos. Esto se debe generalmente a los problemas históricos de contaminación en cuerpos de agua afluentes y que finaliza en última instancia en la desembocadura, sumándose además la contaminación propia de las actividades portuarias. Los riesgos ecológicos asociados a dicha contaminación suelen ser importantes si se considera que los sedimentos de fondo son removidos continuamente mediante dragados para mantener libres canales de navegación. Un ejemplo claro de esta problemática en nuestro país lo constituye el Río de la Plata, el cual recibe a lo largo de la Franja Costera Sur aportes contaminantes del río Luján y Riachuelo en la zona norte y el río Santiago en la zona sur, además de numerosos arroyos y canales. También recibe aportes de efluentes cloacales domésticos, industriales y de escorrentías de áreas cultivadas, ya sea en forma directa o a través de ríos, arroyos y canales, a partir de los cuales ingresa una heterogénea carga de contaminantes, desde metales pesados hasta compuestos orgánicos como hidrocarburos y plaguicidas principalmente (Colombo *et al.*, 1990; Ronco *et al.*, 1993; Verrengia Guerrero *et al.*, 1994; AGOBSA-SHN, 1997; Ronco, 1997; Villar *et al.*, 1999, 2002; Colombo *et al.*, 2006; Salibián, 2006). A su vez recibe una importante carga de contaminantes aportada por las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (SMAyDS, 2006), así como la correspondiente al área metropolitana de Montevideo en la costa uruguaya (Muniz *et al.*, 2004; Carsen *et al.*, 2005)

Frecuentemente se genera una controversia en la toma de decisiones sobre el destino de materiales contaminados asociado a su remoción por diversos tipos de obras, tales como el mantenimiento del calado de canales de navegación, mantenimiento de puertos, saneamiento de arroyos y ríos, etc. En los sistemas lóticos pampeanos comúnmente se realizan canalizaciones y dragado de los cursos de agua para evitar inundaciones sin ningún tipo de planificación ni asesoramiento previo a las obras de ingeniería. En el caso particular de la franja costera sur del Río de la Plata se han realizado diversos estudios que indican la presencia de sedimentos de fondo altamente contaminados en varios sectores de la región (Ronco *et al.*, 1993; Ronco *et al.*, 1995; Kreimer *et al.*, 1996; AGOBSA-SHN, 1997; INA, 1999; Ronco *et al.*, 2001; Camillion *et al.*, 2003; Carsen *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el

momento, las autoridades correspondientes, no cuentan con una herramienta estandarizada e intercalibrada que les permita evaluar la ecotoxicidad de los sedimentos en su conjunto a nivel regional.

## CAPÍTULO II

### Hipótesis y Objetivos

#### II.1 Hipótesis general de trabajo

La peligrosidad asociada a compuestos tóxicos presentes en la fracción disuelta y/o particulada de sedimentos de fondo de cuerpos de agua superficiales contaminados, puede ser evaluada por medio de una estrategia integrada, química-ecotoxicológica, estudiando efectos letales y subletales sobre *Hyaella curvispina* por medio de un bioensayo de toxicidad en condiciones estandarizadas de laboratorio.

##### II.1.1 Hipótesis específicas

1. La especie de anfípodo nativa *Hyaella curvispina* es apta para su utilización en evaluaciones de contaminación asociada a sedimentos naturales.
2. Los efectos letales y subletales del mercurio en ensayos de laboratorio sobre el anfípodo *H. curvispina* son menores en sedimentos con contenidos elevados de materia orgánica.

#### II.2 Objetivos Generales

1. Generar información necesaria y puesta a punto de bioensayos de toxicidad con sedimento total empleando la especie autóctona *Hyaella curvispina*.

2. Utilizar estos ensayos para evaluar efectos biológicos de contaminantes asociados a fracción disuelta y particulada en sedimentos provenientes del Río de la Plata y afluentes de la Planicie Costera Sur.

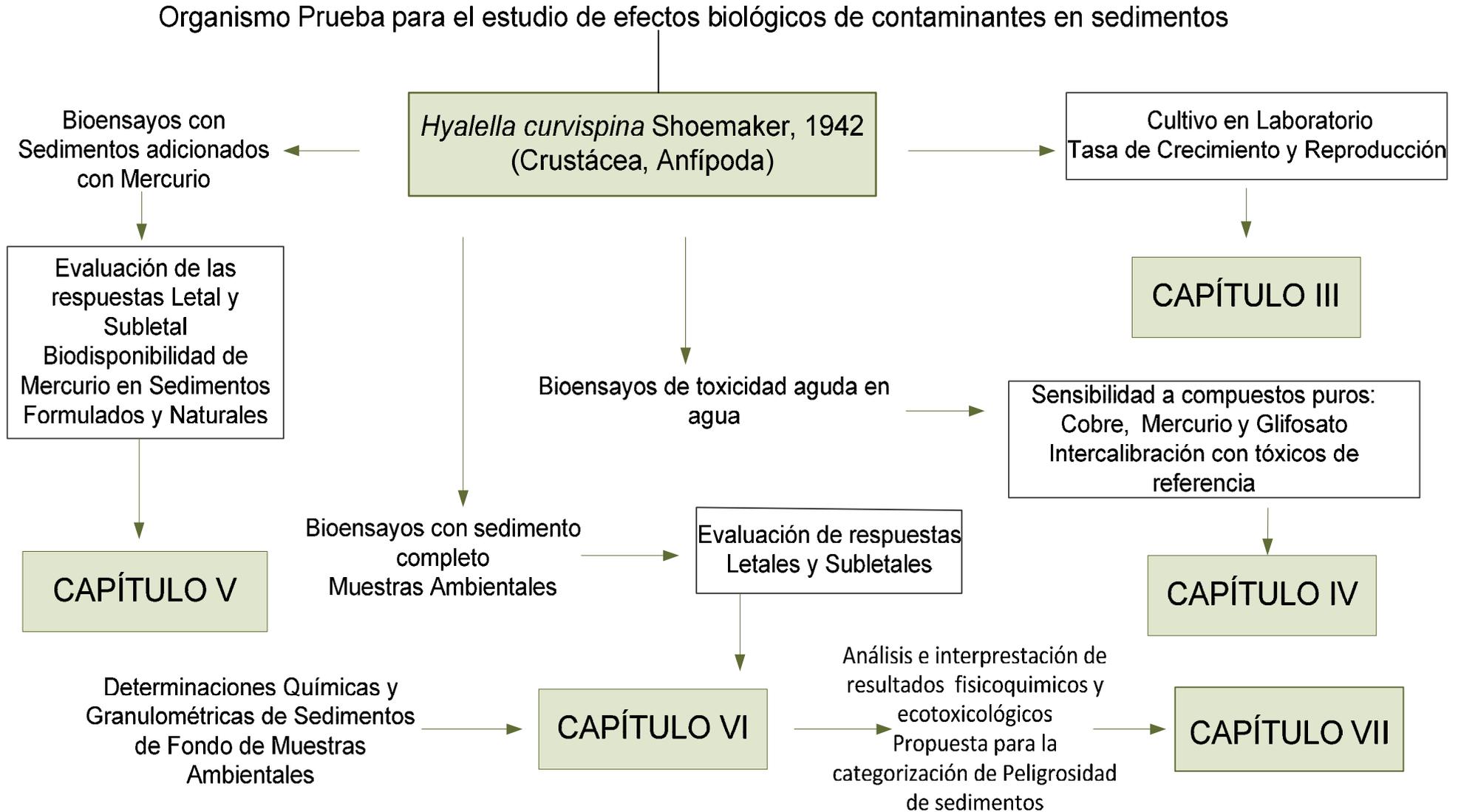
### II.2.1 Objetivos particulares

- I. Generar una metodología de cultivo de *H. curvispina* en condiciones estandarizadas de laboratorio como fuente de organismos para la realización de bioensayos de toxicidad.
- II. Determinar la supervivencia, tasa de crecimiento y reproducción de la especie prueba en condiciones de laboratorio como puntos finales de evaluación en bioensayos de toxicidad.
- III. Analizar la variabilidad en las respuestas biológicas de *H. curvispina* por exposición a tóxicos, utilizando bioensayos de toxicidad agudos en matriz acuosa con tóxicos de referencia.
- IV. Estudiar la toxicidad y biodisponibilidad del mercurio en bioensayos de toxicidad en matriz acuosa y con sedimento completo en función de variables químicas y físicas de las muestras.
- V. Aplicar el ensayo de toxicidad con *H. curvispina* para el estudio de efectos biológicos (letales y subletales) de sedimentos contaminados representativos de ambientes acuáticos de la región pampeana. Correlacionar efectos con el contenido de compuestos tóxicos contaminantes.
- VI. Proponer un esquema de evaluación de la peligrosidad de sedimentos con potencial aplicación en la identificación de sitios contaminados que pudieran requerir intervención y manejo en programas de gestión.

### II.3 Estrategia y diseño experimental empleado en el estudio

Para contrastar las hipótesis planteadas y cumplir con los objetivos propuestos en esta tesis, se llevaron a cabo una serie de estudios de acuerdo al siguiente esquema general de trabajo:

### Esquema-resumen general de la Tesis



## CAPÍTULO III

### **Descripción de *Hyalella curvispina* como organismo prueba para el estudio de efectos biológicos de contaminantes en sedimentos. Condiciones de cría y mantenimiento, estudio de parámetros poblacionales.**

#### **III.1 Introducción**

El uso de ensayos de toxicidad como herramienta bioanalítica se restringe a un número reducido de especies, para los cuales se han desarrollado protocolos de laboratorio estandarizados por organismos internacionales, tales como USEPA, ASTM, OECD, EC, entre otros. Estos protocolos son muy utilizados, generando numerosas publicaciones, lo cual ha permitido establecer niveles de sensibilidad de las especies ensayadas. Si bien algunas de las especies protocolizadas poseen amplia distribución, existen escasos métodos estandarizados para especies neotropicales. Es importante destacar la relevancia de realizar monitoreos ecotoxicológicos utilizando especies autóctonas como herramienta diagnóstica, al momento de evaluar el impacto de sustancias sobre ecosistemas acuáticos de nuestra región.

#### **III.1.2 Especies utilizadas en ensayos de toxicidad estandarizados**

Los ensayos de toxicidad y bioacumulación para la evaluación de la calidad de sedimentos más difundidos se realizan con sedimento completo (sin separación de fase sólida, agua de poro o extractos acuosos u orgánicos), utilizando diferentes especies de Crustáceos (anfípodos y cladóceros), Insectos (dípteros) y Anélidos (poliquetos y oligoquetos) (Ingersoll, 1995). Dentro de los Crustáceos, los anfípodos son ampliamente utilizados en ensayos de toxicidad en laboratorio con sedimentos de ambientes marinos y de agua dulce (Ingersoll *et al.*, 1995; Burton *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1998; Bat & Raffaelli, 1998; USEPA, 2000; Correia *et al.*, 2002; Neupharth *et al.*, 2005). En estudios de contaminación de sedimentos marinos las especies de anfípodos estandarizadas más comúnmente utilizadas son *Ampelisca abdita* y

*Leptocheirus plumulosus* en América del Norte (USEPA, 1994; Weston, 1996) y *Corophium volutator* y *Gammarus lacusta* en Europa (PARCOM, 1993; Mathiessen *et al.*, 1995; Neuphart *et al.*, 2004). Entre las especies protocolizadas en EEUU y Canadá, para evaluaciones de calidad de sedimentos de cuerpos de agua dulce y estuariales, se encuentra el anfípodo *Hyalella azteca* Saussure, 1858, (Borgmann *et al.*, 1989; Environmental Canada, 1996; Ingersoll *et al.*, 1998; ASTM, 1999; USEPA, 2000; Borgmann *et al.*, 2005a).

*H. azteca* es una especie de anfípodo de agua dulce, distribuido en toda América del Norte (Bousfield, 1979), de hábitos epibentónico y detritívoro (Pennak, 1989); en la naturaleza se lo encuentra asociado al fondo, sobre la superficie de plantas macrófitas o rocas donde se alimenta de algas y bacterias (perifiton). Se lo considera una especie muy sensible a los contaminantes ambientales (Borgmann *et al.*, 1989; Phipps *et al.*, 1995; Milani *et al.*, 2003), además de ser tolerante a un amplio intervalo de concentraciones de oxígeno disuelto, alcalinidad, salinidad (Nebeker *et al.*, 1992; Lasier *et al.*, 1997), junto a características físicas del sedimento como granulometría y contenido de materia orgánica (Suedel & Rodgers, 1994). La cría en laboratorio es simple y posee un período relativamente corto de madurez sexual. Estas características lo convierten en un excelente organismo prueba en ensayos de toxicidad con sedimentos. *H. azteca* se utiliza en ensayos de toxicidad con sedimentos en exposiciones de 10 y 28 días determinando generalmente la supervivencia como punto final. Esta especie también ha sido utilizada en evaluaciones para determinar efectos subletales asociados a sedimentos contaminados, tales como efectos adversos en el crecimiento y la reproducción en ensayos crónicos (Ingersoll *et al.*, 1998). Estos efectos son buenos estimadores de toxicidad, alertando sobre posibles daños ambientales a menores concentraciones de contaminantes, en comparación con la información sobre supervivencia como punto final (Kemble *et al.*, 1994; Kubitz *et al.*, 1996).

### III.1.3 Selección de organismos autóctonos

Cuando se selecciona una especie nativa como organismo prueba diferente a las incluidas en protocolos estandarizados, se deben tener en cuenta una serie de pautas que indiquen una sensibilidad equivalente a las especies recomendadas para el tipo de ensayo en consideración. A este respecto, ASTM (1994) y USEPA (2000) definen algunos criterios a tener en consideración cuando se selecciona una especie prueba para ser utilizada en ensayos con sedimento:

- sensibilidad a sustancias tóxicas asociadas a sedimentos
- relevancia ambiental ,
- tiempos cortos de generación,

- facilidad en el cultivo y mantenimiento en laboratorio,
- si se encuentra en contacto con el sedimento,
- tolerancia a las variaciones fisicoquímicas del medio,
- facilidad de identificación taxonómica,
- importancia ecológica,
- localización geográfica en relación al sitio de estudio
- compatibilidad con la metodología de ensayo y los puntos finales seleccionados

En el presente estudio se implementaron ensayos de toxicidad, con una especie de anfípodo de amplia distribución en ambientes de Sudamérica. Teniendo en cuenta que se trata de una especie nativa, de hábitos similares a la especie protocolizada y por la facilidad en el mantenimiento y supervivencia en condiciones de laboratorio, se propone como organismo prueba el anfípodo *Hyalella curvispina*. En los últimos años, en nuestro país se ha comenzado a utilizar esta especie como organismo prueba, en ensayos de toxicidad tanto en condiciones de laboratorio como en campo (ensayos *in situ*) (Di Marzio *et al.*, 2005; Graca *et al.*, 2002; Argemi *et al.*, 2003; Jergentz *et al.*, 2004, 2005; Anguiano *et al.*, 2005; Venturino *et al.*, 2007; García *et al.*, 2010).

Cuando se realizan bioensayos de toxicidad existen varios factores que modifican el efecto y en consecuencia los resultados obtenidos. Según Sprague (1995), gran parte de la variación ocurrida en los bioensayos de toxicidad aún no ha podido ser explicada y otra parte de esta variación es adjudicada a factores modificadores relacionados con las variaciones en el diseño experimental. En referencia a los factores modificadores que se relacionan directamente con la biología de los organismos se encuentran: las especies utilizadas como organismos de prueba, su estadio de vida y su tamaño, la nutrición, la salud y el proceso de aclimatación a las condiciones de ensayo. En relación al estadio de vida como factor modificante de respuesta, la información disponible sugiere que la sensibilidad de las especies de invertebrados es dependiente del estado de desarrollo, siendo generalmente más sensibles los estados más inmaduros (McCahon *et al.*, 1988; Klein, 2000; Stuijzrand *et al.*, 2000). El estadio de vida y el tamaño fueron considerados en principio para artrópodos acuáticos, relacionados con el tiempo de muda (Buikema & Benfield, 1979). Basado en datos de toxicidad de varios compuestos sobre diferentes estados de vida de invertebrados acuáticos, Hutchinson (1998) muestra que, en más de la mitad de los compuestos estudiados, los estados inmaduros son más sensibles que los adultos. Los resultados obtenidos por Muysen & Jenssen (2007), en estudios sobre *Daphnia magna*, indican sensibilidades iguales o mayores de los estados juveniles comparados con los adultos para zinc y cobre. Collyard *et al.* (1994) observaron que la sensibilidad de *H. azteca* para una serie de contaminantes fue similar en organismos de

hasta 26 días de edad. En ensayos de toxicidad con sedimentos estandarizados con la misma especie se sugiere la utilización de organismos de diferentes edades: 1 a 3 días de edad (USEPA, 1991), entre <1 y 7 días de edad (EC, 1997), o entre 7 y 14 días de edad (EC, 1997; USEPA, 1994), u organismos cuya longitud se encuentre entre 2 y 3 mm (EC, 1997; ASTM, 1991). La metodología propuesta por USEPA 2000 para ensayos de toxicidad con sedimentos a largo plazo sugiere utilizar organismos de 7 a 8 días de edad. Este tipo de información es muy escasa para el caso particular de *H. curvispina*. Recientemente, García *et al.* (2010) observaron que los estados juveniles muestran menor sensibilidad al cadmio que los neonatos, concluyendo que los estados de desarrollo de la especie presentan sensibilidades diferentes al cadmio, siendo los neonatos los más sensibles a dicho metal.

La fuente de organismos para su posterior utilización en ensayos de toxicidad, puede ser a partir de poblaciones naturales o provenientes de cultivos en laboratorio. En este sentido Meister & Van Den Brink (2000) y Kooijman (1987), mencionan la historia de la población de donde se extrajeron los animales como un factor que puede modificar la respuesta en ensayos de toxicidad. Aquí estarían involucrados los aspectos de comportamiento y adaptación al medio según los cambios ocurridos en el tiempo, además de considerar que las variaciones geográficas y genéticas de una población dada, conducirían a diferencias en la sensibilidad a los tóxicos (Bridges *et al.*, 2003). Además, hay que considerar la historia de exposición a contaminantes de la población estudiada, que podría haber sufrido selecciones o impactos en la variabilidad genética (Traunspurger & Drews, 1996).

De lo antedicho se desprende la importancia de realizar ensayos de toxicidad utilizando ejemplares obtenidos preferiblemente de cultivos en condiciones controladas de laboratorio, disminuyendo la variabilidad de respuesta y de esta forma poder realizar comparaciones entre resultados. Sin embargo no se encuentran disponibles metodologías de cultivo en laboratorio para la especie seleccionada como organismo prueba en este trabajo. Uno de los objetivos de este trabajo fue generar una metodología de cultivo de *H. curvispina* en condiciones de laboratorio y determinar la tasa de crecimiento y reproducción en relación a la producción de individuos para su utilización en ensayos de toxicidad.

### III.2 Especie prueba: *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942

La Tabla III.1 resume la información biológica, descripción y distribución geográfica de *H. curvispina*. La Figura III.1 muestra imágenes de ejemplares de la especie.

**Tabla III.1: Descripción de *H. curvispina***

	<i>Descripción</i>
<i>Clase</i>	Crustácea
<i>Orden</i>	Anfípoda
<i>Familia</i>	Dogielinotidae
<i>Biología</i>	se alimentan principalmente de detritos y perifiton asociado al sedimento y plantas macrófitas sumergidas,
<i>Ambiente</i>	organismos asociados al fondo ambientes dulceacuícolas como ríos, arroyos, lagunas y charcas
<i>Distribución</i>	Sudamericana incompleta en el extremo Norte y aparentemente está ausente en regiones selváticas (Grosso & Peralta, 1999)



**Figura III.1: *Hyalella curvispina***

### III.2.1 Ubicación sistemática

El superorden Peracárida, junto con los decápodos, representa a la mayoría de los crustáceos. La característica distintiva de este grupo es el dimorfismo sexual que consiste en la presencia de una bolsa ventral de incubación o *marsupio* en la hembra y un par de gnatopodos alargados en los machos (Wellborn, 2000). Dentro de los órdenes de peracáridos, los anfípodos son los más representativos de los ecosistemas acuáticos y se caracterizan por poseer el cuerpo comprimido lateralmente, con el primer y segundo par de pereiópodos diferenciados en gnatopodos (Martin & Davis, 2001). Los anfípodos son comunes en ecosistemas dulceacuícolas pudiendo representar hasta el 50% de la biomasa de la fauna de macroinvertebrados. Cumplen un papel muy importante en las redes tróficas, ya que facilitan el flujo de energía entre los productores primarios (algas, plantas epífitas), detritos y los consumidores superiores (Moore, 1975; Wen, 1992; Muskó, 1993).

Dentro de los anfípodos los miembros del género *Hyaella* Smith, 1874, poseen distribución Neártica y Neotropical, este género incluye 51 especies descritas hasta el momento (39 de las cuales se encuentran en América del Sur) (Gonzales & Watling, 2002; Gonzales *et al.*, 2006). Se considera a este género como el más representativo de los anfípodos de agua dulce de todo el continente americano (Cavallieri, 1955). En particular la especie *Hyaella curvispina* fue descrita por Shoemaker (1942), con ejemplares típicos de Uruguay. Dicho autor destaca como carácter distintivo la presencia de 1 o 2 espinas curvas en el margen interno del urópodo en hembras, coincidente con lo que se encontró en ejemplares revisados por Grosso & Peralta (1999).

### III.2.2 Biología y distribución

*H. curvispina* es un anfípodo representativo de las comunidades zoobentónicas en América del Sur, desde Punta Arenas, Chile y las Islas Malvinas en el Sur, hasta Cangallo y Río de Janeiro en el Norte. Se lo encuentra asociado a 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).

Existen estudios taxonómicos sobre el género *Hyaella* (Cavallieri, 1959, 1968; Grosso & Peralta, 1999). En particular, los estudios sobre la biología de *H. curvispina* son escasos. García González & Souto (1987) describieron algunos aspectos reproductivos de *H. curvispina*, como el amplexo prolongado durante varios días. A su vez, Casset *et al.* (2001), informaron una fecundidad entre 8 y 15 huevos por hembra. En estudios sobre su biología se

observó una buena correlación entre los parámetros poblacionales de *H. curvispina* y la biomasa de fitobentos, perifiton y plantas macrófitas (Casset *et al.*, 2001; Poretti *et al.*, 2003). Por otra parte, Poretti *et al.* (2003) y Dutra *et al.* (2008), estudiaron la composición bioquímica (lípidos totales, glicógeno y proteínas totales) de *H. curvispina* en relación a la dinámica poblacional en ambientes de Argentina y Brasil, respectivamente. Ambas publicaciones concluyen que el mayor porcentaje de lípidos coincide con el período reproductivo en ambos sexos, el cual corresponde al comienzo de la estación primaveral. Un estudio más reciente (García, 2009), describe algunas características poblacionales de la especie como estructura de edades y fertilidad en ambientes de la Provincia de Buenos Aires.

### **III.3 Obtención y mantenimiento en laboratorio de individuos de *H. curvispina***

#### **III.3.1 Recolección de individuos en campo**

Los ejemplares de *H. curvispina* fueron colectados en dos ambientes acuáticos ubicados en los alrededores de la ciudad de La Plata, Provincia de Buenos Aires. Ambos sitios se encuentran dentro de humedales pertenecientes a la cuenca Parano-Platense que presentan el menor grado de alteración (Gomez & Toresani, 1998), se los considera ambientes prístinos, adecuados como provisión de organismos para su utilización en ensayos de toxicidad en laboratorio.

#### ***Descripción de los ambientes de origen***

El primer sitio está ubicado en la Reserva Ecológica de Punta Lara, de 30 ha, que conserva un ecosistema de ambientes costeros con influencia subtropical. El cuerpo de agua donde se realizó el primer muestreo se sitúa a 34°47'57,49''S; 58°01'53,57''O. Corresponde a charcas semipermanentes, de escasa profundidad. Las mismas presentan vegetación densa principalmente compuesta de lentejas de agua (*Lemna*) y saetas (*Sagitaria*).

El segundo sitio se halla ubicado en la proximidad del Arroyo El Pescado, sito a 35°01'15,58''S; 57°51'21,9''O (Figura III.2). Dicho cuerpo de agua es una charca situada a 90 m del arroyo, con una influencia directa del mismo, ya que en las crecidas, se establecen conexiones entre la charca y el curso permanente, que permiten el intercambio de fauna. Su superficie se encuentra vegetada por juncos (*Schoenoplectus californicus*) y totoras (*Typha latifolia*) y en las zonas de mayor profundidad con vegetación acuática tupida (cola de zorro, lentejas de agua (*Lemna*) y saetas (*Sagitaria*)).



**Figura III.2: Sitio de muestreo de organismos en el Arroyo El Pescado.**

#### ***Obtención de los ejemplares de *H. curvispina****

La colecta se realizó en el mes de septiembre de 2005, época correspondiente a la de mayor biomasa de anfípodos y coincidente con el período reproductivo. Los ejemplares de *H. curvispina* se obtuvieron empleando un copo de mano con red de trama fina (1,5-2 mm de abertura de malla), donde quedaban retenidos los anfípodos junto con la fauna y flora acompañante presentes en el sitio de muestreo. Cada muestra obtenida con el copo se colocó en recipientes plásticos conteniendo agua del mismo sitio para ser trasladados al laboratorio. El volumen de agua obtenido en total fue de 20 L en cada sitio de muestreo.

### **III.3.2 Mantenimiento en laboratorio**

#### ***Separación y aclimatación***

Los organismos recolectados se trasladaron para su cultivo en condiciones de laboratorio. Los recipientes plásticos conteniendo agua, flora y fauna colectadas se dispusieron en bateas con agua limpia (agua de red no clorada) y se procedió a la separación de los ejemplares de anfípodos mediante pipetas plásticas de boca lo suficientemente ancha, para evitar daños en ellos. Los mismos fueron dispuestos en frascos de vidrio (3L), con agua del sitio de origen, la

cual se fue cambiando gradualmente por agua utilizada en los cultivos, para lograr una adecuada aclimatación.

### **Agua de cultivo**

El agua utilizada en la cría de los anfípodos se obtuvo de la red de agua corriente de la zona Este de la Ciudad de La Plata. Con el objetivo de eliminar el cloro, se colocó un volumen en tanques de 100 L, con aireación constante durante un mínimo de 48 horas previo a su utilización como agua de cultivo. Los tanques se instalaron en el laboratorio con temperatura constante, correspondiente a la temperatura de la cámara de cría. La caracterización fisicoquímica del agua fue la siguiente: pH: 7,5; dureza:  $220 \pm 20$  mg  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ; oxígeno disuelto:  $9 \pm 1$  mg  $\cdot \text{L}^{-1}$ ; conductividad:  $1,00 \pm 0,20$  mS  $\cdot \text{cm}^{-1}$ .

### **Mantenimiento en laboratorio**

Los ejemplares fueron separados por tamaños (>4mm, 3-4mm, <3mm, aproximadamente) los cuales corresponden a los tres estadios descritos por Lopretto (1983) para *H. pampeana* (anfipoditos, estado pre-reproductivo y adultos) y dispuestos en frascos de vidrio de 3 L, una vez lograda una adecuada aclimatación en agua de cultivo. Una fracción de los individuos en amplexo se colocó en tanques y piletas plásticas dispuestas a la intemperie, también conteniendo agua de red declorada y plantas acuáticas del género *Lemna* (lentejas de agua), recolectadas en los sitios de muestreo.

Lograda una adecuada aclimatación de los anfípodos colectados en campo, se los cultivó de acuerdo con la metodología sugerida para *H. azteca* por Call *et al.*, 1994:

- se colocaron los anfípodos en frascos de 3 L de capacidad (50 individuos adultos por frasco), conteniendo 2 L de agua y porciones de gasa de algodón en el fondo como sustrato y refugio de los organismos,
- se alimentaron con alimento comercial para peces,
- se ubicaron los recipientes en cámara incubadora con temperatura y fotoperíodo constantes ( $20 \pm 1$  °C; 16L: 8O h), con aireación constante,
- se realizó recambio parcial de agua de cultivo una vez por semana. El contenido de las cámaras de cultivo fue vaciada en un recipiente plástico. Después que los adultos habían sido retirados, los anfípodos restantes tenían una edad entre <1 y 7 días. Los jóvenes se transfirieron con una pipeta en un recipiente de 1 L, con agua de cultivo y alimento.

Esta metodología se mantuvo los primeros meses, durante los cuales se realizaron experimentos para determinar el tipo de alimentación necesaria para un crecimiento y desarrollo óptimos, además de obtener información sobre algunas características de la

reproducción (tiempo de maduración sexual, número de crías por hembra) en condiciones de laboratorio.

### **III.4 Experimentos de alimentación y reproducción de *H. curvispina* en condiciones de laboratorio**

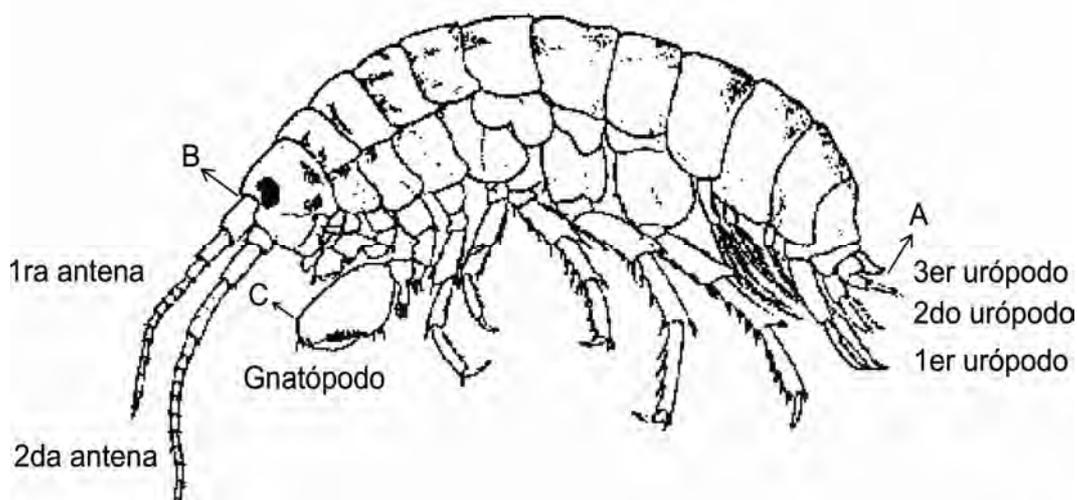
Con el objetivo de utilizar ejemplares de *H. curvispina* provenientes de cultivos en laboratorio en ensayos de toxicidad para la evaluación de contaminación asociada a sedimentos, se realizaron experimentos para obtener información sobre ciertos parámetros de crecimiento y reproducción en condiciones controladas. Dicha información es de gran utilidad cuando se mantiene una especie de organismo prueba en laboratorio, teniendo en cuenta la falta de estandarización en la metodología de cría y mantenimiento de *H. curvispina* para la obtención de cantidades necesarias de ejemplares para su utilización en ensayos de toxicidad. A su vez los datos referidos a la reproducción de esta especie en particular son escasos, siendo indispensables para la correcta interpretación de resultados en ensayos de toxicidad crónica, donde se determinaron los parámetros supervivencia, crecimiento y tasa reproductiva.

#### **III.4.1 Metodología**

Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos, una para obtener información referida al tipo de alimentación en relación al crecimiento y desarrollo de los anfípodos. La segunda se realizó para la obtención de parámetros reproductivos, en la cual se determinó tiempo al cual ocurre el primer amplexo y número de crías por hembra.

**Ensayo de alimentación.** El diseño experimental consistió en exponer anfípodos a cinco tipos de dietas (tratamientos) por triplicado, el mismo se describe en la Figura III.3. Los tipos de dietas fueron: placa de policarbonato con perifiton adherido (1), lechuga (2), lechuga y alimento balanceado comercial para peces (McShullet®) (3), placa con perifiton y alimento balanceado para peces (4) y placa con perifiton y lechuga (5). Las diferentes metodologías estandarizadas para *H. azteca* recomiendan el uso de levadura (YCT) y algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*) como fuente de alimento. En experiencias realizadas previamente en el laboratorio se determinaron valores de pH menores a 6 cuando los anfípodos eran alimentados con levadura, por lo cual este método no se incluyó en los tratamientos utilizados.

Se utilizaron recipientes plásticos de 1 L de capacidad, en cada replicado se colocaron 10 organismos de 1 a 7 días de edad provenientes de cultivos. Cada cinco días se controló el pH y el oxígeno disuelto y se procedió al recambio parcial de medio. A su vez se proporcionó alimento y se registró la supervivencia y el número de amplexos en cada replicado. La duración del ensayo fue de 70 días. Al tiempo final se fijaron los anfípodos en formaldehído (4%) para la obtención de las medidas de longitud. Cada individuo se midió con calibre digital bajo lupa y se registró la medida de la longitud desde la base de las primeras antenas hasta la base del tercer urópodo (Figura III.4). Los datos de crecimiento se analizaron utilizando ANOVA de una vía con la variable longitud transformada a logaritmo, se trabajó con un nivel de significancia de 5%.



**Figura III.4:** (A) denota los urópodos; (B) denota la base de las primeras antenas; (C) denota los gnatópodos usados para tomar las hembras. La medida de la de longitud se hace desde la base del tercer urópodo, de (A) a la base de las primeras antenas (B).

**Ensayo de reproducción.** El ensayo se realizó con individuos de 7 a 10 días de edad (<2 mm de longitud), nacidos en cultivos de laboratorio (metodología de cultivo mencionada en III.3.2). Se utilizaron cinco recipientes plásticos de 1 L de capacidad, en cada uno se dispusieron 10 individuos con 700 ml de agua de cultivo y alimento comercial para peces (McShullet®); a partir del quinto día de ensayo se incorporaron placas recubiertas de perifiton. Los recipientes se mantuvieron sin aireación en la misma cámara incubadora utilizada en los cultivos mencionados anteriormente. Cada cinco días se controló el pH y el oxígeno disuelto y se procedió al recambio parcial de medio, a su vez se proporcionó alimento y se registró la supervivencia y el número de amplexos en cada replicado. Cuando se registró un amplexo,

este fue separado y colocado en un nuevo recipiente con las mismas condiciones que el de procedencia. Una vez registrados los primeros amplexos, al momento de recambio de medio y alimentación, se inspeccionaron los recipientes para verificar la presencia de crías y se realizó el recuento de las mismas, las cuales fueron separadas de los adultos, a partir de la fecha de aparición de las primeras crías, se inspeccionaron los recipientes cada dos días. La experiencia finalizó al día 70 de ensayo (organismos de 80 días de edad aproximadamente).

Previo a su utilización, todo el material fue lavado con agua de red y detergente neutro, seguido de baño de inmersión en ácido nítrico diluido (10%) durante 48 h. Luego se enjuagó con abundante agua de red y por último tres enjuague con agua destilada. Para la manipulación individual de los organismos se utilizaron pipetas de 2 ml descartables previamente enjuagadas con agua de cultivo

### III.4.2 Resultados y discusión

**Ensayo de alimentación.** Los resultados de supervivencia y crecimiento para los cinco tipos de alimentación se muestran en la Tabla III.2. La variable longitud evidenció diferencias significativas entre el tratamiento 1 y los tratamientos 3, 4 y 5 (Tabla III.3). Los porcentajes de supervivencia variaron entre 60 y 90% siendo el mayor en el tratamiento 1, correspondiente a una dieta con placa de perifiton mientras que el tratamiento 3 evidenció la menor supervivencia. En base a los resultados obtenidos a lo largo del ensayo, las diferentes clases y combinaciones de alimentos no influirían de manera significativa en la supervivencia de *H. curvispina* en condiciones de laboratorio. Varios autores encontraron respuestas similares en varias especies de crustáceos en ensayos de laboratorio referidos al tipo de alimentación (Moore & Ferrer, 1996; Beatrici, 2000; Dutra, 2007).

**Tabla III.2: Supervivencia (%) y longitud promedio ( $\pm$  DS) de *H. curvispina* al tiempo final de ensayo con diferentes fuentes de alimento. Tratamientos: placa con perifiton (1), lechuga (2), lechuga y alimento balanceado (3), placa con perifiton y alimento balanceado (4) y placa con perifiton y lechuga (5).**

Tratamiento	1	2	3	4	5
Supervivencia (%)	90	76	60	85	73
Longitud promedio (mm)	4,18 ( $\pm$ 0,5) n=20	4,46 ( $\pm$ 0,9) n=21	5,05 ( $\pm$ 0,8) n=16	5,14 ( $\pm$ 0,7) n=17	5,07 ( $\pm$ 0,7) N=22

**Tabla III.3: Resultados del ANOVA realizado entre los diferentes tipos de alimentación (Tratamientos) para la variable crecimiento (longitud).**

	SS	Grados de Libertad	MS	F	p
<b>Intersección</b>	39,97156	1	39,97156	6633,325	<b>0,00000</b>
<b>Tratamiento</b>	0,11816	4	0,02954	4,904	<b>0,00130</b>
<b>Error</b>	0,52425	87	0,00603		

Entre los días 30 y 40 de ensayo se observó presencia de amplexos en todos los tratamientos. El número de amplexos fue el doble en los tratamientos 4 y 5. En todos los recipientes de ensayo se obtuvieron crías entre los días 55 y 65 de ensayo. La mayor cantidad de crías se produjeron en los tres tratamientos combinados (3, 4 y 5). Estudios realizados con *Daphnia similis* alimentados con tres dietas mostraron que los ejemplares expuestos a dietas combinadas (algas más *Artemia salina*), presentaron mayores tasas reproductivas que los ejemplares alimentados con algas solamente (Beatrici, 2000). Platt (1993) observó resultados similares para la especie *Ceriodaphnia dubia*. Moore & Ferrer (1996) en ensayos realizados con diferentes cantidades de alimento sobre *H. azteca* observaron un incremento en el tiempo de ocurrencia del primer amplexo y una disminución en el número de crías por hembra con la reducción en la ración de alimento. Dutra (2007) realizó estudios sobre el metabolismo energético de *H. curvispina* obtenidos en ambientes naturales, expuestos a dos tipos de alimentación durante treinta días, una con vegetación macrófita y la segunda compuesta por macrófitas y alimento balanceado comercial para peces, observando que la primera opción generó valores calóricos 26 veces menores que la segunda y que dicha especie produjo 2,7 más amplexos con la segunda dieta. La misma autora sugiere que la especie es omnívora, alimentándose de algas y bacterias asociadas con el sedimento y macrófitos acuáticas. Casset *et al.* (2001) en estudios de poblaciones naturales de *H. curvispina* en ambientes de nuestra región, concluyeron que esta especie se alimenta principalmente de fitobentos además de material biológico, detrito y partículas inorgánicas del sedimento.

**Ensayo de reproducción.** Los resultados se muestran en la Tabla III.4. El mismo se inició con organismos <2 mm de tamaño (correspondientes a individuos de <10 días de edad), al día 25 de ensayo alcanzaron un tamaño promedio de 3,6 mm. Entre el 50 y 60% de los individuos iniciales formaron parejas (amplexos), los cuales fueron separados del resto y colocados en recipientes independientes para lograr un recuento adecuado de crías. Los cinco recipientes dispuestos el día inicial produjeron un promedio de 2 amplexos cada uno. Entre los días 25 y 30 de ensayo se produjeron la mayoría de los amplexos, de los cuales el 95% se reprodujo antes de la finalización del ensayo. El 50% de las parejas produjo crías entre los 41 y 46 días

de ensayo y el resto de las parejas lo hicieron entre los días 49 y 50. Solamente el 18% de las parejas se reprodujo dos veces antes del día final de ensayo (día 70).

**Tabla III.4: Resultados del ensayo de reproducción con *H. curvispina*. El número de amplexo corresponde a las parejas en amplexo. El día de ensayo en el cual se produjo por primera vez cada pareja se indica como día de amplexo. Se indica el número de crías (Nº de crías) correspondiente a cada amplexo y el día de ensayo en el que se evidenciaron.**

Amplexo	Día de amplexo	Nº de crías (día de ensayo)
<b>1</b>	26	35 (45)
<b>2</b>	27	----
<b>3</b>	27	15 (41)
<b>4</b>	27	27 (54)
<b>5</b>	27	----
<b>6</b>	28	40 (57)
<b>7</b>	28	26 (46)
<b>8</b>	28	26 (44)
		31 (61)
<b>9</b>	29	24 (52)
<b>10</b>	29	20 (45)
		30 (62)
<b>11</b>	29	27 (49)

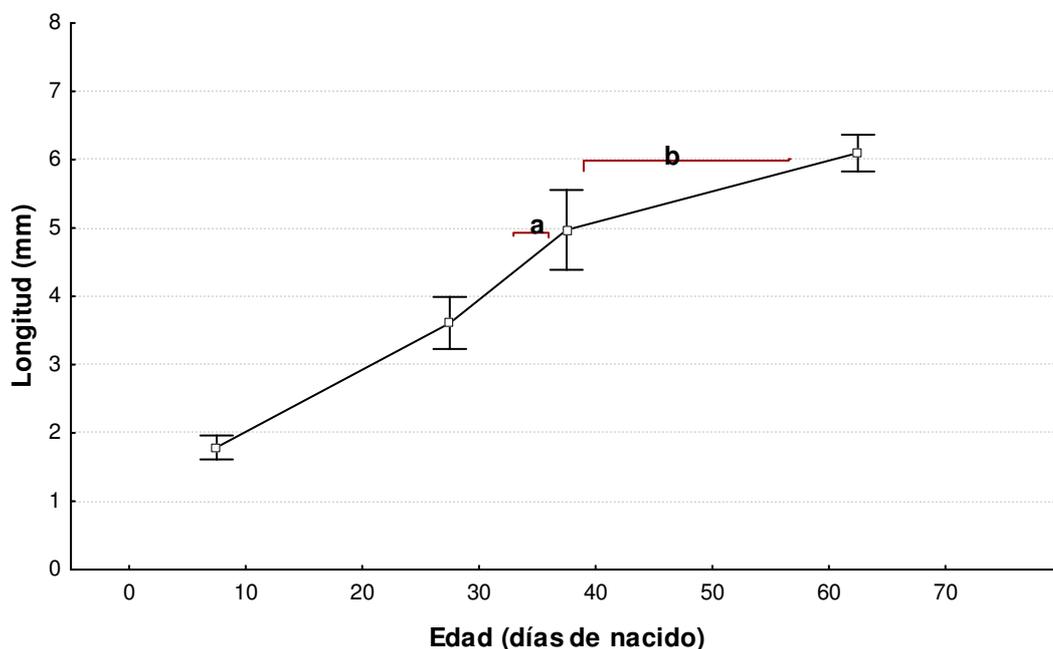
Los resultados de fecundidad obtenidos se encontraron entre 15 y 40 crías por hembra, con un promedio de 27 ( $\pm 6,6$ ). Estos resultados son similares a los encontrados por Dutra (2007) en organismos adultos colectados en campo de poblaciones de Río Grande do Sul (Brasil) y mantenidos durante dos semanas en condiciones de laboratorio. Por otro lado Casset *et al.* (2001) observó un promedio de 15 ( $\pm 5$ ) huevos por hembra en ejemplares obtenidos de poblaciones naturales de ambientes de nuestra región, estos datos se obtuvieron en el mes de septiembre, el cual corresponde a la época de mayor fecundidad. A su vez García (2009), en organismos colectados en campo en diferentes épocas del año, encontró una fecundidad comprendida entre 10 y 30 crías por hembra, observándose el mayor número únicamente en el mes de septiembre.

Los resultados de crecimiento (medido en longitud) a lo largo del ensayo de reproducción se muestran en la Tabla III.5. García (2009), en un seguimiento de las crías de *H. curvispina* obtenidas de hembras ovígeras colectadas en campo, propone tres estados de desarrollos

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). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicarían intervalos de tamaño mayores para el estado de desarrollo correspondiente a juveniles (Figura III.8), encontrándose 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*. Dicha medida corresponde a la edad en que se encontraron la mayoría de los amplexos en el ensayo de reproducción.

**Tabla III.5: Longitudes promedio ( $\pm$  desvío estándar) y número de ejemplares medidos (n) de *H. curvispina* en cuatro tiempos desde el inicio (<10 días de edad) hasta el tiempo final de ensayo (<80 días de edad).**

	Día de ensayo			
	0	16	28	65
<b>Edad (días de nacidos)</b>	de <1 a 10	de 16 a 26	de 28 a 36	>80
<b>Longitud promedio <math>\pm</math> DS</b>	1,79 ( $\pm$ 0,17)	3,61 ( $\pm$ 0,38)	4,97 ( $\pm$ 0,58)	6,10 ( $\pm$ 0,27)
	n=20	n=19	n=15	N=10



**Figura III.8: Crecimiento (medidas de longitud en mm) de individuos de *H. curvispina* a lo largo del ensayo de reproducción. Las líneas a y b corresponden a los períodos en que se evidenciaron amplexos y crías respectivamente.**

### III.5 Cultivo en laboratorio

El agua utilizada en los cultivo de los organismos prueba y en los bioensayos de toxicidad debe mantener una calidad uniforme a lo largo del tiempo. El tipo de agua utilizada debe permitir una buena supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos. En el presente estudio se seleccionó agua de red por cuestiones de practicidad, además de ser recomendable para la realización de los ensayos de toxicidad. En relación al agua reconstituida Smith *et al.* (1997) proponen un tipo de agua moderadamente dura para ensayos a corto plazo para *H. azteca*, sin embargo Kemble *et al.* (1998) y McNulty (1999) observaron supervivencias bajas para esta especie en ensayos de 28 días utilizando diferentes aguas reconstituidas.

Los resultados obtenidos al exponer anfípodos a diferentes tipos de dietas, indican que una alimentación combinada proporciona mejores condiciones para el desarrollo y la reproducción de *H. curvispina* en relación a una fuente única de alimento en condiciones de laboratorio. Si bien se mencionó anteriormente que las placas con perifiton proporcionaban mejores condiciones, en cultivos prolongados se observaron diferencias en el contenido de algas y bacterias presentes en las mismas, observándose en algunos casos diatomeas y ciertas algas que produjeron efectos tóxicos en los organismos de cultivo. Debido a dicha variación en las placas con perifiton, se seleccionó lechuga procesada suplementada con alimento balanceado comercial para peces como alimento en la metodología de cultivo propuesta.

Los recipientes de cultivo se disponen en una cámara incubadora con las mismas características (temperatura e iluminación) a la utilizada en los ensayos de toxicidad. Los organismos se mantienen sin aireación en todos los recipientes, determinándose semanalmente algunos parámetros fisicoquímicos (pH, oxígeno disuelto y conductividad). La Tabla III.6 muestra los valores de los parámetros en los recipientes de cultivo durante un período de tiempo de seis semanas.

Semanalmente se verifica la presencia de crías en los recipiente, de esta manera se obtienen organismos de edad conocida (<1 a 7 días) para ser utilizados en los ensayos de toxicidad.

Dependiendo del tipo de diseño experimental de ensayos de toxicidad que se realice, se necesitan aproximadamente entre 200 y 500 organismos por ensayo (incluyendo controles); por lo tanto teniendo en cuenta el número de crías por hembra (promedio: 30) con un mínimo de 5 hembras por recipiente, entre 2 y 4 recipientes con adultos en el mismo estado de

desarrollo serían suficientes para la obtención de la cantidad necesaria de ejemplares para la realización de una prueba de toxicidad.

**Tabla III.6: Medidas promedios ( $\pm$  DS) de pH, oxígeno disuelto ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  OD) y conductividad ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) medidos en los cultivos de *H. curvispina* durante un período de seis semanas. El número de frascos a los cuales se les midieron los parámetros fueron entre 7 y 10 por semana.**

Semana	pH	OD	Conductividad
<b>1</b>	7,75 ( $\pm 0,35$ )	8,0 ( $\pm 1,90$ )	1,07 ( $\pm 0,11$ )
<b>2</b>	7,25 ( $\pm 0,41$ )	10,9 ( $\pm 0,17$ )	1,14 ( $\pm 0,02$ )
<b>3</b>	7,14 ( $\pm 0,24$ )	10,2 ( $\pm 0,67$ )	1,14 ( $\pm 0,01$ )
<b>4</b>	6,80 ( $\pm 0,26$ )	8,9 ( $\pm 0,74$ )	1,15 ( $\pm 0,01$ )
<b>5</b>	7,17 ( $\pm 0,25$ )	8,5 ( $\pm 0,82$ )	1,16 ( $\pm 0,02$ )
<b>6</b>	7,07 ( $\pm 0,17$ )	8,7 ( $\pm 1,63$ )	1,20 ( $\pm 0,20$ )

**Los resultados obtenidos permitieron establecer un protocolo de cría de *H. curvispina* en condiciones controladas de laboratorio que se describe a continuación:**

- a. Se utilizan frascos de vidrio de 3L conteniendo agua de red de clorada (caracterizada anteriormente, en III.3.2).
- b. Se colocan un promedio de 30 individuos por frasco en aproximadamente 2,5 L de agua.
- c. Se los alimenta con lechuga *ad-libitum* 2-3 veces por semana, y alimento para peces una vez por semana.
- d. Los recipientes se colocan en cámara incubadora con T: 21 °C ± 1 y fotoperíodo: 16/8 horas luz/oscuridad. Los cultivos se realizan sin aireación, el contenido de oxígeno disuelto se determina semanalmente.
- e. El agua de cada recipiente se renueva parcialmente (3/4 partes) una vez por semana con agua de cultivo. Previo a la renovación se mide la supervivencia y se verifica la presencia de crías.
- f. Si el recipiente contiene neonatos se procede a la separación de los mismos, haciendo pasar el contenido de todo el recipiente por un colador donde quedan retenidos los adultos (2 mm abertura de malla) a un recipiente plástico. El agua luego es filtrada por una malla fina (0,5 mm, #35 ASTM), para retener los neonatos y conservar un cuarto del volumen y el detrito. Después de que los adultos son retirados, los individuos restantes tendrán una edad entre <1 y 7 días.
- g. Los neonatos separados semanalmente se disponen en un nuevo recipiente con agua de cultivo fresca y alimentación.
- h. Previamente a cada renovación de medio se mide temperatura, oxígeno disuelto, pH y conductividad en cada recipiente.

## CAPÍTULO IV

### Ensayos de toxicidad aguda de metales pesados y glifosato con *H. curvispina* en agua

#### IV.1 Introducción

Cuando se llevan a cabo ensayos de toxicidad es importante utilizar procedimientos estandarizados que permitan una comparación de los resultados obtenidos intra e interlaboratorios. Estas metodologías incluyen la evaluación de tóxicos de referencia sobre especies de prueba estandarizadas, tendiendo a una maximización de la comparabilidad, reproducibilidad y confiabilidad de los datos obtenidos (Buikema *et al.*, 1982).

Por otro lado, los ensayos de toxicidad, exhiben *variabilidad*, la cual se puede describir a través de dos medidas de precisión: repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos de toxicidad (Rand, 1995). La repetibilidad se refiere a la similitud en los resultados de ensayos repetidos bajo condiciones idénticas, y se puede determinar cuando las varianzas se estiman “dentro” del laboratorio, en repeticiones del mismo operador y con el mismo ensayo y tóxico utilizado. La repetibilidad puede incorporar factores de variación del operador, de muestras de referencia o los organismos prueba. Estas variaciones se pueden disminuir con la realización de ensayos periódicos. Por otra parte, la reproducibilidad o variación “interlaboratorios”, se puede describir como la variación entre los resultados obtenidos de un ensayo realizado con una misma muestra en varios laboratorios.

Las determinaciones cuantitativas de la precisión en ensayos de toxicidad son dificultosas en comparación con las determinaciones analíticas (químicas). Como se mencionó en el Capítulo III (Pag. 22), cuando se realizan ensayos de toxicidad existen varios factores que modifican el efecto y en consecuencia los resultados obtenidos, ya sean relacionados con los organismos prueba o con los factores fisicoquímicos en cada protocolo (Sprague, 1995; Ronco *et al.*, 2000). Sin embargo se pueden obtener medidas de precisión mediante la comparación de valores obtenidos en pruebas con tóxicos de referencia (e.g., concentración

letal media [CL50]) con un valor aceptado, generado por varios laboratorios (ASTM, 1990). Los diferentes índices de precisión pueden incluir dos desviaciones estándar, factor de variación (FV), que es la razón entre el límite superior de estimación y el menor, e índices en porcentaje como el coeficiente de variación (CV) (EC, 1999). Según el informe EPS 1/RM/134 (EC, 1999), ensayos realizados en condiciones de laboratorio controladas muestran CV entre laboratorios de un 13% llegando a 30 y 50%; en la mayoría de los casos es menor al 30% (Buikema *et al.*, 1982; Grothe & Kimerle, 1985; Pickering, 1988; Rue *et al.*, 1988; USEPA, 1991; EC, 1999). Se pueden definir como *valores aceptables* y considerados de buena precisión o valores relativamente bajos, a variaciones de entre el 10 y 20%

Los compuestos químicos deben tener ciertas cualidades para ser utilizados como tóxicos de referencia. La agencia ambiental canadiense (EC, 1990) sugiere ciertos compuestos para su utilización en controles de calidad, dentro de los cuales se encuentra el cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), zinc ( $\text{Zn SO}_4$ ) y cromo ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) como compuestos inorgánicos y el dodecil sulfato de sodio (SDS) como orgánico. Dichos compuestos son utilizados en ensayos de toxicidad para evaluar las posibles variaciones en la sensibilidad de los organismos utilizados como organismos prueba en el laboratorio (USEPA, 1993; Silva *et al.*, 2007), y a su vez se pueden utilizar para verificar la reproducibilidad del método por medio de intercalibraciones (Burton *et al.*, 1996; Ronco *et al.*, 2000).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente (Capítulo III, Pag. 20) es importante la realización de monitoreos ecotoxicológicos utilizando especies autóctonas, al momento de evaluar el impacto de sustancias sobre un ecosistema acuático en particular (Rand, 1995; Ferrari *et al.*, 1998). Cuando se selecciona una especie nativa como organismo prueba diferente a las incluidas en protocolos estandarizados, se deben tener en cuenta una serie de pautas que indiquen una sensibilidad equivalente a la o las especies recomendadas para el tipo de ensayo en consideración. El presente trabajo tiene como objetivo principal la evaluación de contaminantes asociados a los sedimentos utilizando el anfípodo *Hyalella curvispina* como organismo prueba. La información existente sobre la sensibilidad de *H. curvispina* a compuestos tóxicos es escasa. En este sentido se implementaron ensayos agudos en matriz acuosa con tóxicos puros, para la obtención de información de la sensibilidad de dicha especie prueba, adaptando un protocolo estandarizado para *H. azteca*.

Los objetivos del presente Capítulo incluyen:

- Adaptación de un ensayo estandarizado de toxicidad en laboratorio para la especie *H. azteca* a la especie de anfípodo autóctona *H. curvispina*.
- Puesta a punto del bioensayo y aplicación al estudio de efectos tóxicos de compuestos puros de interés ambiental.
- Realización de un ejercicio interlaboratorios, utilizando muestras ciegas de tóxicos de referencia, como control de calidad del bioensayo.

Cuando se evalúan los efectos tóxicos de un contaminante sobre un organismo, los enfoques clásicos de la toxicología describen la relación entre la concentración de un compuesto químico y el efecto nocivo que produce. Esta relación se conoce como *relación concentración-respuesta* (Rand, 1995). En este estudio el punto final medido fue la mortalidad. Este tipo de efecto es una respuesta del tipo todo o nada para la cual Finney (1971) propuso el nombre de respuesta cuantal. El conjunto de respuestas todo o nada poseen una distribución de frecuencias denominada *binomial*. El objetivo final del análisis e interpretación de las curvas C-R es estimar una serie de parámetros toxicológicos que sintetizan y permiten una rápida y sencilla comparación de la toxicidad de un compuesto o de la sensibilidad relativa de diferentes especies, como también la comparación de diferentes condiciones de ensayo para una misma especie.

Entre los parámetros toxicológicos más usados que se calculan a partir de las curvas C-R se encuentran la CL50: concentración letal mediana, la cual indica la concentración letal para el 50% de los organismos expuestos (Diaz-Baez *et al.*, 2005). La CL50 tiene una mayor utilidad si se obtienen parámetros tales como los intervalos de confianza al 95% y la pendiente de la curva C-R (Newman & Unger, 2003). En el presente estudio se obtuvieron las CL50 y sus límites de confianza para poder realizar comparaciones con los resultados obtenidos en otras investigaciones y diferentes procedimientos.

## IV.2 Metodología

Los ensayos de toxicidad con compuestos puros se realizaron adaptando la metodología estandarizada propuesta por la Agencia Ambiental de los EEUU de Norteamérica (US EPA, 2000) para ensayos agudos en agua con *H. azteca*. En el primer apartado se describe la metodología general empleada en los ensayos de toxicidad agudos en matriz acuosa.

En los apartados siguientes se describen los ensayos con compuestos puros y el ejercicio interlaboratorios con muestras ciegas de tóxicos de referencia. En adelante la denominación Laboratorio A corresponde a la autora del presente trabajo y Laboratorio B a profesionales de la Universidad Nacional de Luján.

#### **IV.2.1 Metodología general de ensayo de toxicidad**

Los ensayos de toxicidad se realizaron en matriz acuosa y con un tiempo de exposición de 96 horas, en condiciones estáticas a temperatura ( $21 \pm 1$  °C) y fotoperíodo (16/8 hs luz/oscuridad) controlados. El agua de dilución utilizada fue agua declorinada de red en los ensayos con tóxicos puros (ver caracterización en el Capítulo III.3.2) y agua reconstituida moderadamente dura (RMHW) en los ensayos correspondientes al ejercicio interlaboratorio. La composición del agua reconstituida fue la siguiente ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaHCO}_3$ , 96;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 60;  $\text{MgSO}_4$ , 60;  $\text{KCl}$ , 4; pH, 7.4-7.8; dureza  $\text{CaCO}_3$ , 80-100 (Weber, 1993).

Se utilizaron envases transparentes de polipropileno de 500 ml de capacidad y tapa del mismo material. Se realizaron tres replicados por concentración en cada uno de los cuales se colocaron 200 ml de solución y 10 organismos. La Tabla IV.1 resume las condiciones empleadas en los ensayos de toxicidad.

Se determinaron las concentraciones efectivas de las soluciones *stock* y las diluciones en el tiempo final por espectrometría de absorción atómica, método 3111B llama directa de Aire-Acetileno para cobre, cromo y zinc y espectrometría de absorción atómica de Vapor Frío método 3112, para mercurio (APHA, 1998). Se utilizó Espectrofotómetro de Absorción Atómica Varian SpectrAA300 con generador de hidruros. Para el análisis de los metales se utilizaron patrones estándares certificados AccuStandard Inc.

**Tabla IV.1: Condiciones generales de ensayos con los tres tóxicos puros.**

<b>Condiciones</b>	
<i>Tipo de ensayo</i>	Agudo
<i>Temperatura</i>	21 ± 1 °C
<i>Fotoperíodo</i>	16h luz/ 8h oscuridad
<i>Renovación</i>	Sin renovación
<i>Recipientes</i>	Plásticos de 500 cm <sup>3</sup> de capacidad
<i>Volumen de agua</i>	200 ml
<i>Agua de dilución</i>	Agua declorinada de red (agua de cultivo de <i>H. curvispina</i> ) Agua reconstituida
<i>Nº de organismos</i>	10 por recipiente
<i>Replicados</i>	3 por concentración
<i>Alimentación</i>	Lechuga a las 48 h de ensayo
<i>Aireación</i>	Sin aireación
<i>Duración</i>	96 horas
<i>Punto final</i>	Mortalidad
<i>Aceptabilidad</i>	90 % supervivencia en controles negativos

Los organismos fueron seleccionados de los cultivos 48 horas previas al inicio del ensayo y alimentados de la misma forma que en los cultivos (las condiciones de cultivo se describen en el ítem III.5 del capítulo III, (Pag. 37). Para todos los ensayos se seleccionaron ejemplares juveniles de 3 mm de longitud. De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos detalladas en el Capítulo III (ver ítem III.4.2, Pag. 35) una longitud entre 3 y 4 mm corresponde a ejemplares de 20 a 30 días de edad, encontrándose en su etapa pre-reproductiva. Se seleccionó dicho intervalo de edad para ensayos agudos (96 horas), debido a una relación favorable entre la facilidad de manipulación y sensibilidad de los individuos en este estadio (García, 2009); además, al ser ensayos de corta duración, durante la prueba no se evidencian amplexos (comportamiento reproductivo). En ensayos con agua reconstituida como agua de dilución, se procedió a la aclimatación de los organismos con un mínimo de 48 horas previo a las pruebas. Los anfípodos se colectaron con pipeta plástica y se colocaron sobre una red de trama fina antes de la incorporación en los recipientes de ensayo, para evitar la dilución de las soluciones de exposición. Una vez finalizada la

incorporación de los organismos se verificó el número y el estado de los mismos en todos los recipientes.

Se determinó el pH, oxígeno disuelto, conductividad y nitrógeno amoniacal en agua de algunos de los recipientes seleccionados al azar, tanto al tiempo inicial como final de exposición. Para realizar las mediciones se utilizó instrumental electrónico (Lutron®) con los siguientes electrodos de prueba: pH (YK-2001PH), OD (YK-200PDO) y conductividad (YK-200PCT). Las mediciones de amonio se realizaron utilizando kit comercial Aquamerck® (>0,2 mg.L<sup>-1</sup>). La mortalidad se monitoreó cada 24 horas.

### **Criterios de aceptabilidad**

- Las muertes en los grupos control debieron ser menores al 10%. Este criterio fue adoptado siguiendo la propuesta por USEPA (1989).
- Las concentraciones nominales de la solución del contaminante utilizado no debieron presentar diferencias significativas con las concentraciones efectivas obtenidas a partir de la verificación analítica. Se clasificaron como: a) aceptado: las concentraciones nominales no difirieron significativamente de las concentraciones efectivas y b) rechazado: las concentraciones nominales presentaron diferencias significativas respecto de las concentraciones efectivas.
- Como criterio *a posteriori* se determinó la significancia estadística de la CL50 en el análisis de los resultados de cada ensayo, considerándolos aceptados cuando  $p < 0,05$ .

### **Análisis de datos**

El punto final evaluado fue la mortalidad a las 24, 48, 72 y 96 h. El análisis realizado para cada grupo de resultados obtenidos a partir de cada bioensayo, consistió en la aplicación - por medio de planillas de cálculo - del análisis Probit (Diaz Baez *et al.*, 2005) con el objetivo de estimar las curvas concentración-respuesta de la especie respecto cada uno de los tóxicos y calcular las CL50 y sus límites de confianza al 95%. Posteriormente los mismos grupos de datos fueron corridos en el *Probit Analysis Program*, versión 1.5. A partir de los resultados se calcularon los coeficientes de regresión y correlación para todos los ensayos y su significancia y se compararon las ecuaciones de regresión (Zar, 2010). Los resultados de los ensayos del ejercicio interlaboratorio también fueron analizados por medio de una prueba de *t* para muestras pareadas, con un nivel de significancia de 0,05.

### **Material de laboratorio utilizado**

Previo a su utilización, todo el material fue lavado con agua de red y detergente neutro, seguido de baño de inmersión en ácido nítrico diluido (10%) durante 48 h. Luego se enjuagó

con abundante agua de red y por último tres enjuague con agua destilada. Para la manipulación individual de los organismos se utilizaron pipetas de 2 ml descartables previamente enjuagadas con agua de cultivo. Los recipientes de ensayo se enjuagaron con el agua de dilución a ser utilizada en cada ensayo en particular previo al inicio del mismo.

#### **IV.2.2 Ensayos de toxicidad con compuestos puros: cobre, mercurio y glifosato.**

Se seleccionaron los iones de los metales Cu(II) y Hg(II) y el herbicida glifosato, como tóxicos de relevancia ambiental, para la realización de ensayos agudos en matriz acuosa. En todos los ensayos se utilizó agua de red de clorinada como medio de dilución. También se realizó un ensayo con cobre utilizando agua reconstituida (RMHW). Para el caso particular de los ensayos con mercurio, se utilizaron ejemplares juveniles de dos tamaños, <3 mm y >3 mm de longitud, para poder realizar una comparación de la respuesta según el estado de desarrollo de los organismos.

En pruebas preliminares realizados con mercurio en condiciones estáticas (sin renovación de soluciones), se observaron disminuciones importantes en las concentraciones medidas a las 96 horas de exposición, en relación a las concentraciones iniciales, llegando a reducciones de hasta un orden de magnitud. A partir de estas observaciones se optó por la alternativa de renovación diaria de las soluciones de exposición.

Las diferentes concentraciones de exposición para cada tóxico se prepararon por series de diluciones en agua de ensayo de una solución *stock* de 1000 mg.L<sup>-1</sup>, las mismas fueron realizadas a partir de los siguientes reactivos: cobre: mercurio: HgCl<sub>2</sub> (Anedra<sup>®</sup>) CuSO<sub>4</sub> (Anedra<sup>®</sup>) y glifosato: formulado (Roundup<sup>®</sup>Max). Las concentraciones fueron seleccionadas a partir de ensayos preliminares. Los grupos control fueron establecidos como blancos o controles negativos utilizando medio de dilución. En la Tabla V.2 se describen el número de ensayos definitivos, la cantidad de organismos y las concentraciones utilizadas en cada ensayo en particular.

**Tabla IV.2: Detalles de las exposiciones a mercurio, cobre y glifosato de *H. curvispina*.** Se indican los intervalos de concentración (nominales), el tamaño y número de organismos utilizados en cada ensayo

Ensayo	Intervalo de Concentraciones mg.L <sup>-1</sup>	Anfípodos	
		Tamaño	Nº
1-Hg	Control-0,01-0,09	>3mm	240
2-Hg	Control-0,05-0,1	>3mm	240
3-Hg	Control-0,01-0,2	>3mm	300
4-Hg	Control-0,01-0,8	>3mm	270
5-Hg	Control-0,03-0,25	>3mm	160
6 <sup>a</sup> -Hg	Control-0,01-0,08	<3mm	270
7-Hg	Control-0,01-0,2	>3mm	300
1-Cu	Control-0,08-0,26	>3mm	240
2 <sup>b</sup> -Cu	Control-0,06-0,18	>3mm	240
3 <sup>b</sup> -Cu	Control-0,06-0,18	>3mm	240
4-Cu	Control-0,12-0,34	>3mm	240
1-G	Control-9-28	>3mm	210

<sup>a</sup> se utilizaron ejemplares de menor tamaño

<sup>b</sup> se utilizó RMHW como agua de dilución

### IV.2.3 Ejercicio interlaboratorios con tóxicos de referencia

El ejercicio entre los laboratorios se llevó a cabo en conjunto con profesionales del Programa de Fisiología Aplicada (PRODEA), Departamento de Ciencias Básicas-Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES) de la Universidad de Luján (UNLu).

Cada laboratorio recibió 6 muestras líquidas provistas por el CIMA. Las mismas fueron rotuladas como: M1, M2, M3, M4, M5 y M6, a partir de las cuales se realizaron ensayos agudos de 96 h de exposición. Una vez finalizado el ejercicio se pusieron en conocimiento de los analistas de los laboratorios participantes la identidad y la concentración de las seis muestras.

Los ensayos realizados con las muestras M1 a M4 se hicieron con agua de cultivo de los organismos prueba. En los ensayos con las muestras M5 y M6 se utilizó agua reconstituida moderadamente dura (RMHW) como agua de dilución, cuya composición química se detalló en IV.2.2. Para establecer el intervalo de concentraciones a ser utilizado, se realizaron ensayos preliminares, empleando la siguiente serie de diluciones: 0 (control)-0,1-1-10-50-100 % (v/v), sin replicados, para cada muestra ciega. A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos se identificó el intervalo de diluciones para los definitivos. Los intervalos de

concentración definitivos para cada muestra se detallan en la Tabla IV.3. Cada laboratorio utilizó cultivos propios como fuente de organismos prueba; se utilizaron ejemplares de 3-4 mm de longitud para disminuir la variabilidad en la respuesta debida al tamaño de los organismos.

**Tabla IV.3: Intervalo de concentraciones (expresadas en % de dilución) y número de diluciones en cada ensayo con muestras ciegas.**

	Muestras ciegas					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Intervalo %	0,3 – 0,5	10,0 – 85,0	5,0 – 55,0	60 – 100	0,0 – 2,0	0,0 – 50,0
Nº Diluciones	5-7	6	6	6	8-9	8-9

### IV.3 Resultados y discusión

#### IV.3.1 Ensayos de toxicidad con compuestos puros

En los ensayos con cobre, mercurio y glifosato las concentraciones fueron medidas en las soluciones de exposición al tiempo final de ensayo, las cuales se hallaron entre el 85 y 100% de los valores nominales en las concentraciones ensayadas. Las concentraciones efectivas se detallan en la Tabla IV.4. Los resultados de todos los ensayos corresponden a valores nominales.

**Tabla IV.4: Valores de concentraciones nominales (CN) y medidas (CE: concentración efectiva) de mercurio, cobre y glifosato en las soluciones de exposición a tiempo final de ensayo en mg.L<sup>-1</sup>. Los valores CE corresponden a concentraciones promedios entre ensayos.**

CN			CE		
Hg	Cu	Gli	Hg	Cu	Gli
0,015	0,06	9,0	0,014	0,054	8,5
0,020	0,08	11,5	0,018	0,075	10,0
0,035	0,09	14,5	0,031	0,09	12,7
0,050	0,10	18,0	0,044	0,10	17,2
0,070	0,12	22,5	0,060	0,11	20,8
0,090	0,14	28,0	0,077	0,13	27,6
0,15	0,18	-----	0,128	0,17	-----
0,20	0,28	-----	0,171	0,27	-----

Los resultados de todos los ensayos realizados se muestran en la Tabla IV.5; también se indican los que cumplieron los criterios de aceptabilidad.

**Tabla IV.5: Resultados de todos los ensayos realizados con cobre, mercurio y glifosato.**

Ensayo	Nº org	Concentraciones		Intervalo Evaluado	Respuesta		Variabilidad		
		Total	C-R		CL50 <sub>96h</sub>	LCI-LCS	Rango	%	Ac.
<b>1-Hg</b>	240	7	5	0,01-0,09	0,036	Nc	Nc	Nc	X
<b>2-Hg</b>	240	7	6	0,05-0,1	0,054	0,043-0,066	0,04	30	A
<b>3-Hg</b>	300	9	5	0,01-0,2	0,028	0,024-0,032	0,008	25	A
<b>4-Hg</b>	270	8	5	0,01-0,08	0,055	0,034-0,09	0,056	62	A
<b>5-Hg</b>	160	5	4	0,03-0,25	0,067	Nc	Nc	Nc	X
<b>6-Hg</b>	270	8	5	0,01-0,08	0,018	0,015-0,021	0,006	29	A
<b>7-Hg</b>	300	9	6	0,01-0,2	0,053	0,042-0,076	0,034	40	A
<b>1-Cu</b>	240	6	4	0,08-0,26	>0,26	Nc	Nc	Nc	X
<b>2-Cu</b>	240	6	5	0,06-0,14	0,21	0,15-1,62	1,15	70,9	X
<b>3-Cu</b>	240	6	6	0,06-0,18	0,116	0,10-0,14	0,04	28,5	A
<b>4-Cu</b>	240	6	5	0,12-0,34	0,323	0,29-0,38	0,09	23,7	A
<b>1-G</b>	210	6	6	9-28	17,27	15,83-18,92	3,09	16,3	A

Referencias: **Nº organismos** utilizados en el ensayo; **Concentraciones total**: número de concentraciones utilizadas en total, **C-R**: número de concentraciones utilizadas en la recta concentración respuesta; **Intervalo evaluado**: en mg.L<sup>-1</sup>; **Respuesta CL50<sub>96h</sub>**: en mg.L<sup>-1</sup>, **LCI-LCS**: límites de confianza inferior y superior en mg.L<sup>-1</sup>; **Variabilidad Ac**: aceptado A, rechazado X. Nc: no pudieron ser calculados.

La Tabla IV.6 resume los valores de las concentraciones letales a las 96 h de exposición (CL10<sub>96h</sub> y CL50<sub>96h</sub>) para los tres tóxicos, con sus respectivos límites de confianza. Los valores de las concentraciones letales para mercurio corresponden a los promedios de 4 ensayos, los cuales fueron seleccionados del total de ensayos a partir de los criterios de aceptabilidad propuestos. Los resultados presentados en dicha Tabla corresponden a individuos del mismo tamaño.

**Tabla IV.6: Concentraciones letales (CL10 y CL50) en mg.L<sup>-1</sup> de mercurio, cobre y glifosato a 96 horas de exposición para *H. curvispina*.** LCI, LCS: límites de confianza inferior y superior.

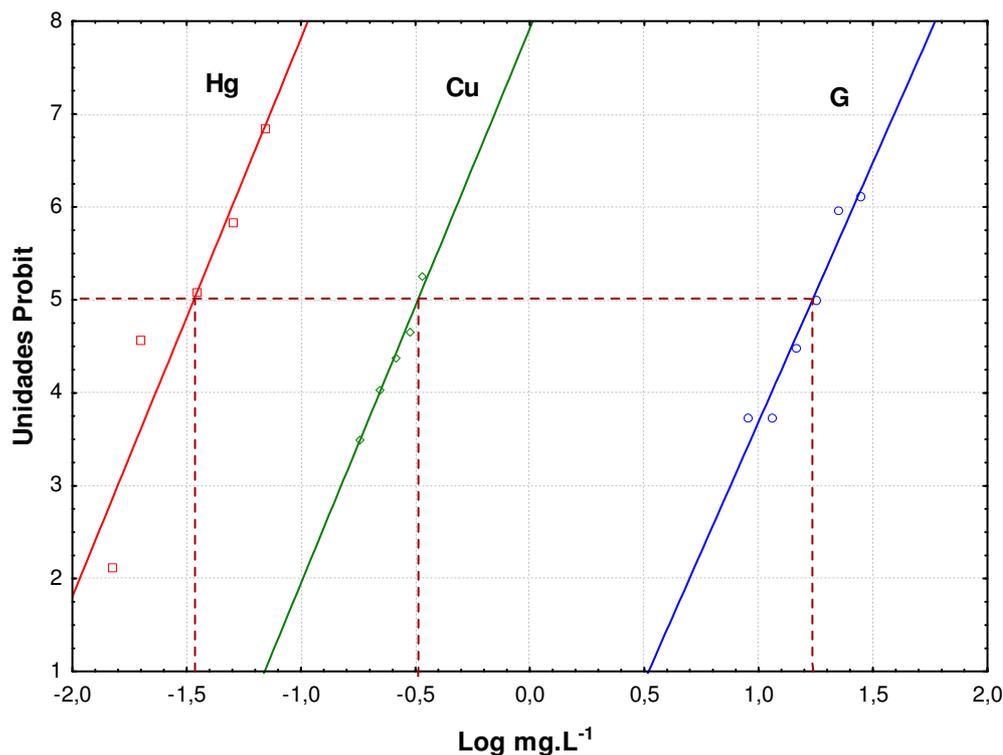
Tóxico	CL10	LCI	LCS	CL50	LCI	LCS
<b>Hg</b>	0,011	0,005	0,016	0,047	0,035	0,066
<b>Cu</b>	0,052	0,028	0,065	0,116	0,101	0,145
<b>Glifosato</b>	10,34	8,510	11,72	17,27	15,83	18,92

Los individuos juveniles de *H. curvispina* tienen una sensibilidad promedio al mercurio, calculada a partir de las  $CL_{50_{96h}}$ , de  $0,047 \text{ mg Hg.L}^{-1}$ , pudiendo variar entre  $0,028$  y  $0,055 \text{ mg Hg.L}^{-1}$ . Esta sensibilidad promedio se encuentra en el 95% de los casos entre  $0,033$  y  $0,067 \text{ mg Hg.L}^{-1}$ . Tomando los valores de  $CL_{50_{96h}}$  se obtuvo un CV de 27%. Si bien es un valor que supera levemente los aceptables (USEPA, 1991) en la literatura se obtienen factores de variación similares a los obtenidos en este estudio, para valores de  $CL_{50}$  para diversos tóxicos y organismos prueba (Sprague, 1995) dentro del mismo laboratorio. En la Tabla IV.7 se puede observar la respuesta tiempo dependiente de *H. curvispina* a los tóxicos evaluados.

**Tabla IV.7: Valores de concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ) en  $\text{mg.L}^{-1}$  con sus límites de confianza, para mercurio, cobre y glifosato a 24, 48, 72 y 96 horas de exposición.**

Tiempo (h)	$CL_{50}$		
	Hg	Cu	Glifosato
<b>24</b>	0,143 (0,100-0,280)	0,217 (0,18-0,34)	39,6 (30,1-105,0)
<b>48</b>	0,055 (0,045-0,068)	0,208 (0,17-0,31)	23,0 (20,3-29,7)
<b>72</b>	0,036 (0,030-0,043)	0,167 (0,14-0,23)	18,9 (17,3-21,4)
<b>96</b>	0,028 (0,024-0,032)	0,116 (0,10-0,14)	17,3 (15,2-18,6)

Se realizaron las curvas concentración-respuesta (C-R) para mercurio, cobre y glifosato (G), a partir de resultados a las 96 h de exposición, de los ensayos que se consideraron aceptados (ver Tabla IV.5). En la Figura IV.1 se muestran las curvas C-R correspondientes a los ensayos 3-Hg, 4-Cu y 1-G, donde se observan los diferentes intervalos de concentraciones de respuesta dados por la pendiente de la curva (Tabla IV.8), dichos ensayos fueron realizados con el mismo tipo de medio de dilución y tamaño de organismos, del total de ensayos con mercurio se graficó el 3-Hg por presentar la menor variabilidad. Las pendientes correspondientes al mercurio y glifosato indican que un aumento del 40% de la mortalidad (diferencia entre  $CL_{50}$  y  $CL_{10}$ ) se corresponde con un aumento del 40% en la concentración, mientras que para el cobre se corresponde con un aumento del 80% en la concentración letal.



**Figura VI.1: Curvas concentración-respuesta de *H. curvispina* a las 96 horas de exposición para mercurio (Hg), cobre (Cu) y Glifosato (G).** Las líneas punteadas indican la estimación de la concentración a partir del 50% de mortalidad (5 unidades probit), para las curvas estimadas.

**Tabla IV.8 Parámetros de las regresiones y correlaciones realizadas para cada una de las curvas concentración-respuesta seleccionadas.**  $r^2$ : coeficiente de determinación.  $r$ : coeficiente de correlación.  $p$ : mínimo valor de significancia para la correlación.  $a$ : ordenada al origen.  $b$ : coeficiente de regresión.  $n$ : número de pares ordenados considerados en la regresión y correlación.

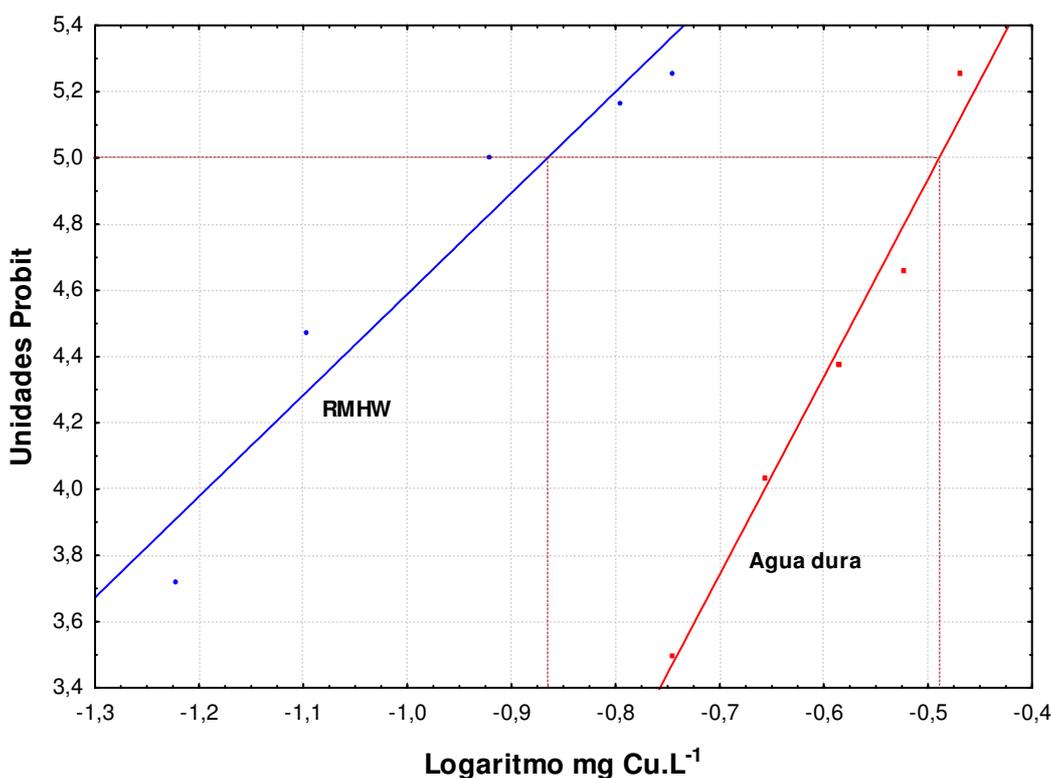
Ensayo	$r^2$	$r$	$p$	$a$	$b$	$n$
<b>3-Hg</b>	0,880	0,938	0,010	13,82	5,917	7
<b>6-Hg</b>	0,959	0,979	0,000	14,89	5,917	6
<b>3-Cu</b>	0,929	0,964	0,008	7,643	3,054	6
<b>4-Cu</b>	0,976	0,988	0,001	7,918	5,966	5
<b>1-G</b>	0,945	0,972	0,001	-1,898	5,584	6

#### IV.3.1 a) Influencia de la dureza del medio de ensayo en la toxicidad al cobre

Se realizó la comparación de curvas C-R entre los ensayos 3-Cu y 4-Cu con el objetivo de comparar la sensibilidad de la especie al cobre en agua de diferentes características. Los ensayos 3-Cu y 4-Cu fueron realizados con agua de red (agua dura, dureza: 240

mg  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ) y agua reconstituida moderadamente dura (RMHW, dureza: 80-100 mg  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ), respectivamente.

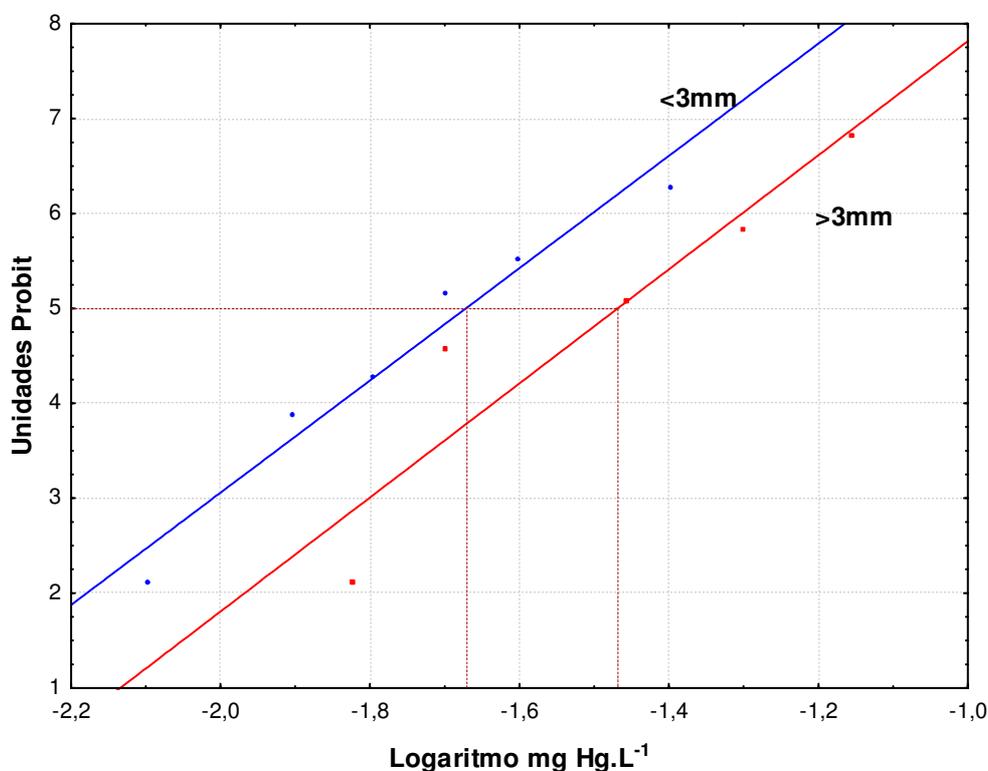
Los resultados de la comparación muestran que existen diferencias significativas entre la pendiente y la ordenada al origen ( $p>0,05$ ). En la Figura IV.2 se observa que las rectas son diferentes. Los resultados de la comparación de las curvas no sólo indican diferencias en la sensibilidad (ordenada al origen), sino también en la forma de respuesta expresada en las diferencias de la pendiente de la recta para cada tipo de agua de dilución. Esto indica que los anfípodos expuestos al cobre en agua de dureza moderada son más sensibles que los expuestos en agua dura, siendo sus  $\text{CL}_{50_{96h}}$  de 0,116 y 0,323 mg  $\text{Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente. Dicho de otro modo, la disminución en la dureza del agua aumenta casi 3 veces la sensibilidad de los anfípodos juveniles al cobre.



**Figura IV.2: Comparación de curvas C-R entre los ensayos con cobre realizados con agua reconstituida moderadamente dura (RMHW) y agua declorinada de red (Agua dura).** Las líneas punteadas indican la estimación de la concentración a partir del 50% de mortalidad (5 unidades probit), para las curvas estimadas.

### IV.3.1 b) Respuesta al mercurio en anfípodos de diferentes edades

Para determinar si existen diferencias en la respuesta al mercurio en los anfípodos de edades diferentes, se compararon las curvas C-R de los ensayos 3-Hg y 6-Hg (Figura IV.3). Los resultados de esta comparación muestran que no existen diferencias significativas entre las pendientes ( $p > 0,05$ ); en cambio hubieron diferencias significativas en las ordenadas al origen ( $p < 0,05$ ). Los anfípodos en el ensayo 6-Hg fueron significativamente más sensibles al mercurio que los del ensayo 3-Hg, siendo sus  $CL_{50_{96h}}$  de 0,019 y 0,028 mg Hg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Los resultados de estos ensayos muestran una disminución de 2 veces en la sensibilidad al mercurio para los individuos de menor tamaño.



**Figura IV.3: Comparación de curvas C-R entre los ensayos con mercurio realizados con ejemplares de *H. curvispina* de tamaño <3mm y >3mm. Las líneas punteadas indican la estimación de la concentración a partir del 50% de mortalidad (5 unidades probit), para las curvas estimadas.**

### IV.3.1 c) Comparación de la sensibilidad de *H. curvispina* con especies protocolizadas

Las variaciones en las condiciones de exposición en los bioensayos (tipo de agua, edad, condiciones de los organismos y los diferentes factores fisicoquímicos del medio que afectan

la respuesta, generan un amplio intervalo de valores de CL50 para las mismas especies o especies relacionadas. Ello genera dificultades en las comparaciones de sensibilidad (Phipps *et al.*, 1995; Suedel *et al.*, 1996; Milani *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente, los estudios sobre sensibilidad a compuestos tóxicos en *H. curvispina* son muy escasos. García (2009) realizó estudios evaluando la toxicidad al cadmio y cobre para esta especie, encontrando valores comparables para el cobre (CL50<sub>96h</sub>: 0,194 mg Cu.L<sup>-1</sup>) en relación a los obtenidos en este estudio (CL50<sub>96h</sub>: 0,116 mg Cu.L<sup>-1</sup>) en individuos juveniles. Por otro lado, Giusto & Ferrari (2008) determinaron valores cercanos de sensibilidad al cobre (CL50<sub>96h</sub>: 0,17 mg Cu.L<sup>-1</sup>) para *H. pseudoazteca*; especie que se puede encontrar en los mismos ambientes que *H. curvispina*. Los valores mencionados anteriormente se obtuvieron en los tres casos en bioensayos realizados con el mismo tipo de medio de dilución (agua reconstituida moderadamente dura). Es bien conocido que la toxicidad de los metales en los organismos acuáticos está muy influenciada por los parámetros del agua como dureza y contenido de materia orgánica (Heijerick *et al.*, 2003; Bianchini & Wood, 2008; Park *et al.*, 2009). Los incrementos en la dureza del agua, en particular, resultan en una disminución de la toxicidad del cobre en peces y algunas especies de crustáceos (Erickson *et al.*, 1996; Welsh *et al.*, 2000, Yim *et al.*, 2006). Para los juveniles de *H. curvispina* expuestos al cobre en agua de durezas diferentes se observó que un aumento de tres veces en ese parámetro disminuyó tres veces su sensibilidad (expresada como CL50<sub>96h</sub>). En concordancia con estos resultados, García (2009) informó que el aumento del 100% en la dureza disminuyó el efecto tóxico del cadmio a la mitad para la misma especie.

En relación al mercurio y glifosato (Roundup), no se encuentran en la bibliografía valores de sensibilidad para esta especie en particular, siendo los resultados del presente trabajo la primera aproximación al estudio de efectos tóxicos agudos para los compuestos mencionados en *H. curvispina*.

Dentro de los invertebrados bentónicos utilizados en bioensayos con sedimentos, *H. azteca* es considerada una especie muy sensible a los contaminantes ambientales (Borgmann *et al.*, 1989; Phipps *et al.*, 1995). Phipps *et al.* (1995) observó que *H. azteca* es más sensible a 10 contaminantes que *Chironomus tentans* (Díptero), especie que también se encuentra protocolizada en bioensayos con sedimentos (ASTM, 1999; USEPA, 2000). Milani *et al.* (2003) observaron diferencias en las CL50 de un orden de magnitud mayor para *Hexagenia sp.* y *Tubifex tubifex* expuestos a cadmio y níquel en matriz acuosa, en relación a *H. azteca*.

Para el cobre se encontraron valores de CL50<sub>96h</sub> similares entre *H. curvispina* (este estudio) e *H. azteca*, siendo sus valores de 0,116 y 0,21 mg Cu.L<sup>-1</sup> (Milani *et al.*, 2003),

respectivamente. Borgmann *et al.* (2005) obtuvieron un valor de CL50 para *H. azteca* (siete días de exposición) de 0,90 mg Cu.L<sup>-1</sup>. En la Tabla IV.9 se muestra una comparación de sensibilidades al cobre para distintas especies ampliamente utilizadas en evaluaciones de contaminación en agua y sedimentos, teniendo en cuenta la dureza del agua como factor modificador de respuesta.

**Tabla IV.9: Comparación de sensibilidades (CL/IC<sub>50</sub> en mg.L<sup>-1</sup>) para el cobre en relación a *H. curvispina***

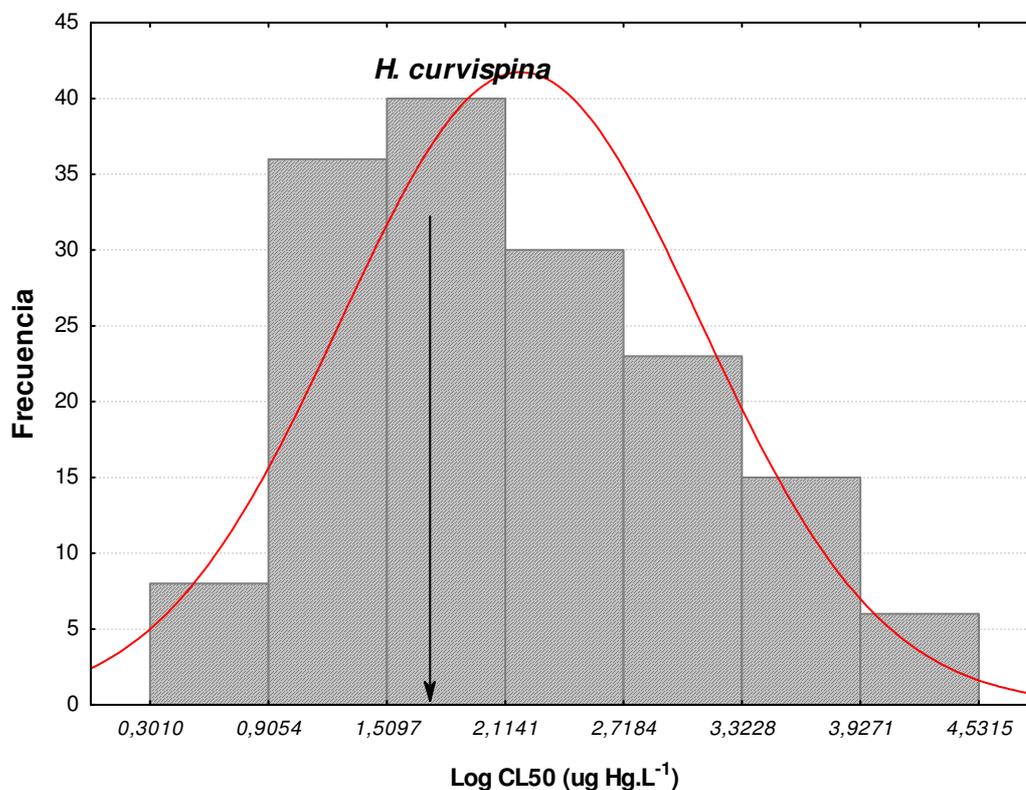
	CL <sub>50</sub>	Duración (h)	Dureza mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup>	Referencia
<i>H. curvispina</i>	0.11	96	80-100	Este trabajo
<i>H. azteca</i>	0,21	96	120-140	Milani 2003
<i>H. azteca</i>	0,04	96	40	Collyard 1994
<i>H. azteca</i>	0,05	96	*	Suedel 1996
<i>Gammarus pulex</i>	0,133	96	180	Naddi 2002
<i>Gammarus pulex</i>	0,24	96	*	Stephenson 1983
<i>Gammarus pulex</i>	0,32	96	*	Bascombe 1991
<i>Daphnia magna</i>	0,057	48	180	Naddi 2002
<i>Daphnia magna</i>	0,39	48	Dura	Guilhermino 2000
<i>Daphnia similis</i>	0,032	48	48	Oliveira-Filho 2004
<i>Ceriodapnia dubia</i>	0,016	48	180	Naddi 2002
<i>R. subcapitata</i>	0,34	96	*	Oliveira-Filho 2004
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,035	96	180	Naddi 2002
<i>Pimephales promelas</i>	0,5	96	180	Naddi 2002

\* no indicado

En relación al mercurio, Borgmann *et al.* (2005) determinaron valores de CL50 para *H. azteca* de 0,002 mg Hg.L<sup>-1</sup> en siete días de exposición en agua de dureza moderada, dicho valor corresponde a la concentración efectiva al tiempo final de exposición en condiciones estáticas. En el presente trabajo se encontraron valores de CL50<sub>96h</sub>, para *H. curvispina*, un orden de magnitud mayor que el de *H. azteca*; diferentes factores como el tiempo, la forma de exposición y el tipo de agua utilizada pueden explicar las diferencias.

Comparando la sensibilidad al mercurio de *H. curvispina* con la de otros invertebrados, esta especie resultó menos sensible que los anfípodos *H. azteca* y *Gammarus sp.*, encontrándose valores de CL50 un orden de magnitud menores para dichas especies (Stooff, 1983; Borgmann *et al.*, 2005); sin embargo Reish (1993) encuentra valores de CL50 (0,02 y 0,08 mg Hg.L<sup>-1</sup>) para otras dos especies de gamáridos (anfípodos) similares a las encontradas para *H. curvispina* en este trabajo (0,04 mg Hg.L<sup>-1</sup>). Los valores encontrados para diferentes especies de crustáceos, principalmente organismos representativos de la columna de agua como cladóceros (*Daphnia magna*), copépodos (*Acartia sp.*) y camarones, son comparables con los de *H. curvispina*.

Cuando se compara la sensibilidad al mercurio para *H. curvispina* con respecto a los datos existentes para invertebrados (Figura VI.4), el logaritmo decimal de las CL50<sub>96h</sub> para *H. curvispina* coincide con el intervalo de mayor frecuencia, encontrándose el mismo hacia la izquierda en la distribución.



**Figura IV.4: Distribución de sensibilidades al mercurio para el logaritmo de las CL50<sub>96h</sub> para diferentes especies de invertebrados (base de datos electrónica USEPA ECOTOX). La flecha indica el logaritmo CL50<sub>96h</sub> para *H. curvispina*.**

Los resultados de los efectos tóxicos del glifosato encontrados en la literatura para la fauna acuática son muy variables. La toxicidad aguda del Roundup para invertebrados bentónicos se encuentra en un rango entre no tóxico hasta moderadamente tóxico (Giesy *et al.*, 2000). Tsui & Chu encontraron valores de CL50 para *Ceriodaphnia dubia* y *H. azteca* de 5,7 y 1,5 mg.L<sup>-1</sup> del formulado Roundup respectivamente. Por otro lado Achiorno *et al.* (2008) encontraron valores de 1,7 mg.L<sup>-1</sup> para la especie de nematomorfo *Chordodes nobilii*. La sensibilidad de *H. curvispina* al glifosato obtenida en este trabajo (formulado Roundup) expresada como CL50<sub>48h</sub> resultó un orden de magnitud mayor a la publicada para *H. azteca* (Tsui & Chu, 2004). Por otro lado, Folmar *et al.* (1979) y Mayer (1986) encuentran valores de CL50<sub>96h</sub> para el anfípodo *Gammarus sp.* del mismo orden de magnitud que para *H. curvispina*. Tsui *et al.*, (2003) observó una sensibilidad menor para los crustáceos

estudiados en relación a ciertas especies de bacterias y protozoos, coincidiendo la sensibilidad de *H. curvispina* al formulado con la de estos últimos.

### IV.3.2 Ejercicio interlaboratorios con tóxicos de referencia

Una vez finalizados los ensayos con muestras ciegas se puso en conocimiento el tóxico y la concentración correspondientes a cada muestra recibida. Los valores de parámetros fisicoquímicos medidos en los ensayos estuvieron dentro de los aceptables en ambos laboratorios. Los tóxicos y concentraciones de las muestras ciegas se describen en la Tabla IV.10.

**Tabla IV.10: Descripción de las muestras ciegas recibidas, tóxico de referencia y concentraciones (mg.L<sup>-1</sup>) de M1-M6**

	Muestras ciegas					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Tóxico	CINa	SDS <sup>1</sup>	SDS <sup>2</sup>	Agua	Zn	Cr
Concentración mg/L	2 x10 <sup>-3</sup>	100	150	--	25	50

Las concentraciones letales medias (CL50) fueron calculadas para 96 h; en todos los ensayos las CL50 fueron significativas. Las CL50<sub>96h</sub> obtenidas se muestran en la Tabla IV.11 con sus límites de confianza. El análisis de los resultados (Tabla IV.12) se realizó a partir de la comparación de los valores de CL50 obtenidos en el presente estudio y los obtenidos por el laboratorio de la Universidad Nacional de Luján, (Giusto, Ferrari, Salibián, comunicación personal)

**Tabla IV.11: Valores de CL50<sub>96h</sub> expresados en mg.L<sup>-1</sup> y supervivencia (%) en los controles de los ensayos con tóxicos de referencia.** LCI, LCS: límites de confianza al 95% inferior y superior.

	CL50 <sub>96h</sub>	LCI	LCS	Supervivencia %
<b>NaCl</b>	6,16x10 <sup>3</sup>	5,7x10 <sup>3</sup>	6,6x10 <sup>3</sup>	100
<b>SDS<sup>1</sup></b>	49,43	45,73	52,89	100
<b>SDS<sup>2</sup></b>	14,25	11,65	16,95	98
<b>Cr(VI)</b>	0,20	0,15	0,28	100
<b>Zn(II)</b>	2,36	2,17	2,54	100

**Tabla IV.12: Variabilidad entre laboratorios para las muestras del ejercicio interlaboratorios.** Promedios CL50 (mg.L<sup>-1</sup>); DS: desvío estándar; CV: coeficiente de variación (%).

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
<b>Promedio</b>	4.860	38,87	11,39	--	0,37	2,27
<b>DS</b>	1.838	14,9	4,0	--	0,25	0,12
<b>CV (%)</b>	37,8	38,4	35,5	--	66,0	5,28

La supervivencia tanto en los controles negativos como en la muestra M4 (agua de red) fue siempre igual o mayor al 90% con un CV de 1,57% entre laboratorios. No se encontraron diferencias significativas en las respuestas para ambos laboratorios encontrándose dentro de los criterios de aceptabilidad de los bioensayos.

La sensibilidad de *H. curvispina* fue menor en el laboratorio A para casi todos los tóxicos ensayados, con excepción del cromo. Los resultados de la prueba de *t* para muestras pareadas no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los dos laboratorios para las CL50<sub>96h</sub>. La Tabla IV.12 muestra la variabilidad asociada a cada muestra entre laboratorios. Los valores de CL50 para las muestras M1, M2 y M3 fueron superiores en un factor de 1,7 veces en el laboratorio A; al respecto se deben tener en cuenta las diferencias en el tipo de agua de dilución utilizada por cada laboratorio. Los valores de CL50 correspondientes a los ensayos con zinc fueron muy similares entre ambos laboratorios, observándose una variación menor al 10%. Los valores de CL50 obtenidos en los ensayos con cromo difirieron en un factor de 2,75 veces entre laboratorios.

Se realizaron las comparaciones de las rectas de regresión de cada laboratorio para las muestras M5 (Cr) y M6 (Zn). La comparación de curvas C-R para el cromo y zinc en ambos laboratorios se muestran en las Figuras IV.5 y IV.6 respectivamente. Las pendientes mostraron diferencias significativas para ambos metales entre laboratorios (Cr:  $p = 0,0217$ ; Zn:  $p = 0,0109$ ). Para el zinc los anfípodos correspondientes a los dos laboratorios tuvieron sensibilidades iguales (valores de CL50), pero los organismos del laboratorio B exhibieron mayor sensibilidad que los del laboratorio A (Figura IV.6), considerando los valores de la pendiente de la curva C-R como el intervalo de sensibilidad a un compuesto químico para los organismos ensayados (Rand, 1995). Para el cromo, la sensibilidad fue mayor en el laboratorio A, sin embargo los intervalos de sensibilidad para ambos laboratorios no presentan grandes diferencias como en el caso del zinc.

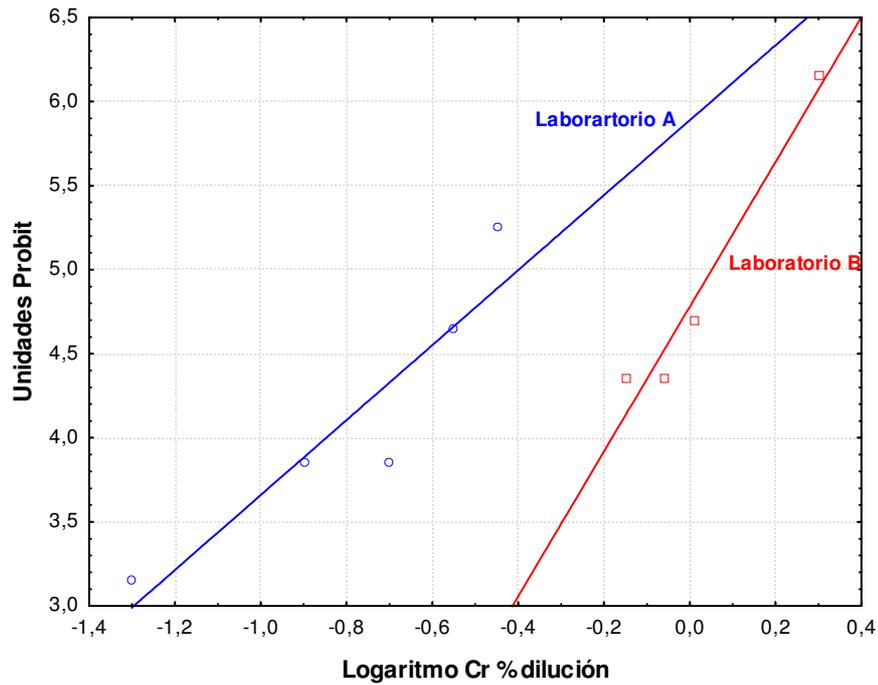


Figura IV.5: Comparación de curvas C-R para el Cr entre los ensayos en los laboratorios A y B.

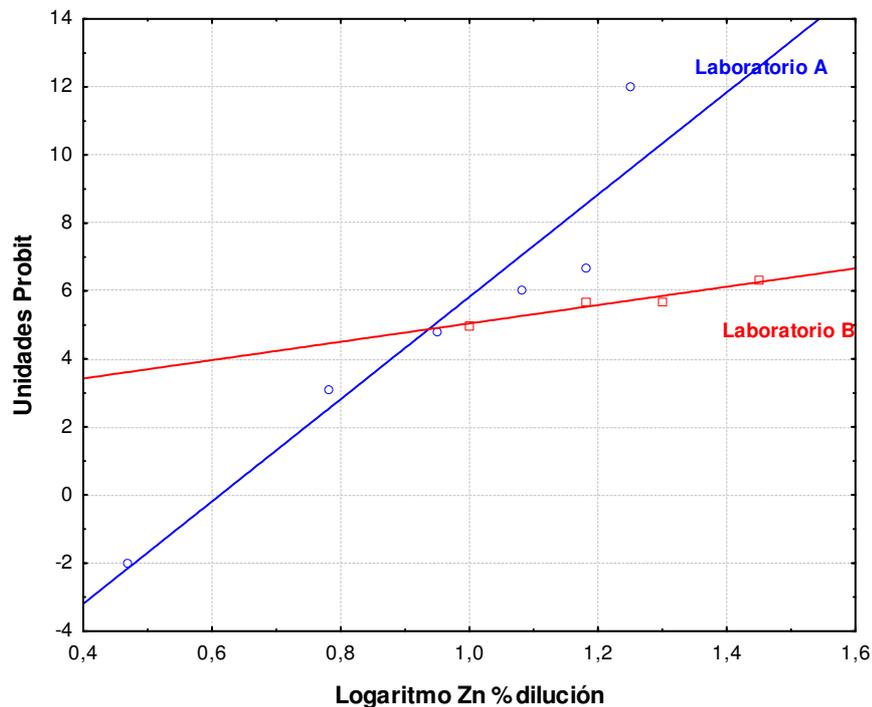


Figura IV.6: Comparación de curvas C-R para el Zn entre los ensayos en los laboratorios A y B.

Como se mencionó anteriormente, son muchos los factores que pueden afectar la precisión de los ensayos de toxicidad, entre ellos se encuentran la fuente de organismos prueba, el

tipo de alimentación, la manipulación y la calidad del agua sobrenadante (Burton *et al.*, 1996). En el presente estudio los individuos de *H. curvispina* utilizados en bioensayos de toxicidad en cada laboratorio fueron obtenidos de cultivos diferentes, propios de cada integrante. Retomando lo expuesto en el Capítulo anterior, estas diferencias se minimizarían incorporando al protocolo una metodología estandarizada de cultivo. Por otra parte los valores de CL50<sub>96h</sub> determinados por los laboratorios participantes del ejercicio interlaboratorios estuvieron dentro de los mismos órdenes de magnitud para cada tóxico en particular, valores esperables para este tipo de pruebas. Estas diferencias podrían ser explicadas teniendo en cuenta que los laboratorios intervinientes utilizaron en las pruebas de toxicidad de tres muestras ciegas (M1, M2 y M3) agua de dilución de distinta dureza.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos asociados a variaciones en los resultados de ensayos de toxicidad entre laboratorios, expresadas como CV, difieren también de acuerdo a la especie utilizada en las pruebas de toxicidad y los puntos finales evaluados. Por ejemplo, Ronco *et al.* (2000), en un estudio de intercalibración con 30 muestras ciegas y una batería de bioensayos de toxicidad con cinco especies, observaron que los bioensayos con el celenterado *Hydra attenuata* tuvieron la menor variabilidad entre laboratorios para la mayoría de los tóxicos cuando se evaluaban respuestas letales, seguida por el bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), ambos considerados de fácil ejecución y con buenas respuestas para efectos letales y subletales. A su vez un estudio de la Agencia Ambiental de EEUU de Norteamérica, realizado con las especies *Pimephales promelas*, *Daphnia magna* y *Mysidopsis bahia*, mostró CVs promedios de 27,8; 48,5 y 36 respectivamente pudiendo variar entre 10 y 120% de acuerdo a la especie y el tóxico de referencia ensayado (USEPA, 1993). En estudios de intercalibración realizados con *H. azteca* considerando respuestas letales en bioensayos con agua, se encontraron CVs del 23% para el KCl (Burton *et al.*, 1996) y diferencias de hasta 5 veces en las CL50<sub>96h</sub> para el cadmio (Buy *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta que el ejercicio con *H. curvispina* de este estudio se realizó solamente entre dos laboratorios y con seis muestras ciegas, la variabilidad encontrada se puede considerar aceptable y los resultados obtenidos resultan útiles como base para el estudio de la sensibilidad de la especie y su empleo en monitoreos de calidad de sedimentos.

Los valores de CL50 para *H. curvispina* determinados en este trabajo fueron un orden de magnitud mayores para el Zinc que los publicados para *H. azteca* (Collyard *et al.*, 1994; Borgmann *et al.*, 2005); mientras que para el Cromo las CL50 fueron del mismo orden para las dos especies de anfípodos (Milani *et al.*, 2003; Borgmann *et al.*, 2005). Se compararon las sensibilidades a partir de las CL50 de *H. curvispina* con la de otros invertebrados

acuáticos utilizando una base de datos electrónica de EPA (USEPA ECOTOX), encontrándose que esta especie es más sensible a los metales Cromo y Zinc que otras especies de anfípodos, quironómicos (*Chironomus riparius* y *Ch. tentans*) y *Tubifex tubifex*, comúnmente utilizadas en evaluaciones de contaminación de sedimentos. Por otro lado, los valores de CL50 para ambos metales fueron un orden de magnitud mayor en *H. curvispina* que en los cladóceros *Daphnia sp* y *Ceriodaphnia dubia*.

A partir de los resultados de CL50 para los cuatro metales estudiados en este trabajo se considera que *H. curvispina* presenta la siguiente tendencia de sensibilidad: Hg > Cu > Cr > Zn. Las tendencias de sensibilidad encontradas en otros crustáceos como los cladóceros *Daphnia magna* son iguales a las de *H. curvispina*. Las concentraciones letales de los metales cromo, mercurio y zinc para juveniles de *H. curvispina* obtenidas en este trabajo conforman una línea de base sobre el conocimiento de la sensibilidad a dichos tóxicos para la especie nativa estudiada.

## CAPÍTULO V

### **Evaluación ecotoxicológica de sedimentos con adiciones de mercurio y la influencia de la matriz sobre su biodisponibilidad con *H. curvispina* como organismo prueba**

#### **V.1 Introducción**

##### **V.1.1 Sedimentos adicionados**

Para evaluar la toxicidad de contaminantes asociada a sedimentos de fondo, se pueden realizar bioensayos de toxicidad en fase acuosa (p. ej: agua de poro, lixiviados, eluriados) o sobre el sedimento completo, siendo ésta última opción la más realista, ya que permite conocer diversas rutas de exposición a los contaminantes para los organismos bentónicos. Los sedimentos contaminados son aquellos que han incorporado sustancias tóxicas provenientes de fuentes antrópicas a lo largo del tiempo. Los bioensayos de toxicidad con sedimentos naturales presentan beneficios y limitaciones dependiendo de los objetivos. Generalmente presentan mezclas de contaminantes, cuya biodisponibilidad viene determinada por diversos factores fisicoquímicos prevalentes en cada sitio. Por otro lado, también puede interesar evaluar las relaciones concentración-respuesta de un contaminante contenido en el sedimento sobre organismos prueba o determinar los factores fisicoquímicos de la matriz y la forma en que se modifica la biodisponibilidad de un compuesto.

Para establecer la sensibilidad de una especie prueba a un contaminante en particular del sedimento, es necesario obtener una relación concentración-respuesta (C-R) para determinado intervalo de concentración (Luoma & Ho, 1993). Si bien pueden existir sedimentos naturales conteniendo un único contaminante en concentraciones a las que se asocian efectos adversos, la mayoría de los sedimentos contaminados presentan mezclas de compuestos (p.ej.:metales pesados y HAPs), que aún en bajas concentraciones pueden contribuir a aumentar la toxicidad de un contaminante en particular (Borgmann & Norwood, 1999), interfiriendo en la determinación de la relación concentración-efecto del compuesto

tóxico de interés (Simpson *et al.*, 2004). Para poder desarrollar relaciones C-R, diferenciar rutas de exposición y estudiar los factores geoquímicos que regulan la toxicidad, se pueden preparar en laboratorio sedimentos con un gradiente de concentración del contaminante (Sibley *et al.*, 1996; Berry *et al.*, 1996; USEPA, 2001; Batley *et al.*, 2002). Los sedimentos contaminados artificialmente (en adelante: sedimentos adicionados) se preparan por adición de contaminantes a un sedimento natural o artificial en un intervalo de concentraciones determinado.

Existen algunas guías para la preparación de sedimentos adicionados (EC, 1995; USEPA, 2001), pero no se dispone de un protocolo establecido para la forma de adicionar el contaminante, el tipo de sedimento a utilizar, o los tiempos necesarios para lograr el equilibrio del compuesto en el sedimento. Existen numerosos estudios en los cuales se realizan adiciones en sedimentos naturales procedentes de sitios no contaminados (generalmente de referencia), con metales, principalmente cobre, cadmio y zinc (Di Toro *et al.*, 1992; De Witt *et al.*, 1996; Milani *et al.*, 2003; King *et al.* 2004; Simpson *et al.*, 2004; Giusto & Ferrari, 2008) y compuestos orgánicos como hidrocarburos y plaguicidas (Sormunen, 2008). Por otra parte, para la realización de bioensayos con sedimentos adicionados, se puede utilizar una matriz formulada artificialmente, lo cual presenta algunas ventajas sobre las matrices naturales como la eliminación de fauna indígena (Reynoldson *et al.*, 1994), el control de las variaciones en las características fisicoquímicas del sedimento (Besser *et al.*, 2003), además de proporcionar métodos consistentes para evaluar el destino de los contaminantes en el sedimento (ASTM, 1999; USEPA, 2000). A su vez, los sedimentos artificiales formulados en laboratorio están libres de contaminantes y son reproducibles, lo cual permite la comparación entre resultados, a diferencia de los naturales que varían en su composición, tanto espacial como temporalmente (Naylor & Rodrigues, 1995; Harrahy & Claments, 1997).

Se han desarrollado matrices formuladas para ser utilizadas como sedimentos control o de referencia (Burton *et al.*, 1994; Suedel & Rodgers, 1994; Kemble *et al.*, 1999), o sedimento de dilución (Suedel *et al.*, 1996) para ser utilizados en bioensayos de toxicidad con sedimento completo, verificándose en ellos la supervivencia y crecimiento normal de las especies comúnmente utilizadas como organismos prueba de agua dulce como *Hyalella azteca* (Kemble *et al.*, 1999) y *Chironomus riparius* (Naylor & Rodrigues, 1995; OECD, 2004b). Los sedimentos formulados también son de gran utilidad para estudiar las respuestas letales y subletales para ciertos contaminantes (p. ej.: metales pesados) ya que permiten modificar variables que modifican su biodisponibilidad, como el tipo y cantidad de materia orgánica y sulfuros (Besser *et al.*, 2003). Este tipo de estudios permite desarrollar

niveles de calidad de sedimentos teniendo en cuenta la biodisponibilidad en relación a las distintas características del mismo (Roman *et al.*, 2007).

Existen numerosos estudios sobre las características que afectan la biodisponibilidad de ciertos metales, como cobre, cadmio, níquel, plomo y zinc, en relación a la toxicidad sobre invertebrados bentónicos para el desarrollo de niveles de referencia y criterios de calidad de sedimentos (Di Toro *et al.*, 1991; Berry *et al.*, 1996; Besser *et al.*, 1996; Besser *et al.*, 2003; USEPA, 2005); sin embargo ese tipo de información para metales como el mercurio es escasa. En el presente trabajo se seleccionó al mercurio para el estudio de su toxicidad y biodisponibilidad en matrices sólidas sobre *Hyalella curvispina* en relación al contenido de materia orgánica y su relación con los niveles guías disponibles para dicho elemento.

### **V.1.2 Antecedentes generales del mercurio como contaminante**

Dentro de los metales pesados el mercurio es un elemento no esencial para los organismos y no se conoce ninguna función metabólica asociada al mismo. Posee un elevado potencial tóxico, con muy lenta cinética de eliminación y alto potencial de bioacumulación (Galvin, 2003). El mayor desafío relacionado con el estudio de los riesgos asociados a la contaminación por mercurio reside en el conocimiento de los procesos de especiación que presenta este metal.

El mercurio ha sido utilizado por la humanidad desde hace más de 2000 años en numerosas aplicaciones, y las emisiones desde fuentes antrópicas han causado la dispersión global de este metal, llegando a áreas remotas (Fitzgerald *et al.*, 1998). El cinabrio (sulfuro de mercurio), que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre, se utilizó como pigmento rojo antes del descubrimiento de los procesos de refinamiento del mineral para la obtención de mercurio elemental (Wiener *et al.*, 2003). Históricamente, las cinco áreas principales de extracción de cinabrio fueron el distrito de Almadén en España, Idrija (Eslovenia), Monte Amiata (Italia), Huancavelica (Perú) y el estado de California (Estados Unidos) (Ferrara, 1999). En todo el mundo se produjeron alrededor de un millón de toneladas de mercurio metálico hasta el año 2000 (Hylander & Meili, 2003).

#### **V.1.2 a. Usos y fuentes de contaminación de mercurio a nivel global**

##### **Usos**

En etapas previas a la revolución industrial, el mercurio se utilizaba en la extracción de oro; a partir de 1800 se comenzó a utilizar en industrias de cloro álcali, manufactura de

instrumentos electrónicos y antisépticos medicinales; desde 1900 ha sido empleado en la industria farmacéutica, fungicidas para la actividad agrícola, en la industria papelera y la producción de plástico. La utilización de mercurio en usos industriales tiene una larga historia, principalmente en industrias de cloro álcali y plantas de celulosa y papel (Paine, 1994); una de las emisiones industriales más conocidas fue la de Minamata, Japón, entre los años '50 y '60, la cual causó el envenenamiento de cientos de personas con mercurio por el consumo de pescado y mariscos con elevado contenido del metal en la zona. A partir de ese momento los usos industriales del mercurio fueron disminuyendo debido a la preocupación creciente por los efectos tóxicos que este metal presenta (Wiener *et al.*, 2003; Hylander & Meili, 2003). Los usos más recientes incluyen la manufactura de tubos fluorescentes, halogenuros metálicos, amalgamas dentales, manufactura de pinturas y minería (Eisler, 2006).

### **Fuentes**

El mercurio ingresa al ambiente a partir de fuentes tanto naturales como antrópicas. Las fuentes naturales incluyen volcanes, volatilización desde los océanos y suelos geológicos. El mayor porcentaje de mercurio se encuentra en los sedimentos oceánicos. El mercurio ingresa al ambiente desde fuentes naturales directamente en forma gaseosa, en la lava (actividad volcánica terrestre y oceánica) y en solución o en forma particulada. El ciclo global del mercurio involucra emisiones gaseosas del elemento desde la corteza terrestre y por evaporación desde cuerpos de agua; mediante transporte atmosférico y deposición retorna a la tierra y a los cuerpos de agua (Eisler, 2006). La magnitud de las emisiones desde fuentes naturales de mercurio depende de varios factores tales como el tipo de roca y su edad, el tipo de alteraciones hidrotérmicas, la presencia de actividad geotérmica y la estructura geológica; mientras que los parámetros meteorológicos como la luz, temperatura y precipitaciones marcan la tendencia diaria de dichas emisiones (Gustin, 2003).

Las fuentes antrópicas de mercurio incluyen quema de combustibles fósiles, gas natural y madera; producción minera; agroquímicos; volatilización desde pinturas y fungicidas, manufactura y disposición de baterías. Las emisiones globales de mercurio a la atmósfera generadas por la actividad antrópica se estiman en 2000 toneladas por año (UNEP, 2008). La combustión de carbón es la principal fuente de estas emisiones. Otras fuentes importantes son la amalgamación del oro lo cual contribuyó en 300 toneladas en el año 1995 (Lacerda, 1997), y las emisiones de la industria de cloro álcali (Sznoppek & Goonan, 2000). Existen numerosos estudios que identifican la deposición atmosférica como la principal fuente de mercurio en los sistemas acuáticos alejados de las fuentes puntuales (Morel *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1998; Marcovecchio *et al.*, 2001). Durante los últimos 150 años los

ingresos de mercurio a la atmósfera se triplicaron (Morel *et al.*, 1998) y se estima que la cantidad total de mercurio en el ambiente es 2 a 4 veces mayor que en los tiempos pre-industriales (UNEP, 2008)

### V.1.2 b. Ciclo biogeoquímico

En el ciclo del mercurio intervienen los cuatro compartimentos ambientales: atmosférico, terrestre, acuático y biótico (Figura V.1), a escala global los procesos atmosféricos dominan el transporte de mercurio desde las fuentes a los sumideros. Este elemento puede tomar diferentes estados de oxidación, tres de los cuales son importantes para explicar el comportamiento en el ambiente:

- Mercurio elemental o metálico ( $\text{Hg}^0$ ): líquido y volátil a temperatura ambiente, es la forma dominante en el aire, poco soluble en agua.
- Mercurio inorgánico divalente ( $\text{Hg}^{+2}$ ): forma sales con aniones y se ioniza fácilmente, las sales de mercurio son muy solubles en agua y en la atmósfera se asocia al material particulado y al agua.
- Metilmercurio: es la forma de mercurio orgánico más importante. El monometilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) es soluble en agua y muy estable debido al enlace covalente C-Hg; el dimetilmercurio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) es menos estable y menos soluble que el monometilmercurio.

La especiación del mercurio es una de las variables más importantes que influyen en la toxicidad de este metal, aunque compleja de cuantificar en ambientes naturales (Wiener *et al.*, 2003).

La especiación del mercurio en ambientes acuáticos está influenciada por el pH, potencial redox, ligandos orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, el  $\text{HgCl}_2$  en solución puede formar las siguientes especies:  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Hg}^{+2}$ ;  $\text{Hg}(\text{OH})^-$ ;  $\text{HgCl}_3$ ,  $\text{HgCl}_4^{-2}$ . En su forma oxidada habitual Hg(II), causa efectos agudos, principalmente porque a pH fisiológico es muy soluble y no es precipitado por ninguno de los iones presentes en los fluidos biológicos (Baran, 1995). El Hg(II) puede ser metilado mediante procesos bióticos o abióticos dando lugar principalmente a las especies organomercuriales monometilmercurio  $(\text{CH}_3)\text{Hg}^+$  y dimetilmercurio  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ; esta transformación es una de las más importantes desde el punto de vista toxicológico ya que en esta forma aumenta su biodisponibilidad y toxicidad, principalmente la del catión  $(\text{CH}_3)\text{Hg}^+$  el cual posee una elevada estabilidad y alta solubilidad en lípidos y sus propiedades iónicas le facilitan el ingreso por las membranas celulares de los organismos (Wiener *et al.*, 2003; Eisler, 2006).

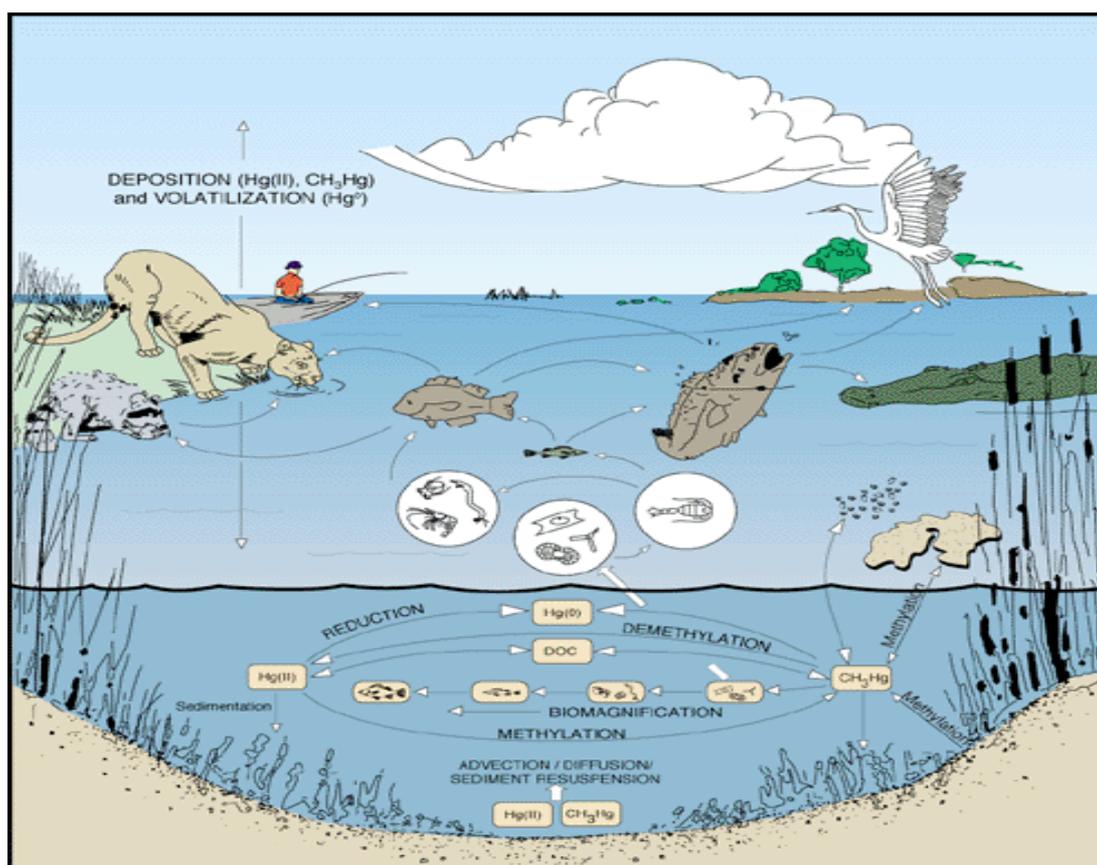


Figura V.1: Esquema del ciclo geoquímico del mercurio en ambientes acuáticos (tomado de Wiener *et al.*, 2003).

La metilación microbiana es la dominante en el ambiente, los principales agentes en los ambientes acuáticos son las bacterias sulfato reductoras, y el sitio de metilación más importante es la interfase óxica-anóxica de los sedimentos y humedales. Los procesos de metilación también ocurren en la columna de agua, en el perifiton y en raíces de plantas sumergidas, pero cuantitativamente estos sitios son de menor importancia que el sedimento (Wright & Welbourn, 2002; Wiener *et al.* 2003).

### V.1.2 c. Biodisponibilidad del mercurio en ambientes acuáticos

Los organismos acuáticos pueden captar metilmercurio desde el agua, el sedimento y el alimento; esta forma es bioacumulable debido a que posee una tasa de eliminación muy baja en relación a la de ingreso. De esta forma el mercurio es biomagnificado en la cadena trófica (Marcovecchio *et al.*, 1986a, 2001). La mayor parte del mercurio en aguas y sedimentos se encuentra en forma inorgánica mientras que el mercurio acumulado en peces y en organismos de niveles superiores de la cadena trófica es casi completamente metilmercurio alcanzando al 95% de la totalidad del metal (Bloom, 1992; Watras *et al.*, 1998; Mason *et al.*, 2000).

La incorporación de Hg por los organismos está influenciada en última instancia por la concentración y biodisponibilidad del metal en el agua. Las especies químicas que se encuentran en la columna de agua son principalmente Hg (II) y metilmercurio, y los factores que influyen en su especiación son los hidróxidos, cloruros, sulfuros y carbono orgánico disuelto (Reddy & Aiken, 2001; Haitzer *et al.*, 2003; Balogh *et al.*, 2008). Por ejemplo la unión de Hg (II) a la materia orgánica disuelta disminuye la biodisponibilidad del Hg (II) para el fitoplancton (Gorski *et al.*, 2006), a su vez también se reduce su bioacumulación en la cadena trófica ya que disminuye la biodisponibilidad del Hg(II) para la metilación microbiana (Benoit *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2007). Gorski *et al.* (2008) encontraron que el aumento en el carbono orgánico disuelto (COD) (>5-20 mg.L<sup>-1</sup>) disminuye el factor de bioconcentración en el fitoplancton, sin embargo cuando la concentración de COD es menor (<5 mg.L<sup>-1</sup>) la bioconcentración es variable indicando que otros ligandos estarían determinando la biodisponibilidad del mercurio.

La acumulación de mercurio en sedimentos se genera por procesos de sedimentación del material particulado en suspensión que se halla en los ambientes acuáticos. Existen equilibrios de redisolución del metal, incorporándose a la fase acuosa dependiendo de las condiciones ambientales del sistema en particular, tales como pH, potencial redox, concentración de óxidos de Fe y Mn, contenido de materia orgánica y sulfuros (Mason & Lawrence, 1999; Zhong & Wang, 2006; Machado *et al.*, 2008), además de la granulometría del material y su capacidad para unirse al metal (Boszke *et al.*, 2004). Sin embargo la materia orgánica y los sulfuros son los principales sitios de unión de este metal en los sedimentos (Boszke *et al.*, 2003). A su vez, estos factores influyen en la biodisponibilidad del mercurio; por ejemplo Benoit *et al.* (1999) encontraron correlaciones negativas entre el metilmercurio y sulfuros, lo que indica que estos últimos disminuyen la biodisponibilidad del mercurio para las bacterias sulfato reductoras. Zhong & Wang (2006) en estudios en laboratorio con invertebrados bentónicos observaron que la fracción mayormente biodisponible para estos organismos se corresponde con el mercurio unido a los óxidos de Fe y Mn, mientras que la fracción menos biodisponible corresponde al metal unido a los ácidos húmicos.

En los ambientes acuáticos, los invertebrados bentónicos pueden consumir grandes cantidades de sedimento y de esa forma acumular mercurio (Wang *et al.*, 1998). Este hecho es muy importante desde el punto de vista ecológico, si se considera que los invertebrados bentónicos son parte de la dieta de peces, crustáceos (cangrejos) y aves, y que las concentraciones más elevadas de mercurio en los ambientes acuático se encuentran en los sedimentos (Bisinoti *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). El metilmercurio es acumulado en el tejido muscular de peces y tiene una vida media de hasta 170 días. A su vez los peces son

más resistentes al metilmercurio que los organismos de niveles superiores como aves y mamíferos incluido el hombre, para los cuales este compuesto posee efectos neurotóxicos. Por lo tanto la biomagnificación del mercurio desde invertebrados hasta los niveles tróficos superiores es muy importante y evidencia un gran riesgo ambiental y para la salud humana. Un ejemplo claro de esto fue el episodio ocurrido en Japón el cual dio origen al nombre de “enfermedad de Minamata” para el síndrome neurológico grave y permanente causado por un envenenamiento con mercurio por consumo de peces con elevado contenido de metilmercurio en sus tejidos.

### V.1.3 Antecedentes de contaminación con mercurio a nivel regional

Existen numerosos antecedentes que resaltan la importancia de la contaminación por mercurio en ambientes acuáticos de nuestro país, ya sea concentraciones en agua, sedimentos y en la biota (peces, moluscos bivalvos, mamíferos) (Marcovecchio *et al.*, 1986b; Marcovecchio & Moreno, 1993; Ferrer *et al.*, 1996,2000; Ribeiro Guevara *et al.*, 2004; Lomniczi *et al.*, 2004; SMAyDS, 2006). La Tabla V.1 muestra una comparación de valores de mercurio total en sedimentos de distintos ecosistemas acuáticos de nuestro país determinados recientemente, además de datos provenientes de zonas muy contaminadas como la cuenca del Río Amazonas y la Ría de Aveiro en Portugal.

Se consideran sedimentos no contaminados con mercurio aquellos que presentan concentraciones entre 0,03 y 0,2 mg.Kg<sup>-1</sup> (Salomon & Forstner, 1985), tomando como referencia dichos valores, la mayoría de los ambientes mencionados en la Tabla V.1 se deben considerar contaminados por dicho metal alcanzando concentraciones tan elevadas como 6,8-9 mg.Kg<sup>-1</sup>.

Particularmente en el estuario de Bahía Blanca, los valores presentados en la Tabla V.1 corresponden al período 2001-2005, siendo dos órdenes de magnitud menores a los correspondientes al período 1982-1988 (De Marco *et al.*, 2006) lo que sugiere una modificación en los procesos industriales y en las metodologías de tratamiento de desechos de efluentes urbanos en la zona, además de remoción de sedimentos por obras de dragado de la zona portuaria. Por otro lado, los valores de mercurio detectados en sedimentos de la Bahía de Samborombón en ambos períodos se mantuvieron elevados; sin embargo se encontraron grandes diferencias entre las concentraciones de mercurio en la fase abiótica (p.ej.: 10 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> en peso seco) comparados con la concentración en tejido de peces (p.ej.: <1 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> en peso húmedo), lo cual sugiere la existencia de un mecanismo de

inmovilización del metal desde los sedimentos en la bahía (Marcovecchio, 2004; De Marco *et al.*, 2006).

**Tabla V.1: Concentraciones de mercurio total en sedimentos de distintos ecosistemas acuáticos. Las concentraciones se refieren a peso seco.**

Sitio	Hg Total en sedimentos mg.Kg <sup>-1</sup>	Referencia
Estuario de Bahía Blanca, Buenos Aires	0,098	De Marco <i>et al.</i> 2006
Laguna de Mar Chiquita, Buenos Aires	0,076	De Marco <i>et al.</i> 2006
Bahía de Samborombón, Buenos Aires	9,44	De Marco <i>et al.</i> 2006
Río Negro (planta de cloro álcali)	0,8-3,4	Arribére <i>et al.</i> 2003
Lago Moreno, Río Negro	7,0	Ribeiro-Guevara <i>et al.</i> 2005
Arroyos zona urbana La Plata, Bs As.	0,51-1,2	Ronco <i>et al.</i> 2001
Afluentes Río Paraná, Argentina	0,34-5,7	SMAyDS, 2006
Puerto Montevideo, Uruguay	0,3-1,3	Muniz <i>et al.</i> 2004
Riachuelo, Buenos Aires	1,9	Este estudio
Canal Oeste, Ensenada	6,8	Este estudio
Río Negro (Amazonas), Brasil	70-270	Bisinoti <i>et al.</i> 2007
Bahía de Guanabara, Brasil	7	Machado <i>et al.</i> 2008
Ría de Aveiro, Portugal	19,2	Pereira <i>et al.</i> 2008

Si bien los valores de mercurio total en sedimentos correspondientes a los ríos de la cuenca del Amazonas son hasta dos órdenes de magnitud superiores a los publicados para cuerpos de agua en nuestro país, éstos últimos superan en la mayoría de los casos el nivel guía para calidad de sedimentos de la norma Canadiense (0,17 mg Hg.Kg<sup>-1</sup>) (EC, 2002) y el valor de referencia de la norma Holandesa (0,3 mg Hg.Kg<sup>-1</sup>) (IADC/CEDA, 1997). Como se mencionó anteriormente en el Capítulo I en nuestro país no existen niveles guía para calidad de sedimentos. Por lo tanto es necesario generar estudios sobre los niveles de contaminación por mercurio de los sistemas acuáticos y conocer los efectos que generan en la biota asociada a los sedimentos de fondo.

## V.2 Metodología

Se realizaron bioensayos de toxicidad con sedimentos completos adicionados con mercurio utilizando *H. curvispina* como organismo prueba. A continuación se describe la metodología empleada para la preparación de sedimentos formulados, la caracterización de sedimentos naturales y la ejecución de pruebas de toxicidad con estos materiales.

### V.2.1 Sedimentos utilizados en los bioensayos

Los bioensayos adicionados con mercurio se realizaron utilizando dos tipos de matrices: sedimento formulado en laboratorio y sedimento natural obtenido en el arroyo Juan Blanco (Provincia de Buenos Aires).

El *sedimento formulado en laboratorio* se realizó siguiendo el protocolo N° 218 de OECD, cuya composición es la siguiente: 75% de arena de cuarzo (<500 µm), 20% de caolín y 5% de turba de musgo spagnum (OECD, 2004b). La formulación se preparó con arena tamizada por tamices de malla #35 y #60 (ASTM) en serie para lograr tamaños <500 y <250 µm, respectivamente, lavada con agua de red hasta obtener agua limpia y por último con agua destilada y secada al ambiente; caolín comercial. La fuente de materia orgánica se secó al ambiente y se agregó en forma de polvo (tamaño <1mm). Los ingredientes secos del sedimento se mezclaron y preservaron en recipiente cerrado a temperatura ambiente hasta su utilización. Se agregó agua destilada a la formulación para obtener el contenido de humedad deseado al momento de la realización de cada bioensayo de toxicidad.

El *sedimento natural* corresponde al sedimento de referencia utilizado en este trabajo y se obtuvo del A° Juan Blanco en la localidad de Magdalena. Una vez en el laboratorio, el sedimento obtenido, fue homogeneizado, secado al aire y preservado seco a temperatura ambiente hasta su utilización.

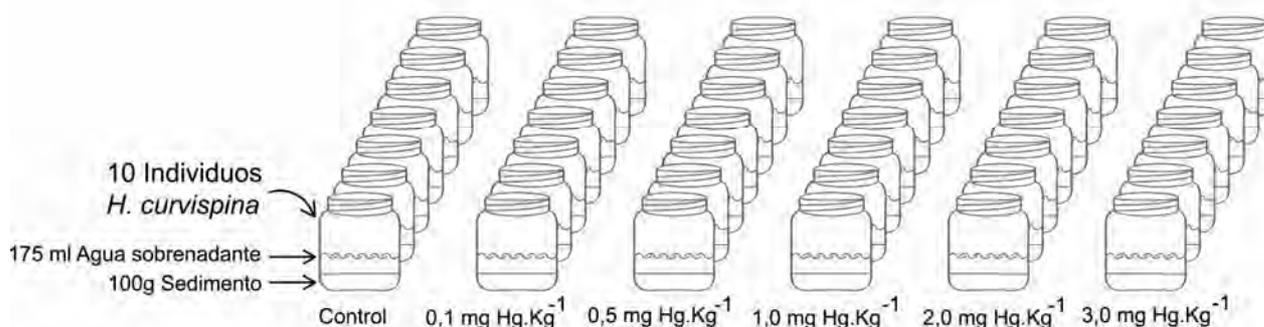
Para realizar las adiciones a los sedimentos se preparó una solución *stock* de 1 g Hg.L<sup>-1</sup> por disolución de HgCl<sub>2</sub> (Anedra®) en agua destilada. Para cada concentración ensayada se adicionó la cantidad necesaria del compuesto en 700 g de sedimento húmedo y se mezcló manualmente. Siguiendo las recomendaciones realizadas por Simpson *et al.* (2004) en estudios con sedimentos adicionados con metales, una vez incorporado el mercurio el sedimento se preservó durante una semana para lograr el equilibrio, en las mismas condiciones de luz y temperatura correspondiente a los bioensayos.

### V.2.2 Diseño experimental y metodología de ensayo

Se llevaron a cabo ensayos preliminares para determinar la supervivencia de *H. curvispina* en sedimentos formulados en laboratorio sin adiciones de contaminantes; por otro lado se realizaron bioensayos preliminares con adiciones de mercurio para determinar los intervalos de concentraciones a utilizar en los ensayos definitivos.

Se realizaron dos series de bioensayos definitivos: en la primera se utilizó un tratamiento único, que consistió en sedimento formulado artificialmente con un 2% de carbono orgánico (CO); con una serie de concentraciones nominales de 0,1 a 3 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> de masa seca. La segunda serie consistió en un experimento con tres tratamientos: sedimento formulado conteniendo 2,2% de CO; sedimento formulado sin materia orgánica (MO) y sedimento natural del sitio de referencia con 7,2% de CO. El intervalo de concentraciones ensayadas fue de 1,7 a 12 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> de peso seco. La Figura V.2 muestra un esquema del diseño experimental realizado.

### Experimento 1: Sedimento Formulado con MO



### Experimento 2: Sedimento Formulado con MO Sedimento Formulado sin MO Sedimento A° J. Blanco

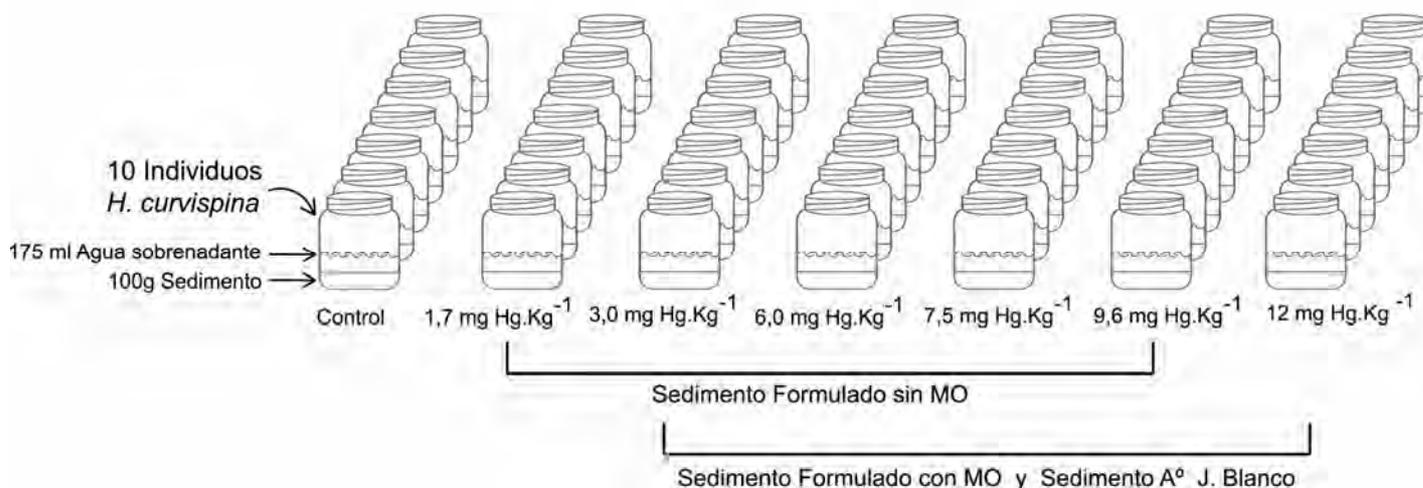


Figura V.2: Esquema del diseño experimental realizado en los bioensayos con sedimentos adicionados con mercurio.

Se utilizaron siete replicados por concentración, además de los controles negativos en cada uno de los tratamientos. En cada recipiente se dispusieron 100 ml de sedimento y 175 ml de agua sobrenadante (día -1 de ensayo), luego de 24 horas se colocaron 10 individuos (día 0 de ensayo). Se utilizó agua de red declorada como agua sobrenadante en los recipientes, cuya composición se mencionó en el Capítulo III (Pág. 28) Los organismos se obtuvieron a partir de los cultivos de laboratorio 24-48 horas previas al inicio del ensayo y alimentados de la misma forma que en los recipientes de cultivo. Se expusieron individuos de 10 días con una longitud promedio de 2,3 ( $\pm 0,4$ ) mm. Los anfípodos se colectaron con pipeta plástica y se colocaron en los recipientes de ensayo, una vez finalizada la incorporación se verificó el número y el estado de los mismos. Los recipientes se dispusieron en cámara incubadora con fotoperíodo a 16:8 horas luz:oscuridad y temperatura de  $21 \pm 1$  °C.

Los bioensayos de toxicidad se realizaron durante 21 días de exposición; los puntos finales considerados fueron supervivencia y crecimiento (en longitud). Se realizó recambio de 1/3 del agua sobrenadante de los recipientes y agregado de alimento (lechuga) cada cinco días durante el período de exposición. Se utilizaron dos de los siete replicados para la caracterización fisicoquímica del sedimento y el agua sobrenadante correspondiente a los tiempos inicial y final de ensayo. Las variables analizadas en el *agua sobrenadante* fueron temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, amonio, dureza y concentración de Hg. Para realizar las mediciones se utilizó instrumental electrónico (Lutron®) con los siguientes electrodos: pH (YK-2001PH), OD (YK-200PDO) y conductividad (YK-200PCT). Las mediciones de amonio se realizaron utilizando kit comercial Aquamerck® ( $>0,2$  mg.L<sup>-1</sup>). La dureza se midió por titulación con EDTA de acuerdo al método 2340C (APHA, 1998), expresando los resultados en mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>.

En el *sedimento* se determinó el pH, el contenido de materia orgánica y la concentración de Hg. El pH se determinó por el método 423 (APHA 1998) el cual consiste en pesar 10 g de muestra y agregarle 25 ml de agua destilada, dejar reposar 30 minutos y medir en el agua sobrenadante, repetir dos veces más y obtener un valor promedio. El porcentaje de humedad y de materia orgánica se estimaron por gravimetría según pérdida de peso, secado en estufa a 105 °C e ignición en mufla a 550 °C. El porcentaje de carbono orgánico (CO) se estimó utilizando una ecuación (Ball, 1964) en la cual se multiplica la pérdida por ignición por 0,6. Para determinar las concentraciones de mercurio total en sedimentos, las muestras fueron digeridas con ácido nítrico de acuerdo al método 3050 de EPA SW 846. Las muestras de agua sobrenadante fueron preservadas con ácido nítrico (APHA, 1998) y se midió mercurio en agua sin filtrar y filtrada por filtro de 0,45 µm. El mercurio se determinó

por Espectrometría de Absorción Atómica de Vapor Frío método 3112 (APHA, 1998) utilizando un instrumento Varian SpectrAA300 con generador de hidruros.

### V.2.3 Análisis estadístico

Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett respectivamente. Los valores de supervivencia se transformaron angularmente y la longitud a logaritmo previo a los análisis. 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 para ver diferencias entre tratamientos y Dunnett para evaluar diferencias con respecto al control y ANOVA de dos factores para la comparación entre los tres tratamientos del Experimento 2 (Zar, 2010). Se trabajó con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . En los casos en que se observó respuesta se calcularon los valores de  $CL_{50}$ , NOEC y LOEC (Díaz-Baez et al., 2005). Las  $CL_{50}$  se calcularon mediante el análisis Probit. En todos los casos los análisis fueron realizados a partir de las concentraciones de mercurio medidas en los sedimentos. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa STATISTICA (Stat Soft. Inc., versión 7).

### V.3 Resultados y discusión

La caracterización de los sedimentos formulado y natural (A<sup>o</sup> Juan Blanco) se muestra en la Tabla V.2. Las mediciones de los parámetros se realizaron al inicio de los ensayos de toxicidad. En bioensayos preliminares de toxicidad para verificar la supervivencia de los anfípodos en los sedimentos formulados, se observaron, en todos los casos supervivencias >90% a los 21 días de exposición.

**Tabla V.2: Caracterización del sedimento formulado control en el experimento 1 (Exp. 1) y sedimento formulado control y sedimento J. Blanco en el experimento 2 (Exp. 2). Las medidas de pH y %CO corresponden a promedios  $\pm$ DS (n=4).**

	Exp. 1	Exp. 2		
	<i>S f con MO</i>	<i>S f con MO</i>	<i>S f sin MO</i>	<i>S JB</i>
<b>pH</b>	7,1 $\pm$ 0,2	7,0 $\pm$ 0,4	8,0 $\pm$ 0,3	6,8 $\pm$ 0,4
<b>CO %</b>	2,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,04	----	7,3 $\pm$ 0,1
<b>Agua %</b>	35	30	25	30
<b>Arena %</b>	75	60	60	20
<b>Finos %</b>	20	40	40	80

Referencias: S f con y sin MO: sedimento formulado con materia orgánica y sin materia orgánica; S JB: sedimento del arroyo Juan Blanco.

Según el análisis granulométrico, el sedimento del arroyo Juan Blanco tiene un alto porcentaje de finos y en base a su composición se lo puede clasificar dentro de la clase textural arcillo limoso (Folk, 1954); su elevado contenido de materia orgánica (Tabla V.2), se relaciona con una alta densidad de plantas acuáticas sumergidas en un humedal del sector de muestreo. Estos resultados están en concordancia con estudios sedimentológicos realizados en los arroyos de la Franja Costera Sur del Río de la Plata (García, 2009; Manassero *et al.*, 2010). El sedimento en el sitio de muestreo poseía una concentración de mercurio de  $0,45 \pm 0,16 \text{ mg.Kg}^{-1}$  ( $n=4$ ); estos valores son similares a los obtenidos por García (2009) para el mismo sector de este arroyo. En diferentes cuerpos de agua superficiales de la misma cuenca los niveles de mercurio en sedimentos se encontraron por debajo del límite de detección (Ronco *et al.*, 2001; García, 2009). Al no encontrarse ninguna fuente directa de mercurio en la zona muestreada se considera que dichos valores corresponden al nivel de base natural del Arroyo Juan Blanco.

La supervivencia en los controles negativos de los bioensayos fue siempre igual o superior al 90%, por lo tanto se cumplieron los criterios de aceptación recomendados por USEPA (2000) y OECD (2004a). En relación a la respuesta subletal medida, estos controles evidenciaron un crecimiento aceptable luego de 21 días de exposición con respecto a la curva de crecimiento determinada previamente (Ver Figura III.8, Pág. 35)

Los resultados de los análisis estadísticos realizados se expresan como concentraciones efectivas de mercurio en sedimentos al tiempo inicial de ensayo y están referidos a masa seca.

### **V.3.1 Experimento 1: sedimento formulado con MO**

Los parámetros medidos en el *agua sobrenadante* al tiempo inicial y final de ensayo se muestran en la Tabla 1, en el anexo. Los valores de pH y conductividad se mantuvieron constantes entre concentraciones y durante el tiempo de exposición, mientras que el OD disminuyó levemente durante dicho período, permaneciendo siempre por encima de los niveles recomendados ( $>2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (USEPA, 2000). La dureza fue mayor al 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. Las concentraciones iniciales de mercurio en el agua sobrenadante estuvieron en todos los casos por debajo del límite de detección ( $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$ ); a los 21 días las concentraciones fueron detectables (Ver Tabla 1, en el Anexo).

Los valores de concentración nominales y efectivos en sedimentos ensayados se muestran en la Tabla V.3. Al tiempo final (Día 21), las concentraciones de mercurio (referidas a peso seco) en el sedimento disminuyeron en un 30% en relación al tiempo inicial. Esta disminución podría deberse a procesos de lixiviación asociados al recambio de agua sobrenadante (ver metodología de ensayo) y/o acumulación en tejido de organismos, o interacción con materiales de recipientes. Las mediciones realizadas en los sedimentos formulados utilizados como controles negativos (sin adiciones del metal) estuvieron por debajo del límite de detección.

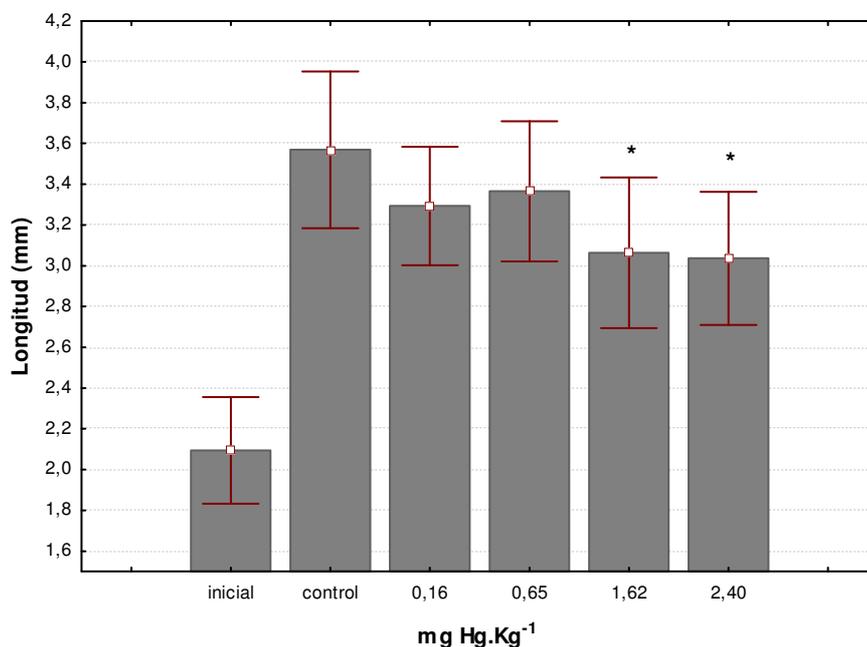
En la Tabla V.3 se muestran los resultados de supervivencia de *H. curvispina* luego de 21 días de exposición (Experimento 1, *S f con MO*). El análisis de la varianza no mostró diferencias significativas en la supervivencia con respecto al grupo control en ninguna de las concentraciones de mercurio ensayadas, siendo en casi todos los casos igual o superior al 80%, con excepción de la mayor concentración ensayada donde la supervivencia fue de 78,3%. El crecimiento de los anfípodos expuestos se evaluó mediante la comparación con la longitud de los anfípodos al tiempo inicial de ensayo (grupo inicial). Las medidas de longitud en los controles y en los sedimentos con 0,16 y 0,65 mg Hg.Kg<sup>1</sup> mostraron un incremento significativo entre 37 y 42% con respecto al grupo inicial, mientras que en los sedimentos con mayor contenido de mercurio el aumento del crecimiento fue del 30%. Estos resultados indican que el crecimiento de los individuos no fue significativo en las exposiciones a sedimentos formulados con un contenido igual o mayor a 1,62 mg Hg.Kg<sup>1</sup> conteniendo 2% de CO y 20% de finos en su composición (Figura V.3).

**Tabla V.3: Supervivencia en % (promedio  $\pm$ DS) de *H. curvispina* luego de 21 días de exposición correspondiente al Experimento 1. La concentración efectiva corresponde a las medidas de mercurio en el sedimento al tiempo inicial.**

Parámetro	Concentración nominal (mg Hg.Kg <sup>-1</sup> )					
	Control	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0
<b>Concentración efectiva</b> (mg Hg.Kg <sup>-1</sup> )	0,00	0,16	0,65	0,78	1,62	2,40
<b>Supervivencia</b>	90 $\pm$ 10 n=60	80 $\pm$ 16 n=60	80 $\pm$ 8,9 n=60	84 $\pm$ 15 n=50	80 $\pm$ 10 n=50	78,3 $\pm$ 13 n=50

A partir de los resultados del ANOVA seguido de la prueba a posteriori de Dunnet se calcularon los niveles de efectos subletales para *H. curvispina* para el crecimiento luego de 21 días de exposición como punto final, obteniéndose valores de NOEC de 0,65 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> y LOEC de 1,62 mg Hg.Kg<sup>-1</sup>. Es decir que el sedimento de las características mencionadas

con una concentración de hasta 2,40 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> no produjo efectos letales pero sí efectos subletales a partir de 1,62 mg Hg.Kg<sup>-1</sup>.



**Figura V.3: Longitud de *H. curvispina* correspondientes al grupo inicial y a los expuestos a sedimentos formulados con MO (Experimento 1) al tiempo final de ensayo.** Las concentraciones que presentaron diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) se indica con \*.

### V.3.2 Experimento 2: sedimento formulado con y sin MO y sedimento del A<sup>o</sup> J. Blanco.

Las concentraciones de mercurio adicionadas en los tratamientos del Experimento 2 se seleccionaron de acuerdo a los resultados de los bioensayos preliminares y a los obtenidos en el Experimento 1. Las concentraciones efectivas en los sedimentos al tiempo inicial de los bioensayos se detallan en la Tabla V.4; los porcentajes de recuperación del mercurio en las muestras analizadas estuvieron entre 83,0 y 98,5% de las concentraciones nominales; las concentraciones de mercurio en los controles negativos fueron en todos los casos menores al límite de detección analítico.

**Tabla V.4: Concentraciones de mercurio medidas (mg Hg.Kg<sup>-1</sup>) en el sedimento correspondiente a los tres tratamientos del Experimento 2 al tiempo inicial de ensayo.**

Tratamiento	Concentraciones nominales ensayadas						
	mg Hg.Kg <sup>-1</sup>						
	Control	1,7	3	6	7,5	9,6	12
<i>S f con MO</i>	0	Ne	Ne	5,60	6,34	9,32	11,8
<i>S f sin MO</i>	0	Nd	2,95	5,45	6,37	9,02	Ne
<i>S JB</i>	0	Ne	Ne	4,52	5,67	8,20	10,2

Referencias: S f con y sin MO: sedimento formulado con materia orgánica y sin materia orgánica; S JB: sedimento del arroyo Juan Blanco. Nd: no determinado; Ne: concentraciones no ensayadas

**Tabla V.5: Concentraciones de mercurio medidas (mg Hg.Kg<sup>-1</sup>) en el sedimento correspondiente a los tres tratamientos del Experimento 2 al tiempo final de ensayo.**

Tratamiento	Concentraciones nominales ensayadas						
	mg Hg.Kg <sup>-1</sup>						
	Control	1,7	3	6	7,5	9,6	12
<i>S f con MO</i>	0	Ne	Ne	4,16	5,02	7,32	9,00
<i>S f sin MO</i>	0	Nd	1,97	2,46	3,86	6,36	Ne
<i>S JB</i>	0	Ne	Ne	3,55	4,80	6,58	7,55

Referencias: S f con y sin MO: sedimento formulado con materia orgánica y sin materia orgánica; S JB: sedimento del arroyo Juan Blanco. Nd: no determinado; Ne: concentraciones no ensayadas

Las concentraciones de mercurio en los sedimentos luego de 21 días de exposición (Tabla V.5) disminuyeron entre 20 y 30% en los tratamientos *S f con MO* y *S JB* con respecto a las concentraciones en los sedimentos al inicio de los bioensayos de toxicidad. En el tratamiento *S f sin MO* las concentraciones disminuyeron entre 30 y 50%. Estos resultados indican que los sedimentos con materia orgánica en su composición (formulado y natural) retuvieron mayor cantidad de mercurio que el sedimento sin materia orgánica durante los 21 días de ensayo.

Los parámetros de calidad del agua sobrenadante se mantuvieron constantes a lo largo de los 21 días de exposición, obteniéndose valores de pH promedios en el tratamiento *S f con MO* de 7,5 y 7,9 para los días inicial y final respectivamente y 8,4 y 8,1 en el tratamiento *S f sin MO*, mientras que en el tratamiento *S JB* fueron de 7,5 y 7,7 para el inicio y final del ensayo, respectivamente. El OD disminuyó levemente durante la exposición estando siempre por encima de los niveles recomendados y la dureza fue mayor en el tiempo final de ensayo en relación a los valores iniciales, de forma similar al comportamiento de dichos parámetros en el Experimento 1. A su vez, estos parámetros no presentaron variaciones entre tratamientos ni entre concentraciones. Los valores correspondientes al pH, OD, conductividad, amonio y dureza para los tiempos inicial y final de ensayo se muestran en las

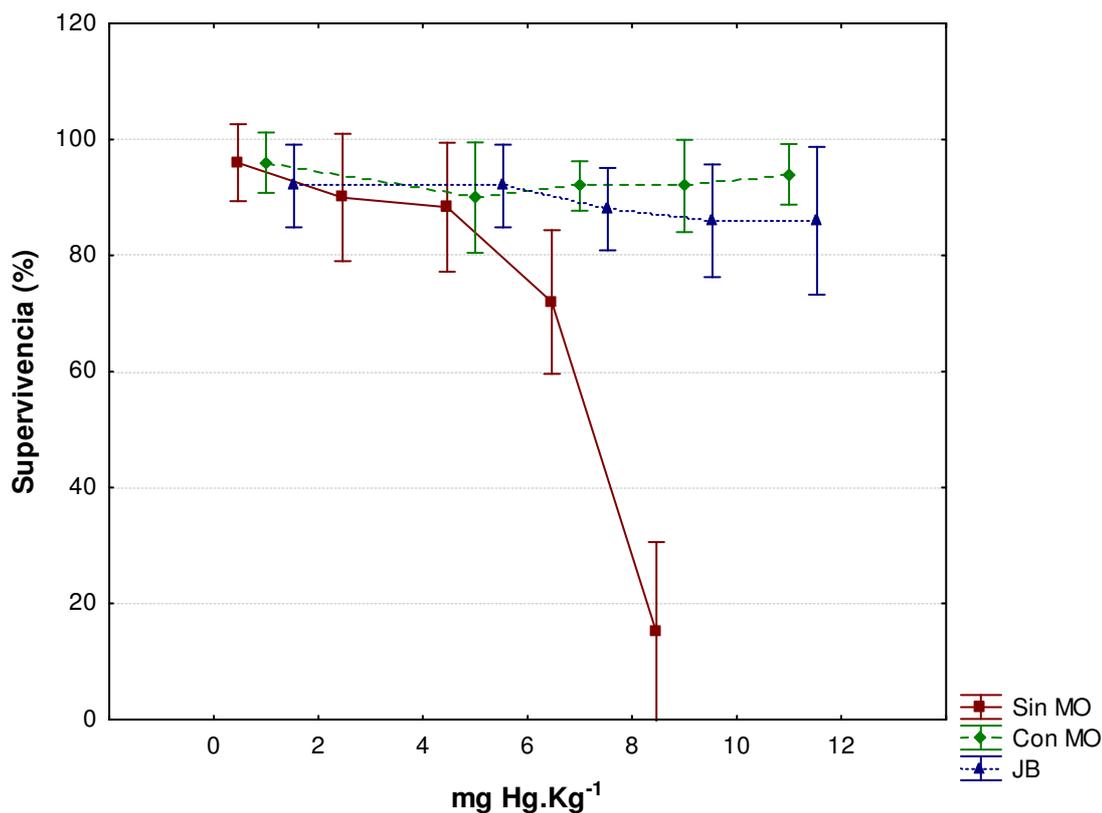
Tablas 2 y 3 incluidas en el Anexo. El mercurio en el agua sobrenadante fue menor al límite de detección en todos los recipientes medidos al inicio de los bioensayos, en los tres tratamientos. Se midió mercurio en el agua sobrenadante correspondiente a los días 5 y 21 de exposición, pudiéndose detectar el metal en la mayoría de las muestras, siendo mayores las concentraciones en el agua del día 5.

La Tabla V.6 muestra los porcentajes de supervivencia en los tres tratamientos. Los resultados del análisis de la varianza de dos factores realizado entre los tratamientos comparando las concentraciones efectivas correspondientes al control, 6,0, 7,5 y 9,6 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los mismos las cuales se pueden observar en la Figura V.4.

**Tabla V.6: Supervivencia % (promedio  $\pm$  DS, n entre paréntesis) de *H. curvispina* en los bioensayos correspondientes a los tres tratamientos del Experimento 2. La concentración que presentó diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) se indica con \*.**

Concentración nominal mg Hg.Kg <sup>-1</sup>	Tratamiento		
	<i>S f sMO</i>	<i>S f cMO</i>	<i>S JB</i>
Control	100 $\pm$ 0 (60)	96 $\pm$ 5,4 (50)	98 $\pm$ 8,0 (60)
1,7	86 $\pm$ 15,2 (50)	Ne	Ne
3,0	88 $\pm$ 10,9 (50)	Ne	Ne
6,0	88 $\pm$ 11,7 (50)	90 $\pm$ 10,0 (50)	92 $\pm$ 8,4 (50)
7,5	72 $\pm$ 13,0 (50)	92 $\pm$ 4,5 (50)	88 $\pm$ 8,4 (50)
9,6	15 $\pm$ 16,4 (50)*	92 $\pm$ 8,4 (50)	86 $\pm$ 11,4 (50)
12,0	Ne	94 $\pm$ 5,5 (50)	86 $\pm$ 13,4 (50)

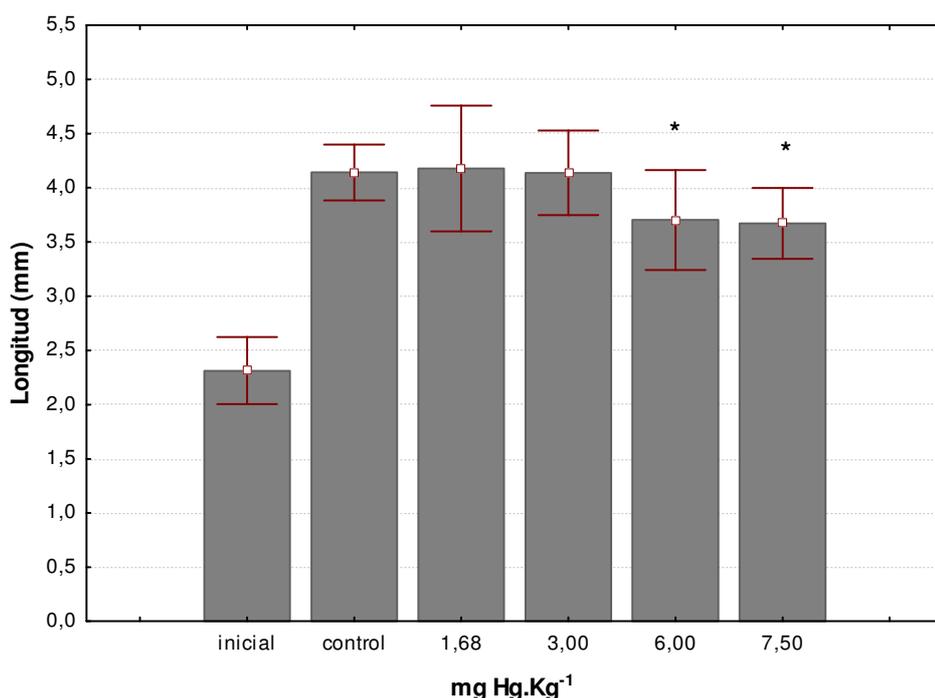
Referencias: *S f con* y *sin MO*: sedimento formulado con materia orgánica y sin materia orgánica; *S JB*: sedimento del arroyo Juan Blanco. Ne: concentración no ensayada



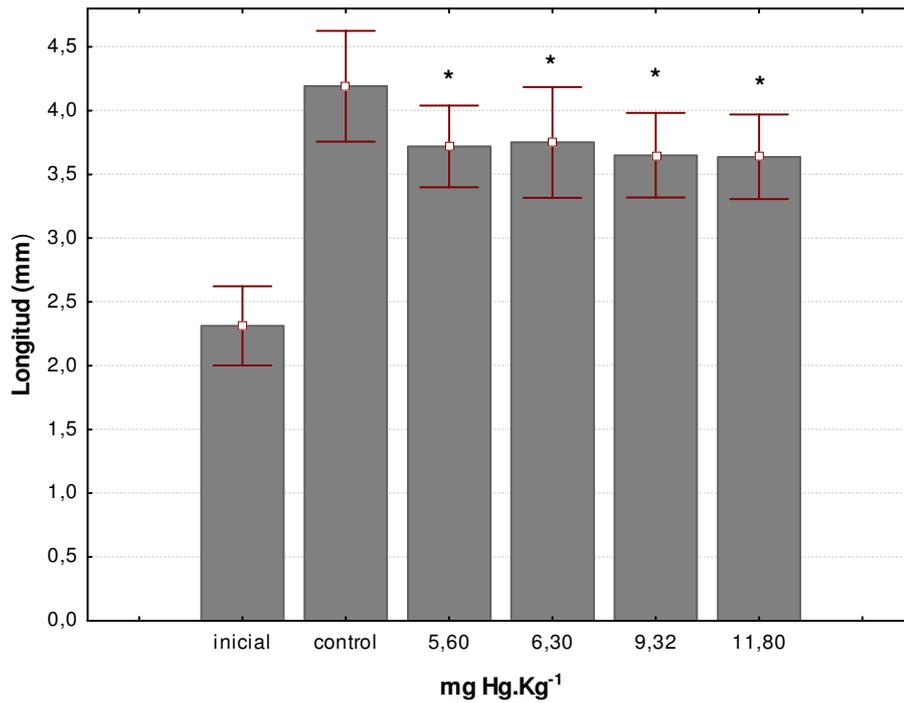
**Figura V.4: Supervivencia de *H. curvispina* en función de la concentración de mercurio en el sedimento correspondiente a los tres tratamientos.** La concentración que presentó diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) se indica con \*.

Los resultados del ANOVA seguido de la prueba a posteriori de Dunnett para la supervivencia en cada uno de los tratamientos por separado mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el grupo control únicamente en la concentración 9,3 mg Hg.Kg<sup>1</sup> en el sedimento *formulado sin MO*. Los sedimentos *formulados con MO* y *JB* no evidenciaron respuesta tóxica para la variable supervivencia como punto final en las concentraciones más altas ensayadas (11,8 mg Hg.Kg<sup>1</sup>). Para el sedimento *formulado sin MO* se pudieron calcular los niveles de efectos letales para *H. curvispina* luego de 21 días de exposición, obteniéndose una CL50 de 6,63 mg Hg.Kg<sup>1</sup>; sin embargo los límites de confianza no pudieron ser calculados mediante el análisis Probit. Las CL50 correspondientes a los tratamientos *S f con MO* y *S JB* fueron mayores a 10,2 y 11,8 mg Hg.Kg<sup>1</sup> respectivamente. Las concentraciones de efecto no observable (NOEC) y la de menor efecto (LOEC) expresadas como concentración de mercurio medida en el *sedimento sin MO* fueron de 6,32 y 9,32 mg Hg.Kg<sup>1</sup> respectivamente. Debido a la ausencia de respuesta letal en los *sedimentos con MO* no se obtuvieron valores de NOEC y LOEC, siendo la mayor concentración ensayada dos veces mayor que el NOEC calculado para el sedimento sin materia orgánica.

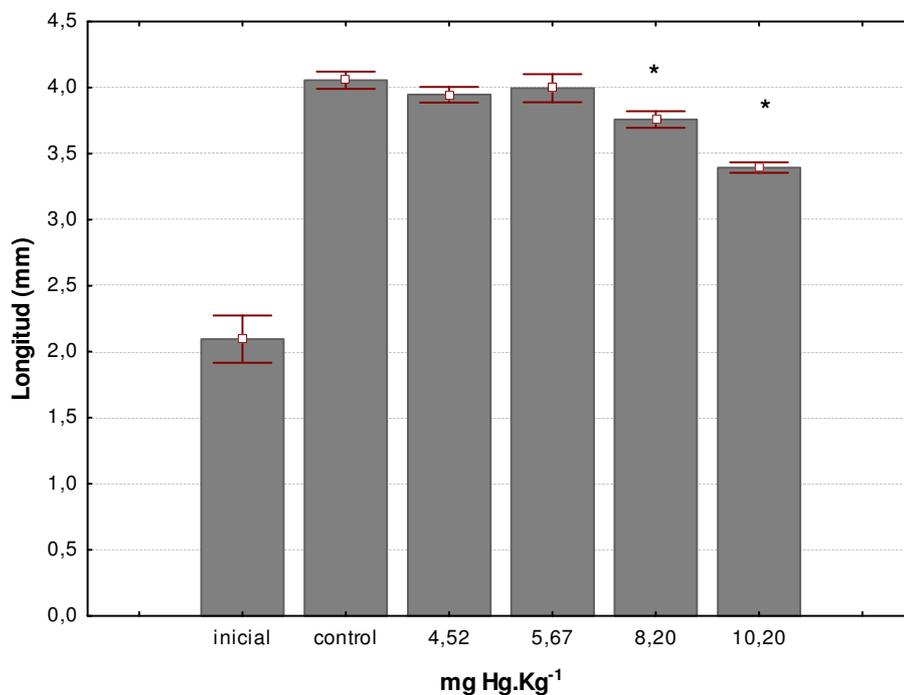
El crecimiento de los anfípodos expuestos se evaluó mediante la comparación con la longitud del grupo inicial en cada uno de los tratamientos. La longitud de los organismos en los sedimentos control, correspondientes a los tres tratamientos, mostró un incremento significativo entre 79 y 90% con respecto al grupo inicial. Los organismos expuestos al *sedimento formulado sin MO* mostraron un incremento similar en las concentraciones 1,70 y 2,95 mg Hg.Kg<sup>-1</sup>. En las concentraciones mayores a 2,95 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> el crecimiento de los organismos expuestos fue 20% menor a los expuestos al grupo control y a los sedimentos con concentraciones menores (Figura V.5). En el *sedimento formulado con MO* las medidas de longitud en todas las concentraciones ensayadas mostraron un incremento entre 58 y 62%. Estos resultados indican una disminución significativa en el crecimiento con respecto al grupo control (Figura V.6). Por otro lado, en el *sedimento JB* adicionado con mercurio, las disminuciones en el crecimiento con respecto al los organismos en el sedimento control fueron de 5, 3, 14 y 32% en los sedimentos con 4,52 5,67 8,20 y 10,2 mg Hg.Kg<sup>-1</sup> respectivamente, siendo estas disminuciones en el crecimiento significativas en las dos últimas concentraciones ensayadas (Figura V.7).



**Figura V.5: Longitud de *H. curvispina* en las concentraciones efectivas ensayadas de mercurio en *sedimentos formulado sin MO*. Las concentraciones que presentaron diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) se indica con \*.**



**Figura V.6:** Longitud de *H. curvispina* en las concentraciones efectivas ensayadas de mercurio en *sedimentos formulado con MO*. Las concentraciones que presentaron diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) se indica con \*.



**Figura V.7:** Longitud de *H. curvispina* en las concentraciones efectivas ensayadas de mercurio en *sedimentos JB*. Las concentraciones que presentaron diferencias significativas con el control ( $p < 0,05$ ) se indica con \*.

En el *sedimento formulado con MO* se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el control negativo a partir de la menor concentración ensayada ( $5,60 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$ ) (Figura V.5). Estos resultados se relacionan con las respuestas en el crecimiento obtenidas en el Experimento I con sedimento formulado con un contenido de MO similar, en el cual se observaron diferencias con el control en concentraciones de  $1,62$  y  $2,40 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$  obteniéndose un NOEC de  $0,65 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$  y un LOEC de  $1,62 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$ . La menor concentración en la que se evidenció disminución en el crecimiento con respecto al grupo control en el *sedimento formulado sin MO* fue de  $6,37 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$  (Figura V.5), la cual es similar al LOEC para la variable supervivencia en este sedimento. La Tabla V.8 muestra los valores de NOEC y LOEC calculados para la variable crecimiento como punto final. Las concentraciones de mercurio que causaron una disminución en el crecimiento en los *sedimentos formulados sin MO* son mayores a las correspondientes al *sedimento con MO* y menores a los correspondientes al *sedimento del Arroyo JB*.

La supervivencia de *H. curvipina* en ensayos crónicos no parece estar afectada por las concentraciones de mercurio evaluadas en sedimentos con contenido de MO, sin embargo en los sedimentos sin MO en su composición se observaron disminuciones significativas en la mayor concentración de mercurio ensayada. Por otro lado se observaron disminuciones significativas en el crecimiento de los organismos expuestos en las menores concentraciones de mercurio evaluadas en sedimentos con el menor contenido de MO (LOEC  $1,62 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$ ). Una reducción similar en el crecimiento se evidenció en concentraciones mayores (LOEC  $8,20 \text{ mg Hg.Kg}^{-1}$ ) en sedimentos JB con mayor contenido de MO.

**Tabla V.8: Valores de NOEC y LOEC a 21 días de exposición (expresados en  $\text{mg Hg.Kg}^{-1}$  medido en los sedimentos) para el crecimiento en longitud como punto final para *H. curvispina*.**

Niveles de efectos	Tratamientos				
	$\text{mg Hg.Kg}^{-1}$	<i>S f cMO I</i>	<i>S f sMO II</i>	<i>S f cMO II</i>	<i>S JB II</i>
<b>NOEC</b>		0,65	2,95	<5,60	5,67
<b>LOEC</b>		1,62	5,45	Nd	8,20

Referencias: *S f con MO I*: sedimento formulado con materia orgánica Experimento I; *S f con y sin MO II*: sedimento formulado con materia orgánica y sin materia orgánica Experimento II; *S JB II*: sedimento del arroyo Juan Blanco, Experimento II. Nd: no se pudo determinar

El factor principal que determina la disponibilidad del mercurio es la distribución del metal en las diferentes fases geoquímicas del sedimento, principalmente los complejo orgánicos (Zhong & Wang, 2006). De acuerdo al diseño experimental realizado, los dos tratamientos con sedimentos formulados sólo difieren en el contenido de materia orgánica, por lo tanto se

puede considerar que este factor estaría influyendo en la biodisponibilidad del mercurio para los organismos prueba. Los resultados obtenidos en este estudio avalan recomendaciones previas acerca de las predicciones de la biodisponibilidad de los metales deben considerar el efecto del tipo y concentración de MO presente en los sedimentos (Ankley *et al.*, 1996; Chapman *et al.*, 1998; Besser *et al.*, 2003).

Algunos niveles de calidad de sedimentos para el mercurio encontrados en la bibliografía corresponden a: 0,17 (valor guía norma canadiense) y 0,48 mg.Kg<sup>-1</sup> (concentración de efecto probable - PEL) para la misma norma (CEQG, 2002); 0,3 mg.Kg<sup>-1</sup> (referencia en norma Holandesa) (IADC/CEDA, 1997) y 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup> (PEL norma EEUU de Norteamérica) (MacDonald *et al.*, 2000). Ello indica un intervalo de concentraciones entre 0,17 y 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>. Los LOECs calculados para el mercurio en este estudio fueron mayores a las concentraciones de efecto probable mencionadas tanto para la supervivencia como para el crecimiento como puntos finales en exposiciones crónicas al sedimento adicionado. Ello indica que *H. curvispina* estaría protegida aún a los niveles de referencia más altos antes mencionados, ya que las concentraciones que inducen efectos mínimos son 2 veces superiores a 0,5 mg.Kg<sup>-1</sup>.

En la bibliografía disponible se encuentran estudios con sedimentos naturales contaminados con mercurio cuyos resultados son consistentes con la ausencia de respuestas letales sobre invertebrados bentónicos a concentraciones de mercurio que exceden los niveles guía de calidad de sedimentos. En muestras de sedimentos del estuario de Brunswick (EEUU de Norteamérica), conteniendo valores de hasta 24,7 mg.Kg<sup>-1</sup> de mercurio, no provocaron efectos en la supervivencia de *H. azteca* en bioensayos con sedimento completo de 10 días de exposición. Dichos sedimentos contenían elevadas cantidades de MO en su composición además de sulfuros (Winger *et al.*, 1993). Algunos estudios realizados en sedimentos de Lavaca Bay (EEUU de Norteamérica) mostraron ausencia de efectos adversos para el anfípodo *Leprocheirus sp.* (luego de 28 días de exposición), o el poliqueto *Neanthes sp.* (luego de 21 días de exposición) relacionados con concentraciones de mercurio en un intervalo de 0,3 a 4,6 mg.Kg<sup>-1</sup> (Robinson *et al.*, 1997). Sferra *et al.* (1999), en un estudio con muestras ambientales de sedimentos de afluentes del Estuario del Río Calcasieu, EEUU, con contenidos de hasta 4,1 mg.Kg<sup>-1</sup> de mercurio, no encontraron respuestas tóxicas sobre *H. azteca* y *L. plumulosus* (luego de 10 días de exposición), en los sedimentos con un contenido de 3,4% de carbono orgánico total.

Los antecedentes mencionados anteriormente, además de los resultados obtenidos aquí indican niveles de protección para los organismos estudiados a concentraciones de mercurio

entre 1,62 y 24,7 mg.Kg<sup>-1</sup> dependiendo de las características del sedimento. Sin embargo, algunas especies de invertebrados bentónicos, entre los que se encuentra *H. azteca*, bioacumulan grandes cantidades de mercurio (Borgmann *et al.*, 1993). Por lo tanto deben considerarse potenciales procesos de bioacumulación y transferencia a través de la cadena trófica en los ecosistemas (ver Figura V.1), para contar con un diagnóstico más completo de los riesgos asociados a la contaminación con mercurio. Estos elementos deberían ser tenidos en cuenta en evaluaciones de impacto de contaminación ambiental por mercurio.

## CAPÍTULO VI

### Caracterización fisicoquímica y ecotoxicológica de sedimentos de fondo de afluentes del Río de la Plata

#### VI.1 Introducción

Como se mencionó en el capítulo introductorio (Capítulo I), las evaluaciones de los ecosistemas acuáticos generalmente han sido enfocadas sobre la calidad del agua (Ingersoll, 1995; Burton, 2002); sin embargo los sedimentos de fondo cumplen una importante función en ambientes contaminados, como sumidero de sustancias tóxicas, con particular impacto sobre los organismos bentónicos (Kukkonen & Landrum, 1994; Ingersoll *et al.*, 1995). En este sentido, en los últimos años, se han desarrollado y estandarizado metodologías para la evaluación de la contaminación de sedimentos mediante la realización de ensayos de toxicidad (ASTM, 1999; USEPA, 1994, 1995, 2000, 2001; EC, 1997, 1999; OECD, 1993).

Las especies comúnmente utilizadas y protocolizadas para bioensayos con sedimentos incluyen algas, bacterias, moluscos, crustáceos (anfípodos: *H. azteca*, *Diporeia sp.*, *Ampelisca abdita*, *Gammarus sp.*; cladóceros: *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*), dípteros (*Chironomus sp.*), anélidos (*Lumbriculus variegatus*, *Tubifex tubifex*) y peces. En el caso particular de los bioensayos en laboratorio, la selección del organismo prueba depende de la fase del sedimento a ensayar (sedimento completo, elutriado, agua de poro). En el primer caso la elección depende además del comportamiento del organismo en el sedimento y de sus hábitos alimenticios, de su relevancia ecológica, distribución geográfica, disponibilidad y tolerancia a las características geoquímicas de la matriz. Por otra parte también es necesaria su aceptabilidad para su uso como organismo de referencia en bioensayos estandarizados de toxicidad (Ingersoll, 1995).

Los invertebrados bentónicos son los organismos más utilizados, principalmente anfípodos y anélidos, esto se relaciona con el hecho de que la fase más empleada para conducir

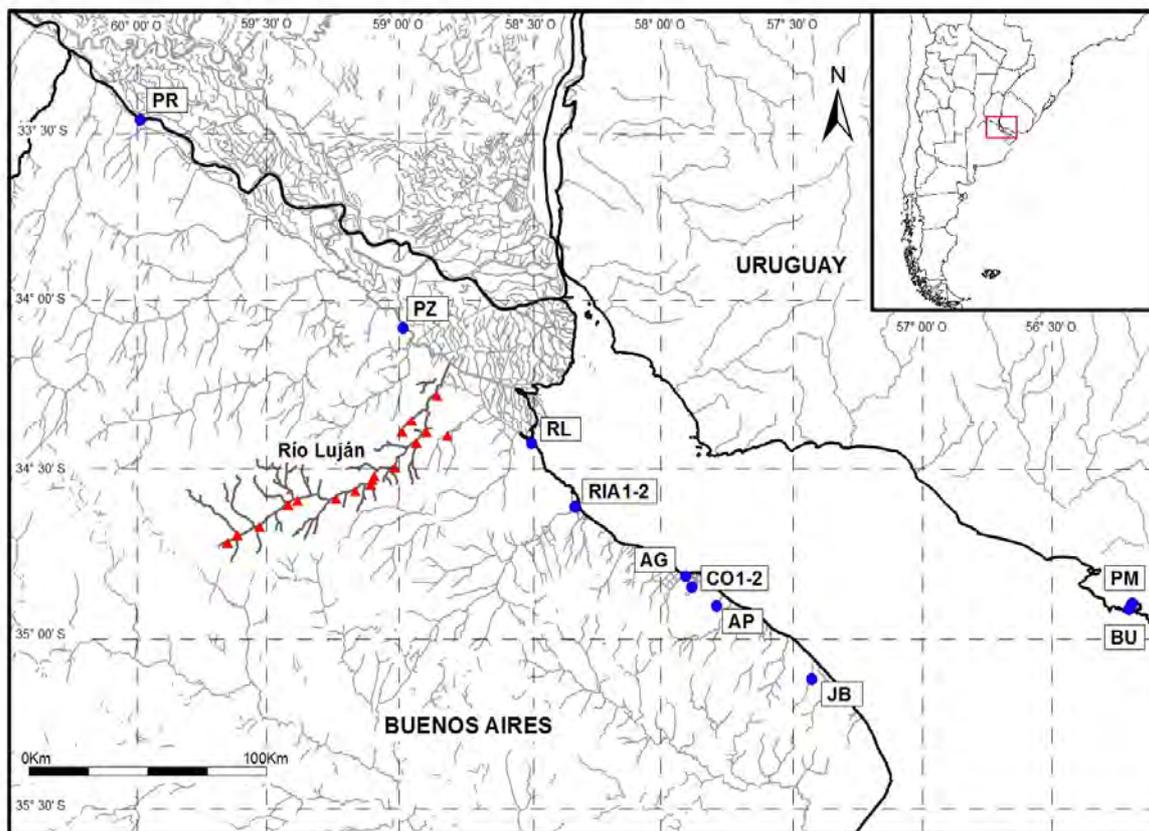
ensayos de toxicidad en laboratorio es el sedimento completo (Nebeker *et al.*, 1984; Svenson *et al.*, 1996; Munawar *et al.*, 1999; Bettinetti *et al.*, 2003; Hintzen *et al.*, 2009).

Considerando los antecedentes de contaminación en aguas y sedimentos de fondo de la región (ver Capítulo I) y la escasez de estudios de efectos biológicos de contaminantes asociados al sedimento se realizó una primera evaluación de la toxicidad de sedimentos en sitios correspondientes a ríos y arroyos afluentes del Río de la Plata con diferentes grados de deterioro ambiental utilizando bioensayos de toxicidad en laboratorio con sedimento completo con una especie de anfípodo nativa (*H. curvispina*) como organismo prueba. A su vez se realizó la caracterización fisicoquímica de los sitios de estudio.

## VI.2 Selección de los sitios de estudio

El Río de la Plata es el último tramo de la Cuenca del Plata, que recibe en la costa Argentina la carga de contaminantes aportada por las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay, así como la correspondiente al área metropolitana de Buenos Aires y Gran La Plata, y el área metropolitana de Montevideo (como principales asentamientos industriales), en la costa uruguaya. El Río de la Plata recibe a lo largo de la Franja Costera Sur aportes contaminantes del río Luján y Riachuelo en la zona norte y el río Santiago en la zona sur, además de numerosos arroyos y canales. También recibe aportes de efluentes cloacales domésticos, industriales y de escorrentías de áreas cultivadas, ya sea en forma directa o a través de ríos, arroyos y canales, a partir de los cuales ingresa una heterogénea carga de contaminantes (Colombo *et al.*, 1990; Ronco *et al.*, 1993; Verrengia Guerrero *et al.*, 1994; AGOBSA-SHN, 1997; Ronco, 1997; Villar *et al.*, 1999, 2002; FREPLATA, 2002; Salibián, 2006).

Teniendo en cuenta dichos antecedentes se seleccionaron una serie de sitios de muestreo los cuales presentan diferente grado de contaminación de acuerdo a estudios previos. La Figura VI.1 muestra la ubicación de los sitios de muestreo; los mismos se dividen en dos grupos: **grupo A:** Sedimentos de: la desembocaduras del Río Luján y Riachuelo, del sector medio del Canal Oeste, provenientes de dragado del Riachuelo, del Arroyo del Gato y Arroyo El Pescado, Paraná de las Palmas a la altura de Zárate y Ramallo y de la Costa uruguaya a la altura del Puerto de Montevideo; **grupo B:** Sedimentos a lo largo de los tramos superior y medio del Río Luján.



**Figura VI.1: Ubicación de los sitios de obtención de las muestras de sedimento.**  
Referencias: En azul se indican las muestras de sedimentos del grupo A (Abreviaturas en Tabla VI.1); en rojo se indican las muestras de sedimento del grupo B.

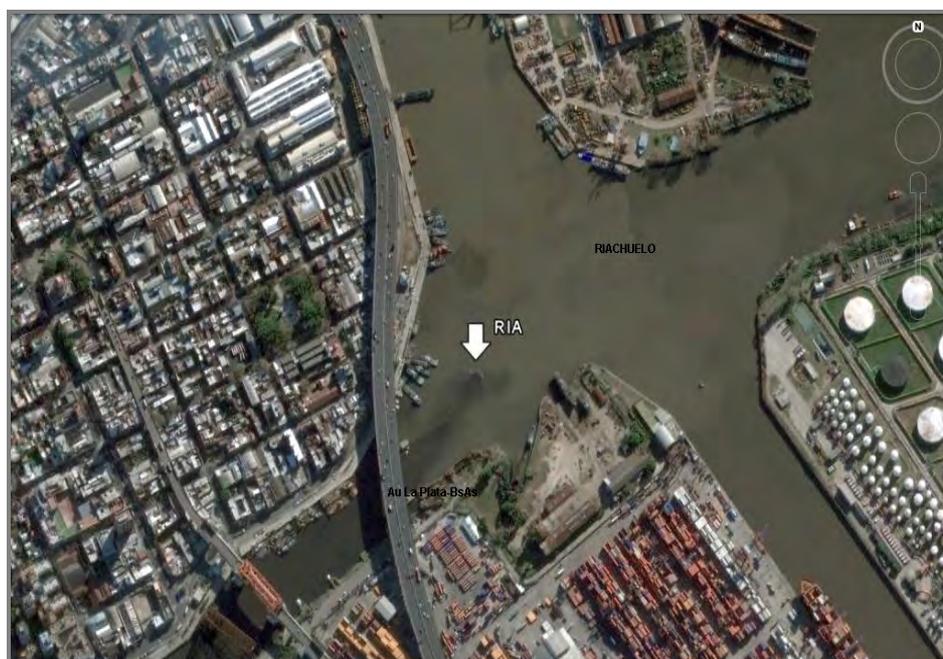
**Muestras de sedimento correspondientes al grupo A:** En la Tabla VI.1 se indican los sitios de las muestras estudiadas, indicando su localización geográfica y las abreviaturas correspondientes a cada una utilizada en la metodología y resultados.

El Riachuelo es el sector distal del Río Matanza-Riachuelo; ha sido documentada históricamente como uno de los cuerpos de agua mas contaminados de la región debido al vuelco de efluentes domésticos e industriales. El 13,5% de la población argentina se encuentra asociada a esta cuenca. Las aguas de la cuenca reciben por día aproximadamente 368.000 m<sup>3</sup> de aguas residuales domésticas y 88.500 m<sup>3</sup> de desechos industriales (alimenticia, metalúrgica y petroquímica entre otras). Estos datos muestran que la principal razón de la contaminación del curso viene asociada al vuelco de líquidos cloacales crudos, que sumado a tóxicos de origen industrial, ha llevado al deterioro del ecosistema por productos químicos y eutrofización. La desembocadura del Riachuelo es un punto crítico (Figura VI.2), se han documentado valores elevados de metales pesados y compuestos orgánicos, dentro de estos últimos principalmente hidrocarburos aromáticos, en aguas y sedimentos (Servicio de Hidrología Naval, 1989; Kreimer *et al.* 1996; INA, 1999;

Colombo *et al.*, 2006), superando para casi todos los contaminantes los niveles guía para aguas (Niveles Guía de agua dulce superficial para protección de vida acuática, Ley nacional 24.051) y sedimentos (norma Canadiense CCME, 1999).

**Tabla VI.1: Sitios de muestreo (grupo A). Se indica la abreviatura (Abrev.) y la posición geográfica de cada sitio.**

Sitio	Abrev.	Posición
Aº Juan Blanco (Magdalena)	JB	35º8'28,49''S; 57º26'27,92''O
Río Luján (desembocadura)	RL	34º26'50,20''S; 58º31'17,46''O
Riachuelo (desembocadura)	RIA1	34º38'12,23''S; 58º21'12,03''O
Riachuelo (dragado)	RIA2	34º38'12,23''S; 58º21'12,03''O
Canal Oeste I (Ensenada)	CO1	34º52'22,59''S; 57º54'20,47''O
Canal Oeste II (Ensenada)	CO2	34º52'22,59''S; 57º54'20,47''O
Aº del Gato (La Plata)	AG	34º50'25,60''S; 57º55'45,16''O
Aº El Pescado (La Plata)	AP	34º55'41,16''S; 57º48'33,64''O
Pto. Montevideo	PM	34º52'53,50''S; 56º13'43,50''O
Sitio blanco Uruguay	BU	34º53'57,60''S; 56º14'26,40''O
Paraná de las Palmas (Zárate)	PZ	34º06'16,38''S; 59º00'14,48''O
Paraná de las Palmas (Ramallo)	PR	33º27'56,33''S; 60º00'23,00''O



**Figura VI.2:** Imagen satelital del punto de muestreo correspondiente al Sitio Riachuelo (RIA)

El Canal Oeste es otro ejemplo de un cuerpo de agua con un grado elevado de contaminación, principalmente metales pesados e hidrocarburos, asociados a efluentes de refinerías de petróleo y plantas petroquímicas que forman parte de un gran complejo industrial instalado hace décadas en Berisso y Ensenada (Cattogio, 1990; Ronco *et al.*, 1995 y Alzuet *et al.*, 1996).

En relación a los arroyos del sector costero sudoeste del Río de la Plata, los cuales se encuentran en el área de influencia de los Partidos de Berisso, Ensenada y La Plata, la actividad antrópica asociada a los mismos es causa de serios problemas de contaminación en aguas superficiales. Existen numerosas fuentes puntuales de contaminación asociadas con industrias petroquímicas, petrolera, metalúrgicas, plantas de madera y papel, sumado a efluentes urbanos sin tratamiento y relleno sanitario, entre otros (Ronco *et al.*, 1995; Alzuet *et al.*, 1996). Como consecuencia se ha detectado un importante sumidero de metales y compuestos orgánicos en sedimentos de algunos canales y arroyos de la región (Colombo *et al.*, 1990; Serra, 1992; Manassero *et al.*, 1998; Ronco *et al.*, 2001; Camilion *et al.*, 2003)

Además se obtuvieron muestras de sedimentos en sitios correspondientes a vuelcos de industrias papeleras asentadas sobre la margen del Paraná de las Palmas, antes y después de la salida de los efluentes industriales. Uno de los sitios de obtención de sedimentos se ubica a la altura de Zárate. También se obtuvieron muestras a la altura de Ramallo.

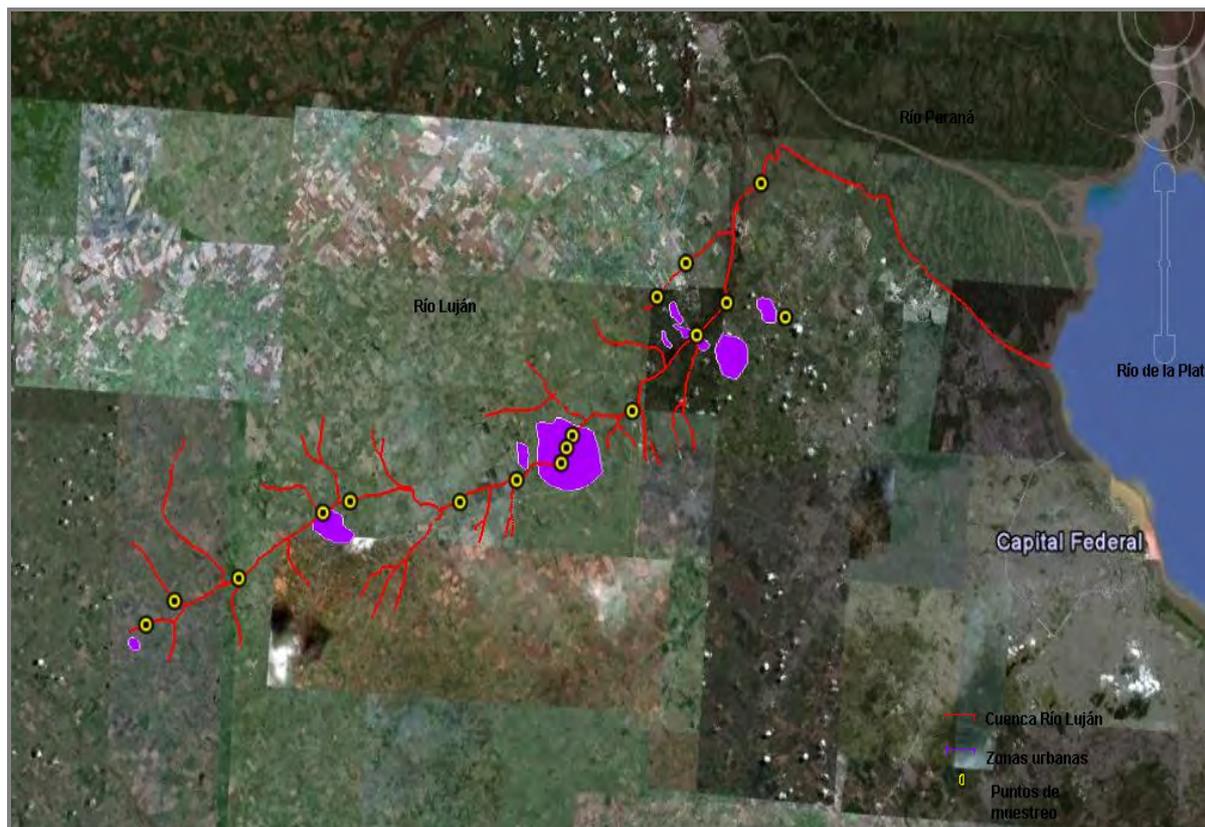
En la costa uruguaya, a la altura del puerto de Montevideo, el Río de la Plata recibe efluentes municipales sin tratamiento de 1,5 millones de personas. A su vez es receptor de dos arroyos muy contaminados, y numerosas descargas industriales incluidas una central termoeléctrica y una refinería de petróleo. Los sedimentos tanto en la desembocadura de los arroyos como en el puerto de Montevideo contienen concentraciones de metales, principalmente cobre, cromo, mercurio, plomo y zinc, que superan los niveles guía de calidad (Moyano, 1993; Moresco & Dol, 1996; Muniz *et al.*, 2002, 2004), por lo cual se considera el puerto de Montevideo como una zona altamente contaminada por metales (Muniz *et al.*, 2004).

**Muestras de sedimentos correspondientes al grupo B:** En la Tabla VI.2 se indican los sitios de las muestras estudiadas, indicando su localización geográfica y las abreviaturas correspondientes a cada una utilizada en la metodología y resultados.

**Tabla VI.2: Sitios de muestreo correspondientes al Río Luján (Grupo B). Se indica la abreviatuta (Abrev.) y la posición geográfica de cada sitio.**

<i>Sitio</i>	<i>Abrev..</i>	<i>Posición</i>
Aº Durazno (Suipacha)	ADS	34°45'6,10"S; 59°40'18,80"O
Aº Leones (Suipacha)	ALS	34°43'39,77"S; 59°38'6,53"O
Pte. García	PG	34°42'9,07"S; 59°33'2,28"O
Pte. 3 de Marzo	P3M	34°38'8,82"S; 59°26'31,66"O
Ruta 41	R41	34°37'24,07"S; 59°24'23,98"O
Pte. Olivera	PO	34°37'1,79"S; 59°15'36,79"O
Club El Timón, Jáuregui	TJ	34°35'38,34"S; 59°11'12,27"O
Pte. Las Tropas	PLT	34°34'27,25"S; 59°7'41,64"O
Pte. Alte Brown (Luján)	PABL	34°33'34,41"S; 59°7'19,77"O
Acceso Oeste Río Luján	AORL	34°32'51,59"S; 59°6'54,66"O
Ruta 6	PR6	34°31'14,58"S; 59°2'13,98"O
Ruta 8 (Pilar)	R8P	34°26'42,45"S; 58°57'24,59"O
Aº Larena (Exaltación de la Cruz)	ALA	34°24'42,94"S; 59°0'43,75"O
Pilar-Reserva	RP	34°24'45,97"S; 58°55'9,66"O
Aº Larena (Pilar)	ALD	34°22'41,46"S; 58°58'33,75"O
Ruta 9 (Escobar)	R9E	34°17'53,57"S; 58°52'54,03"O
Carmel (Pilar)	CP	34°25'20,7"S; 58°50'25,39"O

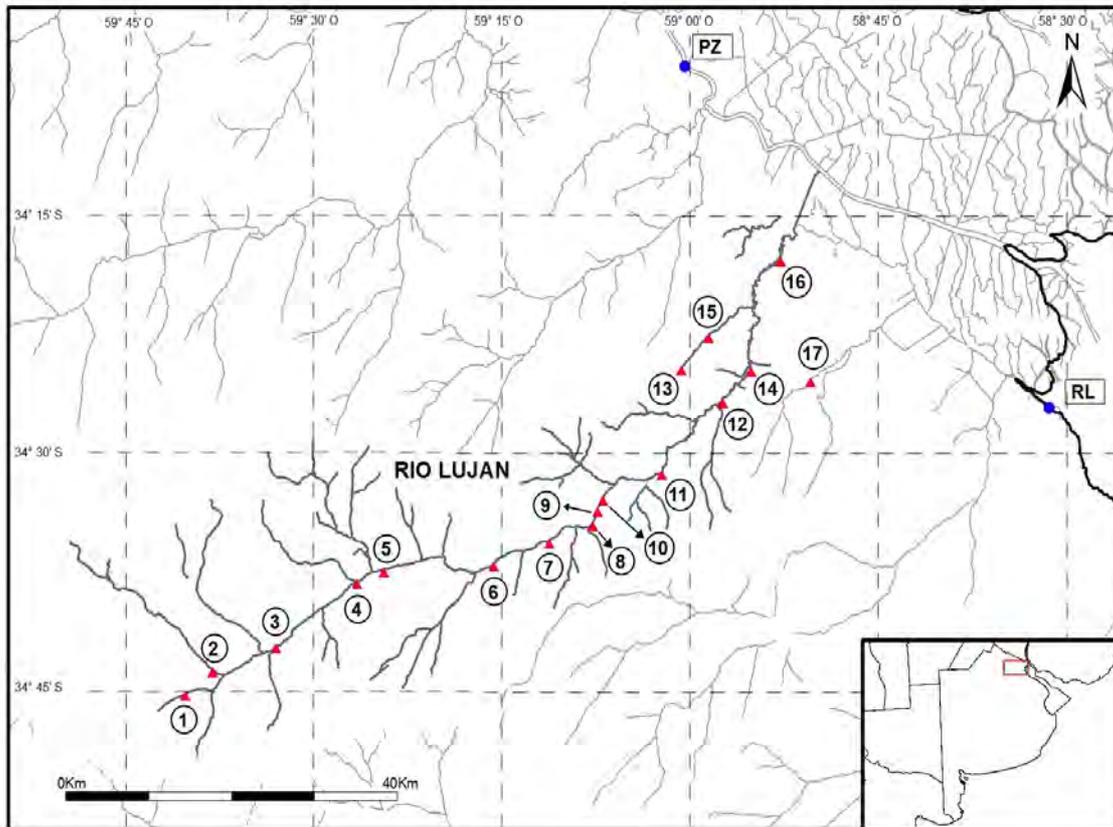
El Río Luján está situado al noreste de la Provincia de Buenos Aires, se une al delta del Río Paraná y desemboca en el Río de la Plata. La cuenca abarca una superficie de 2600 km<sup>2</sup> y su cauce principal atraviesa nueve partidos (Chivilcoy, Mercedes, Luján, Pilar, Exaltación de la Cruz, Campana, Escobar, Tigre y San Fernando) con una población de más de 1.000.000 de habitantes. El río nace en la confluencia de los arroyos Los Leones y Del Durazno en el partido de Suipacha, y desemboca en el Río de La Plata siendo su longitud aproximadamente de 128 Km (Andrade, 1986) (Figura VI.3). Según Sala (1972) se divide en tres tramos, uno superior de 40 Km; uno medio de 30 Km. y el inferior de 60 Km. de longitud el cual presenta la menor pendiente. El régimen hidrológico de los sectores superior y medio está controlado por lluvias y por filtración subterránea; mientras que el sector inferior está influenciado por el Río Paraná y los regimenes de marea del Río de la Plata. La red de drenaje corre sobre una parte de la planicie de acumulación conocida como *Pampásica*, formada por depósitos del período Cuaternario.



**Figura VI.3: Imagen satelital del Río Luján.** Referencias: en amarillo los puntos de muestreo y en violeta las zonas urbanas a lo largo de la cuenca.

El río Luján es uno de los sistemas acuáticos naturales de la región que ha sufrido mayor deterioro en las últimas décadas debido al crecimiento poblacional y el desarrollo de diversas actividades humanas. La actividad que más se ha desarrollado en la cuenca es la agropecuaria (Andrade, 1986; Guichon *et al.*, 1999). Sin embargo con el crecimiento de los centros urbanos e industrias, principalmente en los sectores medio e inferior del curso, a medida que se aleja de las nacientes, recibe diferentes tipos de impacto originados por vertidos de efluentes cloacales, industriales y domiciliarios, con escaso o ningún tratamiento de depuración. A la altura de la ciudad de Mercedes existe una descarga de desechos cloacales y domiciliarios sin tratamiento previo. En la localidad de Jáuregui se vuelcan desechos de una curtiembre de gran tamaño. Después del ejido de la ciudad de Luján hay sitios de descarga de efluentes cloacales, domiciliarios e industriales (Andrade, 1986). El paso por la ciudad de Luján provoca en el río un aumento significativo de la demanda biológica de oxígeno (DBO) y de la demanda química de oxígeno (DQO) con respecto a los valores de entrada (Giorgi *et al.*, 2000). A partir de la ciudad de Pilar, el río recibe desechos urbanos e industriales variados, tanto en su cauce principal directamente como a través de sus afluentes, lo cual se evidencia en los valores de parámetros fisicoquímicos en agua evaluados en estudios previos (Feijoó *et al.*, 1999; O'Farrell *et al.*, 2002; Pizarro & Alemanni,

2005; Di Marzio *et al.*, 2005). La Figura VI.4 indica la ubicación de los sitios de obtención de las muestras de sedimento.



**Figura VI.4: Ubicación de los sitios de obtención de las muestras de sedimento correspondientes a la cuenca del Río Luján.** Referencias: 1, ADS; 2, ALS; 3, PG; 4, P3M; 5, R41; 6, PO; 7, TJ; 8, PLT; 9, PABL; 10, AORL; 11, PR6; 12, R8P; 13, ALA; 14, RP; 15, ADL; 16, R9E; 17, CP. Las abreviaturas se indican en la Tabla VI.2.

El Arroyo Juan Blanco desemboca directamente en el Río de la Plata a la altura del partido de Magdalena, nace en una zona de bañados y aguas intermitentes y presenta un aumento progresivo del caudal desde la naciente a su desembocadura. En su tramo medio, atraviesa una Reserva de Biosfera (UNESCO). Sus aguas muestran una menor influencia antrópica, por lo cual se lo seleccionó como sitio de referencia (Feijóo *et al.*, 1999). Las muestras de sedimento se obtuvieron en las márgenes del arroyo (en la intersección con la Ruta 11) a 20 Km de las nacientes y a 5 Km de su desembocadura en el Río de la Plata (Figura VI.5). En dicho sector el cauce presenta agua todo el año, con un ancho aproximado de 15 m y una profundidad de 2 m en el centro del cauce.



**Figura VI.5:** Imagen correspondiente al sitio de muestreo de sedimento de referencia A° Juan Blanco.

### **VI.3 Metodología**

#### **VI.3.1 Toma y preservación de muestras de sedimentos**

En total se tomaron 31 muestras ambientales de sedimentos de fondo. Los muestreos fueron realizados durante el período 2005-2006 para las muestras del grupo A. Las muestras del grupo B fueron obtenidas durante los meses Junio, Julio y Agosto de 2006. En cada punto se obtuvieron un mínimo de veinte sub-muestras de la capa superficial de sedimentos de fondo con draga tipo Eckman, las mismas fueron integradas manteniéndose refrigeradas durante el trayecto al laboratorio. Las muestras fueron homogeneizadas y fraccionadas para su análisis químico y toxicológico.

Una vez en el laboratorio las muestras de sedimento fueron conservadas hasta su utilización. La metodología para la conservación de sedimentos recomendada por ASTM (1994) y USEPA (1994, 2000) indican un mantenimiento por dos semanas o menos a 4 °C en oscuridad; sin embargo dicha recomendación no se basa en consideraciones biológicas, se asume que de esta forma se minimizan las alteraciones de naturaleza geoquímica del

sedimento (Thompson *et al.*, 1980; DeFoe & Ankley, 1998). Existen estudios en los cuales se evalúa el efecto de los métodos y tiempo de conservación del sedimento sobre la toxicidad de los mismos en los que se encuentran resultados muy variables. Algunos autores (Beiras & His, 1995; Geffard *et al.*, 2004) encontraron un aumento de la toxicidad en sedimentos congelados en relación a muestras frescas. Sin embargo existen otros estudios en los cuales no se evidenciaron diferencias en la respuesta tóxica entre sedimentos congelados y frescos (Carr *et al.*, 1989; Norton *et al.*, 1999).

Geffard *et al.* (2004) no observaron cambios en la distribución granulométrica de sedimentos mantenidos bajo diferentes condiciones (fresco, congelado, liofilizado) durante períodos de hasta 120 días. En relación al tiempo de conservación a 4 °C, varios autores concluyeron que las variaciones en la toxicidad de los sedimentos se explican por la variabilidad biológica de las especies utilizadas en los ensayos de toxicidad (Dave & Nilson, 1996; DeFoe & Ankley, 1998; Geffard *et al.*, 2004) y observaron que las características fisicoquímicas del sedimento se mantienen constantes entre 5 y 120 días de mantenimiento (Geffard *et al.*, 2004).

Las muestras de sedimento obtenidas para la realización de ensayos de toxicidad en el curso del Río Luján se mantuvieron en freezer durante un período máximo de cuatro meses debido a cuestiones operativas, ya que los muestreos se realizaron en un período corto en relación al requerido para la realización de los ensayos de toxicidad con las 16 muestras; el resto de las muestras se mantuvieron a 4 °C en oscuridad durante un período máximo de 30 días.

El sedimento de referencia se obtuvo en un único muestreo durante la primavera de 2005, y se empleó la misma metodología que para el resto de las muestras. Una vez en el laboratorio fue homogeneizado, obteniéndose fracciones para su caracterización química y granulométrica. El resto fue secado al ambiente y preservado seco a temperatura ambiente hasta su utilización en cada ensayo de toxicidad.

### **VI.3.2 Caracterización fisicoquímica**

En cada una de las muestras de sedimento integradas por sitio de muestreo se determinó granulometría, pérdida por ignición, porcentaje de humedad, compuestos mayoritarios, minoritarios y contaminantes (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, Fe, Mn, Na, K, Mg, Nitratos, Cloruros, Sulfuros, Sulfatos, P total, Hidrocarburos totales y Cianuros), también se analizaron los plaguicidas hexaclorociclohexano (HCH), hexaclorobenzeno (HCB), lindano,

heptacloro, aldrin, clorpirifos, heptacloroepoxido, dieldrin, o,p'-DDT, p,p'-DDT, diazinon, metil-paration, malation, D-allectrin, cipermetrina, tetrametrina, permetrina, endosulfan 1 y 2. Las determinaciones químicas se realizaron en el sedimento completo. La Figura VI.6 muestra un esquema de la caracterización química de las muestras; las cuales fueron realizadas por personal del CIMA en apoyo a las investigaciones en este trabajo de tesis.

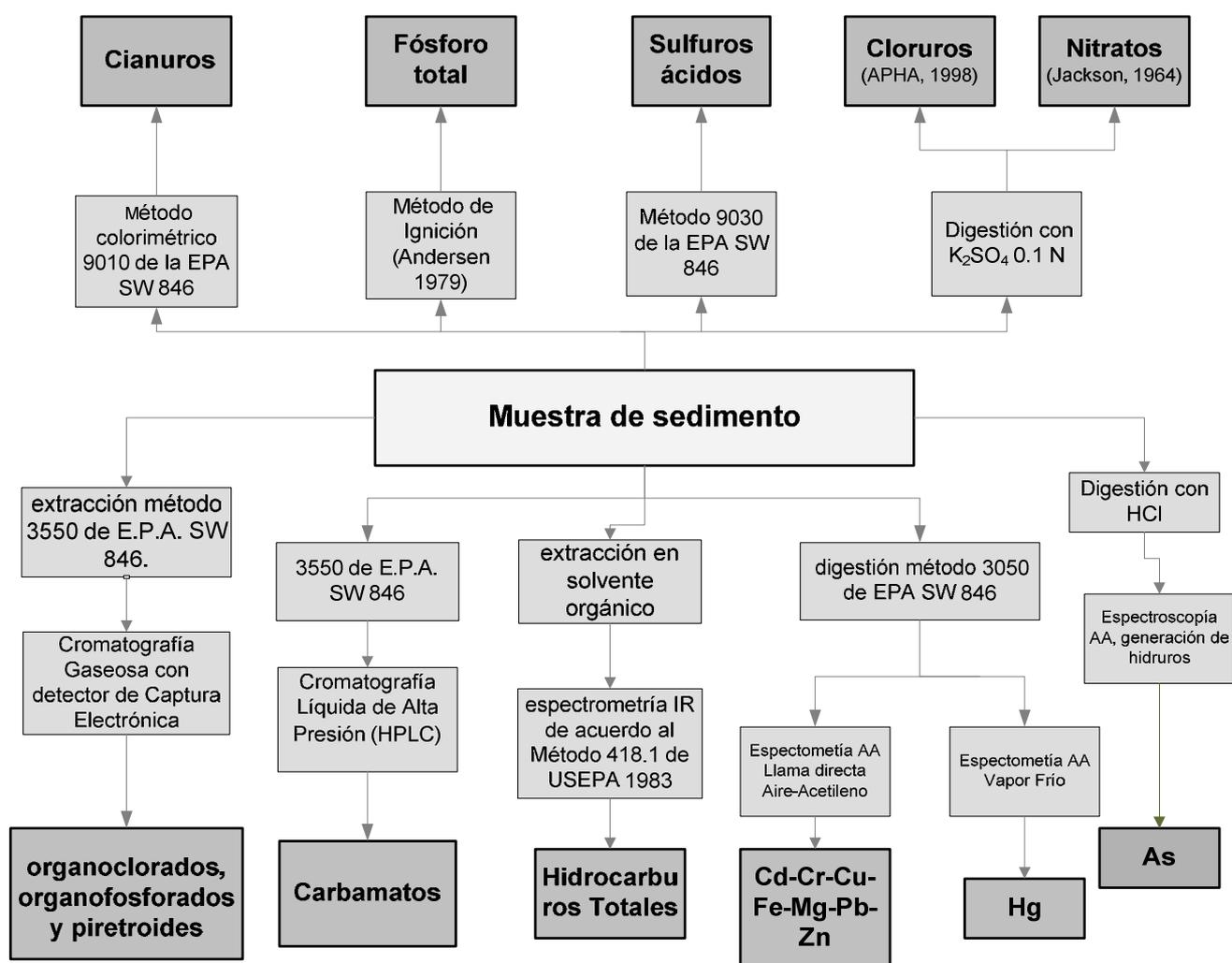


Figura VI.6: Esquema indicando la metodología utilizada en la caracterización química de las muestras de sedimento de los sitios de estudio.

**Granulometría:** se la determinó por tamizado y método de la pipeta para finos (Day, 1965). La metodología realizada fue la siguiente:

- Degradación química de la muestra para la eliminación de los materiales cementantes:  $H_2O_2$  para materia orgánica, HCl para carbonatos.
- Secado a temperatura ambiente. Pesado de la muestra seca (50 g).

- c) Agregado de 50 ml de dispersante (hexametáfosfato de sodio, solución Calgón 5%) y agua destilada
- d) Ebullición de la muestra durante 5 min y agitación durante 2 h.
- e) Separación de la arena en su conjunto de la fracción limo-arcillosa mediante tamiz de 62  $\mu\text{m}$  (malla #230 ASTM), la fracción fina se colectó en probeta de 1000 ml.
- f) Los finos se separaron mediante el método de pipeteo el cual se basa 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 y a una profundidad “h” determinada para cada extracción, a distintos tiempos (Tabla VI.3).
- g) Cada extracción fue vertida en cápsulas (previamente secadas y pesadas), secada en estufa y llevada a peso constante.
- h) Los cálculos se realizaron mediante la siguiente fórmula: cantidad de material de cada tamaño en 1000ml = peso del material de la cápsula – 0,02 \* 50

**Tabla VI.3: Tiempos de obtención de las muestras en el método de pipeteo utilizada en la caracterización granulométrica.**

Phi	Mm	Mm		Profundidad (cm)	h	min.	seg.
4,0	0,063	63		20			58
4,5	----	----		20		1	56
5,0	0,0312	31,2		10		1	56
5,5	----	----		10		3	52
6,0	0,0156	15,6	Limos	10		7	42
6,5	----	----		10		15	
7,0	0,0078	7,8		10		31	
7,5	----	----		10	1	1	
8,0	0,0039	3,9		10	2	3	
8,5	----	----		10	4	5	
9,0	0,00195	1,95	Arcillas	10	8	10	
9,5	----	----		10	16	21	
10,0	0,00098	0,98		10	32	42	
10,5	----	----		5	32	42	
11,0	0,00049	0,49		5	65	25	

**Contenido de humedad y materia orgánica:** el porcentaje de humedad y de materia orgánica se determinaron por cálculo a través de técnica gravimétrica, como pérdida de masa por secado en estufa a 105 °C e ignición en mufla a 550 °C, respectivamente. El porcentaje de carbono orgánico (CO) se estimó utilizando una ecuación (Ball, 1964) en la cual se multiplica la pérdida por ignición por 0,6.

### VI.3.3 Caracterización ecotoxicológica de sedimentos: ensayos de toxicidad con sedimento completo

#### **Metodología general de ensayo**

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

Los recipientes empleados fueron de polipropileno translúcidos, de 500 cm<sup>3</sup> de capacidad cubiertos con tapas plásticas transparentes. Los organismos fueron expuestos al sedimento completo de cada muestra y a diluciones del mismo con sedimento de referencia. El sedimento de cada sitio se diluyó al 75, 50 y 25%. Se utilizó agua declorinada de red como agua sobrenadante en los recipientes, cuya composición se menciona en el capítulo III. Para el caso particular del sedimento proveniente del puerto de Montevideo se utilizó agua con una salinidad de 10 g.L<sup>-1</sup>.

Se utilizaron cinco replicados por concentración para cada muestra ensayada, en cada recipiente se dispusieron 100 ml de sedimento y 175 ml de agua sobrenadante, y se colocaron 10 individuos de 7-14 días de edad, los cuales se obtuvieron de cultivos de laboratorio (ver Capítulo III, Pág. 28). En general se ensayaron tres muestras simultáneamente, utilizando un único grupo de controles negativos (sedimento de referencia). Las exposiciones se realizaron sin aireación y con recambio parcial de agua sobrenadante una vez por día. Los organismos fueron seleccionados de los cultivos 24-48 horas previas al inicio del ensayo de toxicidad y alimentados de la misma forma que en los recipientes de cultivo. Los anfípodos se colectaron con pipeta plástica, se colocaron en los recipientes de ensayo, y se verificó el número y estado de los mismos en todos los recipientes.

Los recipientes se dispusieron en cámara incubadora con fotoperíodo a 16:8 horas luz:oscuridad y una temperatura de 21 ± 1 °C. Los puntos finales medidos fueron supervivencia y crecimiento (longitud). Al finalizar los bioensayos, el sedimento de cada recipiente fue tamizado por una malla para separar los organismos vivos, los cuales fueron fijados en formol (4%) para su medición. Para los controles negativos se determinó una supervivencia >80% para considerarlos válidos. La Tabla VI.4 resume las condiciones empleadas en los ensayos de toxicidad.

**Tabla VI.4: Condiciones generales de ensayos de toxicidad con sedimentos.**

<b>Condiciones</b>	<b>Ensayos con sedimento</b>
<i>Temperatura</i>	21 ± 1 °C
<i>Fotoperíodo</i>	16:8 horas luz/oscuridad
<i>Renovación</i>	Con renovación parcial (60 %) cada 24 h
<i>Recipientes</i>	Plásticos de 500 cm <sup>3</sup> de capacidad
<i>Volumen de sedimento</i>	100 ml
<i>Volumen de agua</i>	175 ml
<i>Agua sobrenadante</i>	Agua no clorada de red (agua de cultivo de <i>H. curvispina</i> )
<i>Nº de organismos</i>	10 por recipiente
<i>Replicados</i>	5 por concentración
<i>Alimentación</i>	Lechuga cada tres días
<i>Aireación</i>	Sin aireación
<i>Duración</i>	10 días
<i>Punto final</i>	Supervivencia y crecimiento
<i>Aceptabilidad</i>	80 % supervivencia en controles negativos

En todos los ensayos de toxicidad realizados se monitorearon al inicio y finalización de cada ensayo los siguientes parámetros fisicoquímicos en el agua sobrenadante que puedan interferir con los efectos biológicos de los contaminantes en el sedimento: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, amonio, dureza y alcalinidad. Se registró diariamente la temperatura, el oxígeno disuelto y se contaron y separaron los organismos muertos. Para realizar las mediciones se utilizó instrumental electrónico (Lutron<sup>®</sup>) con los siguientes electrodos de prueba: pH (YK-2001PH), OD (YK-200PDO) y conductividad (YK-200PCT). Las mediciones de amonio se realizaron utilizando kit comercial Aquamerck<sup>®</sup>. La alcalinidad se determinó por titulación ácido base de acuerdo al método Alcalinidad: método 2320 (APHA, 1998), expresando los resultados en mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>; la dureza por titulación con EDTA de acuerdo al método 2340C (APHA, 1998), expresando los resultados en mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>.

Las muestras de sedimento evaluadas en el presente trabajo fueron diluidas con un sedimento de referencia (A<sup>o</sup> Juan Blanco), cuyo origen fue descrito en el ítem VI.1.2. Se

realizó la misma serie de diluciones para todos los sedimentos ensayados: 0, 25, 50, 75, 100% de sedimento problema. Una vez realizadas las diluciones, el sedimento fue fraccionado en los recipientes de ensayo los cuales fueron dispuestos en la cámara de ensayo durante 48h antes de la incorporación del agua sobrenadante.

En los bioensayos de toxicidad de 10 días con sedimento completo se seleccionaron la supervivencia, como medida de efecto letal, y el crecimiento (como longitud) como medida de efectos subletales. Los puntos finales se determinaron para cada una de las diluciones de sedimento realizadas. Al inicio de cada bioensayo se tomaron sub-muestras de ejemplares (n=20) para la caracterización del grupo inicial (longitud). Una vez finalizada la exposición, los supervivientes se fijaron y preservaron en formaldehído (4%), las medidas de longitud se realizaron con calibre digital ( $\pm 0.01$  mm). Se fijó un valor de porcentaje de supervivencia superior al 50% para la realización de los análisis con la variable longitud.

**Análisis estadístico:** Para evaluar los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Bartlett respectivamente. Los datos de supervivencia en los ensayos con sedimento completo que no cumplieron los supuestos se analizaron utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se realizaron análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar el efecto de las diluciones del sedimento sobre la supervivencia de los organismos a lo largo del tiempo de exposición (Zar, 2010). Se utilizaron las variables concentración del sedimento problema como factor, el tiempo en días como co-variable y la supervivencia (previamente transformada angularmente) como variable de respuesta. Se calcularon los porcentajes de sedimento problema que produjeron una mortalidad del 50 % (CL50) utilizando el método Probit.

Los resultados de crecimiento (longitud) se analizaron utilizando análisis de la varianza (ANOVA) seguida de la prueba a posteriori de Dunnett para determinar diferencias significativas con respecto al control negativo (Zar, 2010). Los datos de longitud fueron transformados a logaritmo antes del análisis. Se trabajó con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se realizaron análisis de componentes principales (ACP) (Hair et al. 1999; Quinn and Keough, 2002) para determinar las correlaciones entre los resultados de toxicidad y las variables fisicoquímicas del sedimento. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando herramientas de los *softwares* STATISTICA (Stat Soft, Inc. 2001; versión 7) y XL-STAT (Addinsoft 2005; versión 7.5.3).

## VI.4 Resultados

### VI.4.1 Sedimentos del Río de la Plata y arroyos afluentes (Grupo A)

#### Caracterización química

En la composición granulométrica (Tabla VI.5) del sedimento correspondiente a los sitios de muestreo se encuentra un mayor contenido de limos y arcillas en J. Blanco, Río Luján, Canal Oeste, A<sup>o</sup> El Pescado y Puerto Montevideo; y un contenido importante de arenas con variación en las proporciones de limos y arcillas en Riachuelo y Blanco Uruguay. Los sedimentos estudiados se pueden clasificar en las siguientes clases texturales: J. Blanco, Canal Oeste y A<sup>o</sup> El Pescado franco-arcillo-limoso; Río Luján, Riachuelo y Puerto Montevideo franco-limoso; A<sup>o</sup> del Gato arcillo-limoso y Blanco Uruguay arcillo arenoso (Figura VI.7). La composición granulométrica del Puerto de Montevideo concuerda con los porcentajes encontrados en la bahía de Montevideo por Muniz *et al.* (2004).

Tabla VI.5: Composición granulométrica (% p/p) de los sedimentos de los sitios de estudio.

Fracción granulométrica	JB <sup>a</sup>	RL	RIA1	CO1	AG	AP	BU	PM
Arena	14,8	15,8	39,5	18,6	4,2	10,2	48,8	3,6
Limo	48,7	61,5	53,5	43,4	47,7	29,9	13,7	80,5
Arcilla	36,4	21,9	7,0	37,5	48,1	59,9	37,5	14,5

<sup>a</sup> Sedimento de referencia

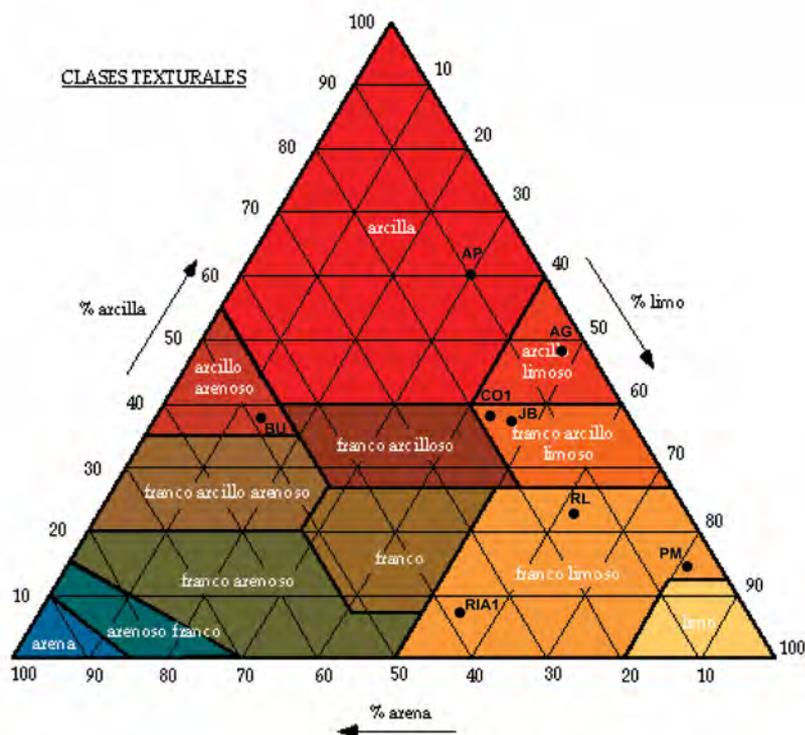


Figura V.7: Triángulo de clases texturales en base a las proporciones de arena, limo y arcilla de las muestras de los sitios de estudio

En la Tabla VI.6 se presentan los valores de los parámetros químicos en las muestras de sedimento analizadas, las concentraciones se refieren a masa seca ( $\text{mg.Kg}^{-1}$ ). Las muestras presentaron contenidos muy variables de materia orgánica encontrándose valores entre 1,7 y 22,0%, con excepción de la muestra del puerto de Montevideo cuyo valor es de 37,4%. No se detectó sulfuro en sedimentos del A<sup>o</sup> Juan Blanco y Río Luján, por el contrario se encontraron niveles de hasta 1,3 y 3  $\text{g.Kg}^{-1}$  en los sedimentos del Canal Oeste, Riachuelo y Puerto de Montevideo. Los sedimentos del A<sup>o</sup> del Gato, El Pescado y el sedimento blanco de Uruguay presentaron concentraciones intermedias entre los dos grupos de muestras mencionados anteriormente. A su vez se detectó un alto nivel de fósforo total y contaminación por cianuros en las muestras del Canal Oeste y Riachuelo. Los sitios de muestreo contienen valores elevados de materia orgánica en relación a los observados en estudios previos en las desembocaduras de algunos arroyos de la costa sudoeste del Río de la Plata (Del Gato, El Pescado, Carnaval, Martín) (Ronco *et. al.* 2001).

**Tabla VI.6: Parámetros generales en las muestras de sedimentos de los sitios JB, RL, RIA1, CO1, AG, AP, BU y PM:** carbono orgánico (CO) y humedad; pH; cianuros, cloruros, nitratos, sulfatos, sulfuros, sodio y potasio y P total ( $\text{mg.Kg}^{-1}$  masa seca).

Compuesto	JB	RL	RIA1	CO1	AG	AP	BU	PM
CO (%)	7,32	1,68	7,80	12,9	10,38	6,96	22,4	37,4
Humedad (%)	67,8	38,7	61,9	90,5	57,4	46,0	51,3	61,0
pH	6	6	6,5	6	7	7	7	8
Cianuros	<1	<1	15,9	33,1	<1	<1	5,7	3,2
Cloruros	117,8	95,8	19,6	3026	6.774	2.535	29.689	84.760
Nitratos	1,63	1,02	0,16	9,47	19,3	12,9	9,80	29,6
Sulfatos	462	566	176	1178	Nd	Nd	Nd	Nd
Sulfuros	<2,5	<2,5	2923	1343	278	178	550	1939
P total	469	539	Nd	5334	442	545	140	264

Nd: no determinado

La Tabla VI.7 muestra las concentraciones de metales e hidrocarburos totales medidos en los sedimentos de los sitios de muestreo. Los valores medios del contenido de metales mayoritarios muestran el siguiente orden de abundancia: Fe > Ca > K > Mg > Mn > Na, encontrándose concentraciones en un intervalo de al menos dos órdenes de magnitud entre el de mayor y menor abundancia. Las muestras de sedimento del Canal Oeste y el puerto de Montevideo siempre presentaron los valores más elevados. En relación a las

concentraciones de metales minoritarios, existe mayor variabilidad entre las muestras evaluadas. Tomando como referencia los niveles de metales pesados en el A<sup>o</sup> Juan Blanco, se observan incrementos de un orden de magnitud para el Pb, Zn y As en relación a los cursos mas contaminados (Riachuelo, Canal Oeste y Pto. Montevideo); en el caso del Cu y Cr los valores en el sitio de referencia fueron hasta 2 y 3 ordenes de magnitud menores respectivamente, en relación a dichos sitios. Por otra parte, los valores de Cr, Pb, Cd y Hg detectados en el Riachuelo, Canal Oeste y el Puerto de Montevideo superan ampliamente las concentraciones de dichos metales en el Arroyo Del Gato y El Pescado, que también presentan niveles de contaminación elevados.

**Tabla VI.7 : Valores de concentraciones (mg.kg<sup>-1</sup> masa seca) de metales e hidrocarburos totales (HC Tot) en las muestras de sedimento de los sitios JB, RL, RIA1, CO1, AG, AP, BU y PM.**

Compuesto mg/Kg	JB	RL	RIA1	CO1	AG	AP	BU	PM
Al	Nd	Nd	Nd	Nd	34.921	46.570	100.550	101.826
Ca	6.680	4.857	8.258	12.994	Nd	Nd	Nd	Nd
Mg	1.690	822	1.784	5.972	1.027	2.929	940	5.356
Fe	24.301	16.653	27.585	34.263	6.410	11.718	36.274	52.028
Na	345	418	912	3.026	594	1562	3.135	9.181
K	4.556	2.326	3.066	5.436	3.243	3.906	2687	7.561
As	9,0	3,4	15,1	18,2	<0,35	0,35	1,05	1,90
Cd	1,0	<1,0	2,4	3,2	1,08	<1,0	<1,0	<1,0
Cr	<2,5	20,3	1141	<2,5	27,0	19,4	40,3	436
Cu	15,8	7,9	136,2	55,8	32,4	15,6	31,4	107,1
Hg	0,6	<0,1	1,9	6,8	0,11	0,04	3,1	5,4
Ni	7,1	3,6	19,8	39,7	10,8	15,6	13,4	30,7
Pb	37,3	33,4	205	125	54,0	27,2	<15	<15
Zn	69,9	44,3	707	387	97,6	195	9,0	291
HC Tot	<200	<200	286	22.361	<200	<200	<200	354

Nd: no determinado

Las concentraciones de Fe y Mn encontradas en los sedimentos de fondo de los sitios estudiados están dentro de los valores encontrados en arroyos afluentes del Río Paraná (Ronco *et al.* 2007; SMAyDS, 2006) y de la planicie costera del Río de la Plata (Camillion *et al.*, 2003), con excepción del sedimento del Puerto de Montevideo, que exhibe un contenido mayor de Fe a los encontrados en los cuerpos de agua de la región. Los niveles elevados de concentraciones de la mayoría de los metales y la presencia de HC en las muestras del Canal Oeste, Riachuelo y Puerto de Montevideo están relacionadas con la existencia de

fuentes de contaminación en dichos sitios. La concentración de Cr en el Riachuelo muy por encima de los valores de base encontrados, es consistente con la presencia de curtiembres e industrias metalúrgicas que liberan sus efluentes al cuerpo de agua. Los niveles de Cr en este sitio son del mismo orden de magnitud a los encontrados en estudios previos por Kreimer *et al.* (1996), lo cual indica que se mantienen los mismos niveles de contaminación a lo largo del tiempo. Por otro lado los valores elevados de Hg e hidrocarburos en los sedimentos del Canal Oeste se relacionan con la presencia de industrias petroquímicas y refinerías de petróleo instaladas hace décadas en la zona. El sedimento del Puerto de Montevideo mostró concentración elevadas de la mayoría de los metales analizados con excepción del Pb y Cd. En estudios previos de la Bahía de Montevideo se encuentran valores en los mismos órdenes de magnitud para casi todos los metales estudiados (Moresco & Dol, 1996; Muniz *et al.*, 2002, 2004), con excepción del Hg, que presentó niveles de un orden de magnitud mayor en la muestra correspondiente al presente trabajo. Los niveles de metales e HC encontrados en este sitio están relacionados con la presencia de medianas y grandes industrias (central termoeléctrica importante y refinería de petróleo) (ver detalle en la descripción del sitio de estudio de este Capítulo).

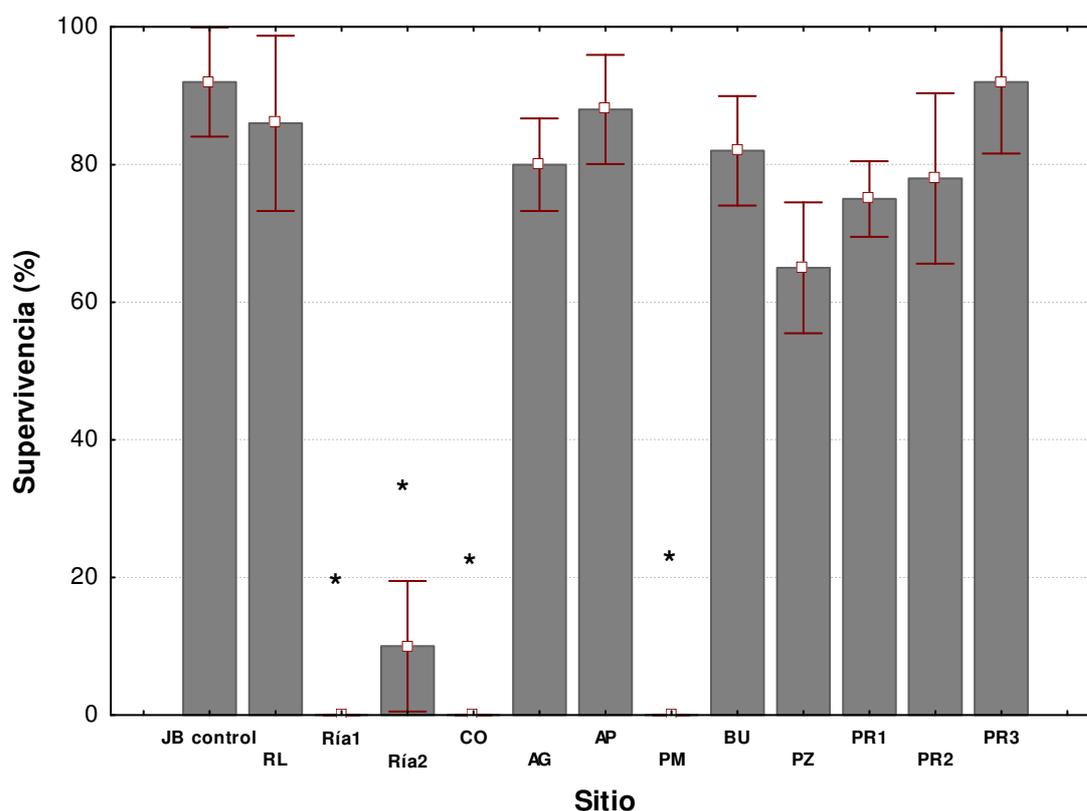
El A<sup>o</sup> del Gato atraviesa la zona urbana de la ciudad de La Plata, siendo considerado un cuerpo de agua con importante grado de deterioro en relación a otros arroyos en la zona de estudio (Ronco *et al.*, 2001). Los valores de Cr, Cu y Pb encontrados en sedimentos en estudios previos estuvieron en rangos entre 20 y 85, 24 y 133, y 20 y 200 mg.Kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Ronco *et al.*, 2001; Ronco *et al.*, 2007). Los valores de dichos metales en el presente trabajo estuvieron en los mismos intervalos de concentración a los citados anteriormente. En relación a los sitios estudiados, el A<sup>o</sup> del Gato presentó niveles siempre de un orden de magnitud menor a los sitios más contaminados.

Las muestras provenientes del Canal Oeste, Riachuelo y Puerto de Montevideo presentaron niveles detectables de hidrocarburos totales, encontrándose una concentración de 22.361 mg.kg<sup>-1</sup> en sedimentos del Canal Oeste, mientras que en las muestras restantes las concentraciones fueron dos órdenes de magnitud menores. Las concentraciones de plaguicidas estuvieron mayormente por debajo del límite de detección (2,2 µg.Kg<sup>-1</sup>) en todos los sitios, excepto en los que se detallan a continuación: en la muestra del Río Luján se detectaron cipermetrina (272,2 µg.Kg<sup>-1</sup>) y clorpirifos (36,8 µg.Kg<sup>-1</sup>); en Riachuelo se encontró endosulfán (3,3 µg.Kg<sup>-1</sup>); en el Canal Oeste se detectaron p,p'-DDT (15,9 µg.Kg<sup>-1</sup>) y cipermetrina (6,7 µg.Kg<sup>-1</sup>). En el A<sup>o</sup> Juan Blanco se encontró aldrín (2,7 µg.Kg<sup>-1</sup>) y en el Puerto de Montevideo se detectó una concentración elevada de heptacloro (22.059 µg.Kg<sup>-1</sup>). Las concentraciones de plaguicidas encontrados en la desembocadura del Río Luján se

puede asociar al uso agrícola de la tierra en las márgenes del río a lo largo de todo su recorrido. Los valores de cipermetrina y clorpirifos, los dos insecticidas de mayor significancia regional, son incluso mayores a los encontrados en sedimentos de cuerpos de agua en zonas de producción de soja (Marino & Ronco, 2005).

### **Bioensayos de toxicidad: resultados de supervivencia**

Los resultados de la supervivencia de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en los bioensayos de toxicidad con sedimento completo (sin diluir) de los sitios de estudio se muestran en la Figura VI. 8. El mayor porcentaje de supervivencia promedio fue de 92 % y corresponde al sedimento de referencia seleccionado en este trabajo (A<sup>o</sup> Juan Blanco). Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis muestran diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras del Riachuelo, Canal Oeste y el Puerto de Montevideo y el sedimento de referencia (A<sup>o</sup> Juan Blanco).



**Figura VI.8: Valores promedio y desvío estándar del porcentaje de supervivencia de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a los sedimentos del área de estudio correspondientes a afluentes del Río de la Plata (grupo A). \* indica diferencias significativas con el grupo control ( $p < 0,05$ ).**

Los parámetros de calidad del agua sobrenadante (pH, OD, conductividad, dureza y alcalinidad) de los bioensayos de toxicidad correspondientes a los días 1 y 10 de exposición se muestran en las Tablas 4 y 5 en el Anexo. Los valores de pH, conductividad y dureza se

mantuvieron constantes durante el tiempo de exposición, mientras que el OD fue más variable permaneciendo siempre por encima de los valores recomendados ( $<2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (USEPA, 2000).

Los resultados de supervivencia de los anfípodos expuestos a las series de diluciones realizada con los sedimentos evaluados se muestran en la Tabla VI.8. Como se puede observar en la Figura VI.8 los sedimentos sin diluir (100%) del Canal Oeste, Riachuelo y Puerto de Montevideo indujeron una mortalidad del 100%. Sin embargo la respuesta fue variable para las tres muestras en el resto de las concentraciones ensayadas, los valores de CL50 (límites de confianza) para cada sitio fueron: 65,4% (56,5-71,4) para el Riachuelo, 14,5% (2,1-24,8) para Canal Oeste y 21,3% (9,8-29,7) para el Puerto de Montevideo. Las muestras del Canal Oeste y del Puerto de Montevideo indujeron disminuciones significativas en la supervivencia aún en una dilución del 25%. La muestra del Riachuelo en las concentraciones 25 y 50% también causó disminuciones significativas en la supervivencia, pero el porcentaje de efecto fue menor que en la muestra del Canal Oeste y Puerto Montevideo, lo cual se evidencia en las diferencias entre las CL50 de los sedimentos.

**Tabla VI.8: Porcentaje de supervivencia (promedio  $\pm$ DS) de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a los sedimentos del área de estudio (grupo A) en las diferentes diluciones con el sedimento de referencia.**

Sitio	% Sedimento				
	Sedimento Referencia	25%	50%	75%	100%
RL	92 $\pm$ 8	98 $\pm$ 4	92 $\pm$ 8	92 $\pm$ 8	90 $\pm$ 10
RIA	92 $\pm$ 8	72 $\pm$ 14*	72 $\pm$ 18*	22 $\pm$ 20*	0 $\pm$ 0*
CO	92 $\pm$ 8	28 $\pm$ 14*	13 $\pm$ 10*	16 $\pm$ 10*	0 $\pm$ 0*
AG	88 $\pm$ 8	Ne	86 $\pm$ 11	Ne	80 $\pm$ 7
PM	85 $\pm$ 18	33 $\pm$ 5*	20 $\pm$ 7*	6 $\pm$ 5*	0 $\pm$ 0*
PZ	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	96 $\pm$ 9	90 $\pm$ 8	70 $\pm$ 2
PR1	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	98 $\pm$ 8	92 $\pm$ 7	75 $\pm$ 5

\* indica diferencias significativas con el sedimento de referencia ( $p < 0,05$ ).

Ne: no ensayado

El análisis general realizado (ver Figuras VI.9 y 10) con los datos obtenidos de los efectos letales, expresados como supervivencia en el experimento completo con las muestras Riachuelo y Canal Oeste (ANCOVA), muestran incidencia de los dos factores estudiados (concentración de sedimento problema y tiempo de exposición), sobre la supervivencia ( $p < 0,000$ ) y la interacción entre ambos cuando se consideran como covariables la

concentración y el tiempo, en las dos muestras ensayadas. En el análisis de cada muestra por separado se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba a posteriori de Dunnet para cada tiempo de exposición, entre las distintas concentraciones. Los resultados del análisis para la muestra del Canal Oeste muestran diferencias significativamente en la supervivencia con respecto al grupo control para las cuatro concentraciones a partir de las 24h de exposición. En la muestra del Riachuelo se evidencian diferencias significativas en todas las concentraciones a partir de las 72h de exposición, siendo estas diferencias significativas para las concentraciones 75 y 100% a partir de las 24h (Tabla VI.9).

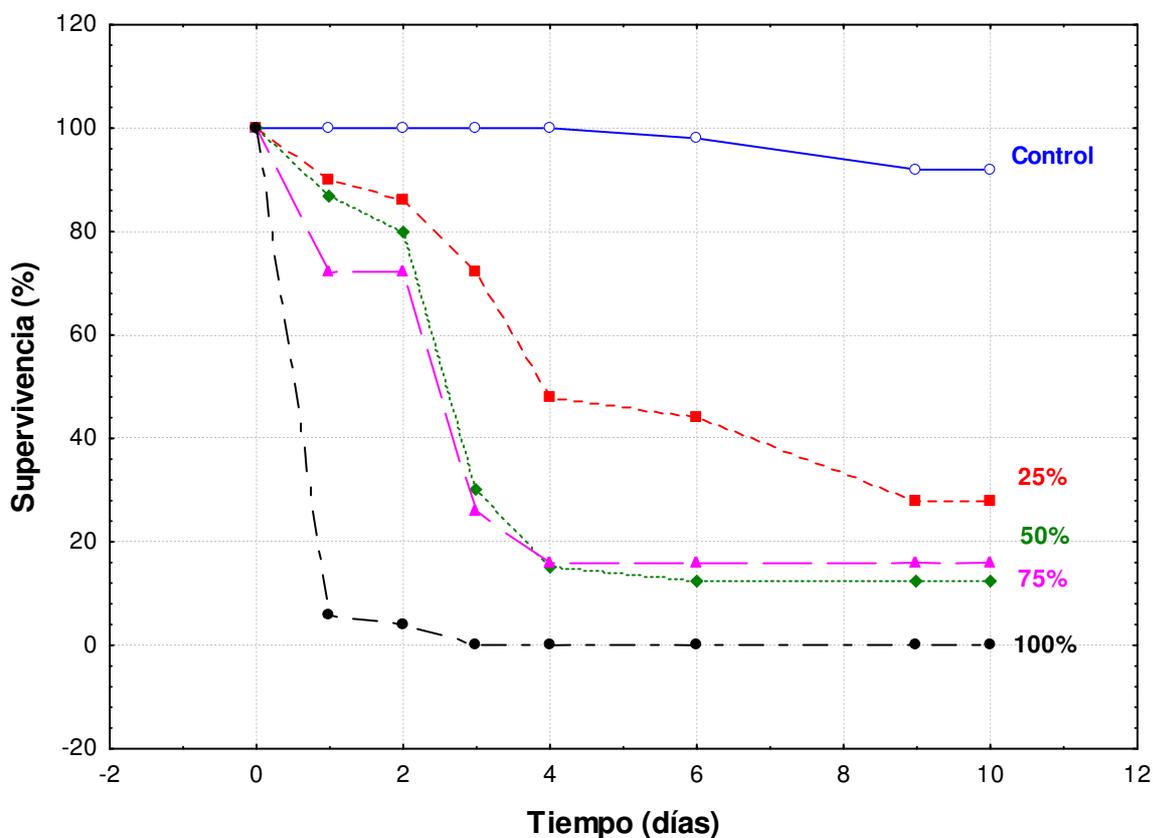
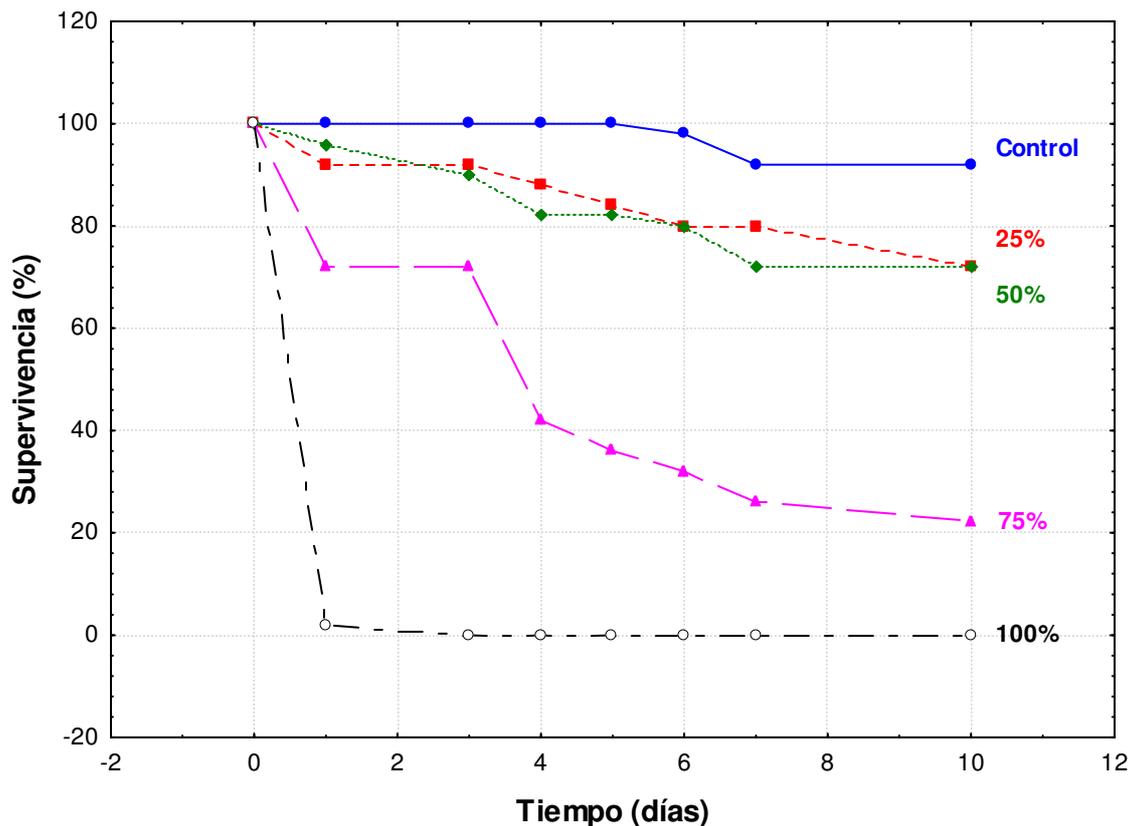


Figura VI.9: Porcentaje de supervivencia de *H. curvispina* en función del tiempo de exposición para las cuatro diluciones del sedimento del sitio Canal Oeste (CO).



**Figura VI.10: Porcentaje de supervivencia de *H. curvispina* en función del tiempo de exposición para las cuatro diluciones del sedimento del sitio Riachuelo (RIA).**

Los efectos tóxicos generados por las muestras sin diluir se evidenciaron a las 24 h de exposición, provocando una disminución máxima en la supervivencia con respecto al grupo control en ambas muestras. Este comportamiento es similar en los bioensayos con la muestra diluida en un 25%, generando una disminución máxima en la supervivencia para la muestra del Canal Oeste entre las 24 y 96 h (Figura VI.9); sin embargo en esta misma dilución el comportamiento de la variable en la muestra Riachuelo fue más gradual, evidenciándose la máxima disminución en la supervivencia al tiempo final de exposición (Figura VI.10). Por otro lado la muestra diluida a la mitad (50%) del sedimento Canal Oeste generó el mismo tipo de respuesta que la dilución anterior, llegando a inducir la mayor disminución en la supervivencia de los anfípodos a las 96 h de exposición. La mayor dilución de sedimento evaluada para esta muestra provocó una respuesta más gradual a lo largo del tiempo en relación a las menores diluciones, siendo la supervivencia del 28% al tiempo final. La supervivencia de los anfípodos en la exposición al sedimento de Riachuelo en las mayores diluciones se comportó de forma similar durante el tiempo de ensayo, disminuyendo gradualmente hasta un valor de 72% al tiempo final de exposición.

**Tabla VI.9: Resultados del ANOVA (valores de significancia p) para la supervivencia de *H. curvispina* en las distintas diluciones en función del tiempo de exposición a los sedimentos del Riachuelo (RIA) y Canal Oeste (CO) con respecto al grupo control. En cursiva se indican los valores significativos ( $p < 0,05$ )**

	Tiempo (días)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>RIA</b>										
<b>25 %</b>	0,07563	0,05486	0,06703	0,04118	<i>0,00318</i>	<i>0,01087</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,01013</i>	<i>0,01013</i>	<i>0,00025</i>
<b>50 %</b>	0,29606	0,25979	0,01935	<i>0,00282</i>	<i>0,00107</i>	<i>0,00636</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00099</i>	<i>0,00099</i>	<i>0,00024</i>
<b>75 %</b>	<i>0,00011</i>	<i>0,00005</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>
<b>100 %</b>	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>
<b>Total</b>	<i>0,00000</i>									
<b>CO</b>										
<b>25 %</b>	--	<i>0,01692</i>	<i>0,01106</i>	<i>0,00182</i>	<i>0,00182</i>	<i>0,00105</i>	<i>0,00104</i>	<i>0,00104</i>	<i>0,00014</i>	<i>0,00014</i>
<b>50 %</b>	--	<i>0,01113</i>	<i>0,00062</i>	<i>0,00027</i>	<i>0,00027</i>	<i>0,00020</i>	<i>0,00020</i>	<i>0,00020</i>	<i>0,00017</i>	<i>0,00017</i>
<b>75 %</b>	--	<i>0,00034</i>	<i>0,00003</i>	<i>0,00003</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>	<i>0,00002</i>
<b>100 %</b>	--	<i>0,00002</i>								
<b>Total</b>	--	<i>0,00000</i>								

### **Bioensayos de toxicidad: resultados de crecimiento**

El crecimiento de los anfípodos, como longitud del cuerpo, fue evaluado en las muestras de sedimento ensayadas que mostraron una supervivencia mayor al 50% en todos los replicados ensayados. La Tabla VI.10 (resultados de tres ensayos de toxicidad), muestra la longitud promedio de los anfípodos con sedimentos de los sitios Río Luján, Zárate y A<sup>o</sup> del Gato luego de 10 días de exposición. Los organismos expuestos en los ensayos con sedimentos del A<sup>o</sup> del Gato fueron de mayor edad que los expuestos en el resto de los bioensayos. Los anfípodos expuestos a los sedimentos control (sedimento de referencia JB) de los bioensayos de toxicidad con muestras del Río Luján y Zárate evidenciaron un crecimiento promedio entre 20 y 22% respecto del grupo inicial luego de diez días de exposición.

Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas en el crecimiento de los anfípodos expuestos a las concentraciones más altas en los sedimentos de las muestras Río Luján y A<sup>o</sup> del Gato, evidenciándose aumentos entre el 7 y 10% con respecto al grupo control en ambos casos, lo cual indica una disminución en el crecimiento de más del 50% en relación a los del grupo control. Los sedimentos completos de Río Luján, Zárate y A<sup>o</sup> del Gato no indujeron efectos letales, sin embargo las muestras Río Luján y A<sup>o</sup> del Gato

provocaron efectos subletales sobre los organismos expuestos al sedimento durante 10 días.

**Tabla VI.10: Longitud (promedio  $\pm$ DS, n entre paréntesis) de *H. curvispina* al tiempo final de exposición para el sitio control y cuatro concentraciones de los sedimentos de los sitios Río Luján (RL), Zárate (PZ) y Aº del Gato (AG).**

Sitio	% Sedimento				
	Sedimento Referencia	25%	50%	75%	100%
<b>RL</b>	2,92 $\pm$ 0,40 (46)	2,81 $\pm$ 0,48 (44)	2,70 $\pm$ 0,42 (42)	2,45 $\pm$ 0,37* (37)	2,58 $\pm$ 0,37* (43)
<b>PZ</b>	2,84 $\pm$ 0,35 (30)	2,67 $\pm$ 0,36 (30)	2,95 $\pm$ 0,4 (30)	2,54 $\pm$ 0,43 (28)	2,53 $\pm$ 0,29 (27)
<b>AG</b>	5,74 $\pm$ 0,55 (35)	Ne	5,31 $\pm$ 0,71* (40)	Ne	4,87 $\pm$ 0,73* (35)

\* indica diferencias significativas con el sedimento de referencia ( $p < 0,05$ ).

Ne: no fueron ensayados

### ***Análisis de componentes principales***

Para explorar el grado de correlación entre los resultados de los datos toxicológicos y los parámetros fisicoquímicos de las muestras de sedimentos evaluadas se utilizó análisis de componentes principales (ACP). En el análisis no se incluyeron las variables Hidrocarburos y Plaguicidas debido a que presentaron valores por debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras analizadas. Los resultados fisicoquímicos ( $n=12$ ) y toxicológicos ( $n=1$ ) de todas las muestras de sedimento sin diluir, fueron integrados por medio del análisis de componentes principales. El criterio de selección de los factores fue que los valores propios fuesen mayores a 1 (Quinn & Keough, 2002), por lo tanto se trabajó con los tres primeros factores, (en adelante: F1, F2 y F3) los cuales explican el 91,0% de la varianza inicial total (Tabla VI.11). El F1 fue el predominante ya que explica el 57,7% de la varianza total, mientras que el F2 y F3 explican el 20,4 y 12,9% respectivamente.

**Tabla VI.11: Coeficientes de correlación de las 13 variables utilizadas en el análisis multivariado con cada uno de los factores principales para las muestras del Grupo A. Los valores resaltados mostraron una correlación significativa con el factor.**

	F1	F2	F3
% Varianza	57,7	20,4	12,9
Valor propio	7,50	2,65	1,68
<b>Sulfuros</b>	<b>0,918</b>	0,214	0,328
<b>Pb</b>	<b>0,819</b>	-0,552	0,093
<b>Cr</b>	<b>0,734</b>	-0,029	0,665
<b>Cd</b>	<b>0,739</b>	-0,528	-0,393
<b>Ni</b>	<b>0,742</b>	0,441	-0,466
<b>Cu</b>	<b>0,854</b>	0,289	0,403
<b>Zn</b>	<b>0,938</b>	-0,131	0,204
<b>As</b>	<b>0,799</b>	-0,395	-0,308
<b>Hg</b>	0,631	0,572	-0,456
<b>P total</b>	<b>0,881</b>	-0,352	-0,292
<b>% CO</b>	0,179	<b>0,969</b>	0,051
<b>% Finos</b>	-0,290	0,170	-0,383
<b>Mortalidad</b>	<b>0,903</b>	0,395	-0,103

El Factor 1 agrupa los sulfuros, el P total y la mayoría de los metales junto con la mortalidad. El Factor 2 agrupa las variables % CO, y en menor medida los metales Hg, As, Pb y Cd. Las Figuras VI.11 y VI.12 muestran los resultados del análisis de ACP tomando los valores de las variables fisicoquímicas de todas las muestras. El ACP discriminó tres grupos, el grupo 1 formado por las muestras A<sup>o</sup> Juan Blanco, Río Luján, A<sup>o</sup> del Gato y El Pescado y Blanco Uruguay; mientras que el grupo 2 incluye las muestras de Canal Oeste y Riachuelo y el grupo 3 incluye solo la muestra de sedimento del Puerto de Montevideo. El grupo 2 fue discriminado por el análisis a partir de los valores específicos de las variables fisicoquímicas sulfuros, Cr, Cu, Zn, Ni, Hg y por la variable mortalidad, es decir por los Factores 1 y 3 (Figura VI.13), sugiriendo que la toxicidad en estos sitios está relacionada con dichos contaminantes. Por otro lado las variables que contribuyen a la separación de la muestra del Puerto de Montevideo (grupo 3) del resto corresponden principalmente al % CO y mercurio, los cuales aportan variabilidad al factor 2 (Figura VI.13).

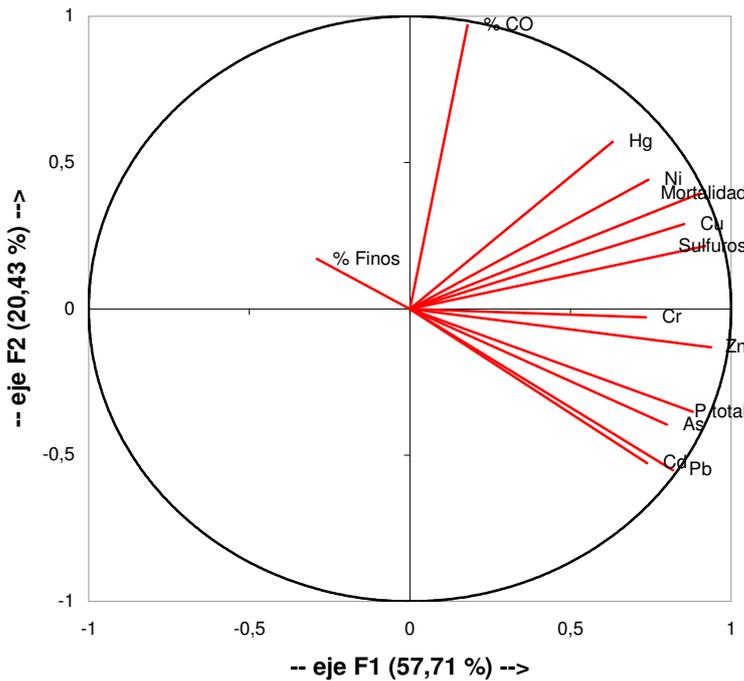


Figura VI.11: Diagrama en dos dimensiones del Análisis de Componentes Principales con dos componentes que explican el 75,6% de la varianza total correspondiente a la distribución de las variables y su correlación parcial de las muestras del grupo A

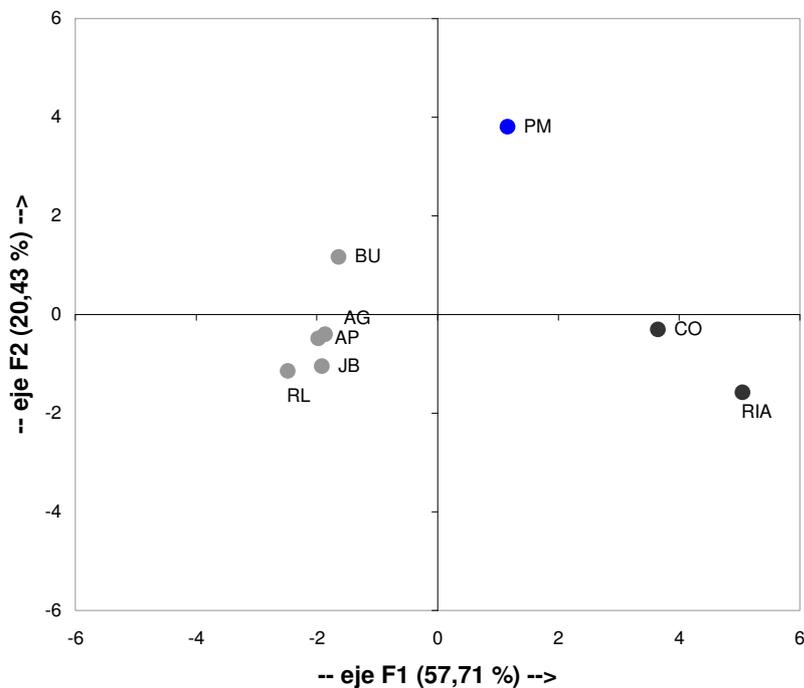


Figura VI.12: Diagrama en dos dimensiones del Análisis de Componentes Principales con dos componentes que explican el 75,6% de la varianza total correspondiente a los sitios de muestreo del grupo A.

El hecho de que un factor explique las características de contaminación y toxicidad de un sitio en particular depende de las coordenadas de las observaciones (*Factor scores*) dadas por el ACP. Los factores son representativos de las características de una muestra o de los procesos que tienen lugar en ella, cuando su *factor score* es  $>0$  para esa muestra en particular. La distribución de los *factor scores* para los 8 sitios evaluados se muestra en la Figura VI.14. Se puede observar que el F1 fue el predominante en las muestras Riachuelo y Canal Oeste y en menor medida en Puerto Montevideo. El F2 fue dominante en Puerto de Montevideo, pero también fue positivo en la muestra Blanco de Uruguay. El F3 fue importante en Canal Oeste, y en menor medida en Blanco Uruguay y Puerto de Montevideo.

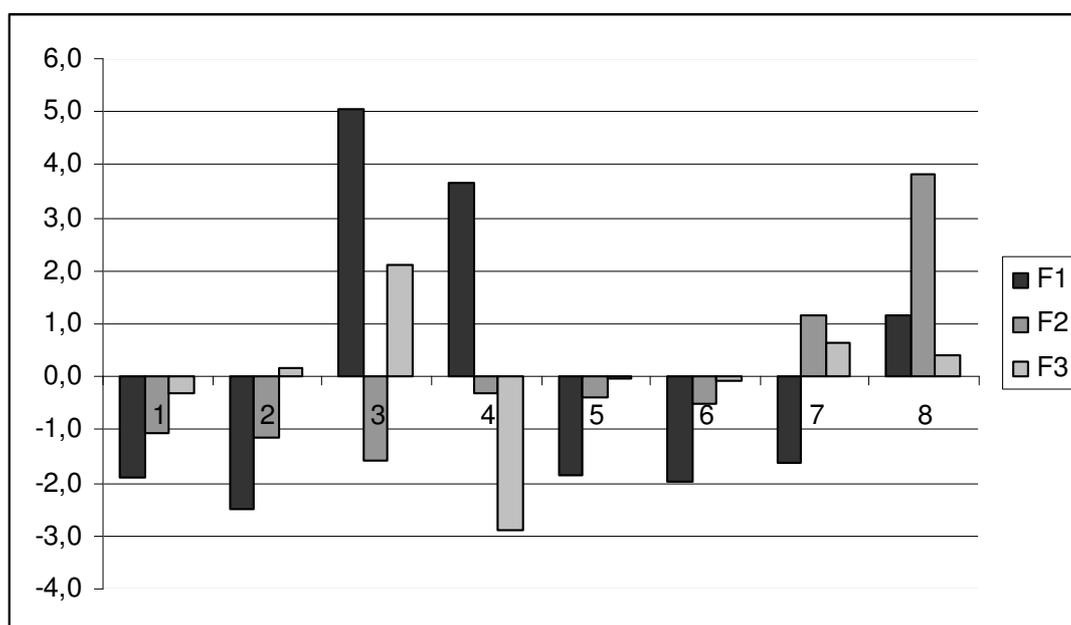


Figura VI.13: Coordenadas de las observaciones de los tres factores (F1, F2 y F3) obtenidos del análisis de componentes principales en los 8 sitios. Referencias: 1, JB; 2, RL; 3, RIA; 4, CO; 5, AG; 6, AP; 7, BU; 8, PM.

#### VI.4.2 Sedimentos de la Cuenca del Río Luján (Grupo B)

##### **Caracterización química**

La composición granulométrica (Tabla VI.12) del sedimento correspondiente a los sitios del Río Luján muestra una mayor proporción de limos en todas las muestras analizadas. Los sedimentos se pueden clasificar en la clase textural franco-limosa en todos los sedimentos estudiados.

La Tabla VI.11 Muestra los parámetros fisicoquímicos medidos en las muestras de sedimentos correspondientes a la cuenca del Río Luján. Los sedimentos presentaron un

contenido de carbono orgánico uniforme, obteniéndose valores entre 1,62 y 7,26%, con excepción de la muestra del sitio Reserva Pilar que presentó un contenido mayor (13,92%). Los contenidos de MO detectados en este trabajo son similares a los encontrados en estudios previos correspondientes a algunos de los puntos de muestreo aquí analizados (Di Marzio *et al.*, 2005). Se detectaron niveles de sulfuros en la mayoría de las muestras (entre 20 y 310 mg.Kg<sup>-1</sup>), con excepción de la muestra del Aº Larena (Pilar), donde se detectó una concentración de 1.409 mg.Kg<sup>-1</sup>, lo cual se evidenciaba por el color oscuro del sedimento. Los niveles de Fe en las muestras estuvieron entre 14,4 y 32,8 g.Kg<sup>-1</sup>; en este caso la excepción también fue el Aº Larena donde su concentración fue de 68,3 g.Kg<sup>-1</sup>, es decir el doble del mayor valor encontrado en el resto de las muestras evaluadas.

En el caso de los otros metales analizados, las concentraciones fueron más variables, con contenidos elevados en relación a niveles de referencia para el Cr, Cu, Pb, Zn y Hg en algunos de los sitios. La muestra del Puente 3 de Marzo, en la ciudad de Mercedes, presentó niveles elevados para los metales antes mencionados, con excepción del Hg, el cual estuvo por debajo del límite de detección. Como se mencionó en la Introducción esta zona urbana descarga efluentes al río tanto industriales como domésticos, estos últimos sin tratamiento previo. El sitio Club Timón en la localidad de Jáuregui presentó concentraciones elevadas para el Cr, Zn, y Pb, niveles que se pueden atribuir a vertidos de una importante curtiembre radicada en la zona. El Aº Larena se estudió aguas arriba y aguas abajo del Polo Industrial de Pilar, cuyas industrias se encuentran ubicadas atravesando sus aguas (Rodríguez *et al.*, 2008). En el sector aguas abajo se encontraron valores elevados de Cu, Zn, Pb y Cr.

La mayoría de los plaguicidas analizados en las muestras de sedimentos del Río Luján estuvieron por debajo de sus límites de detección, con excepción de cipermetrina y heptaclorohepóxido, para los cuales se encontraron niveles detectables en algunas de las muestras evaluadas. Las muestras de los sitios Ruta 41, Aº Leones y Durazno, Pte. García, Pte. Olivera, Pte. Las Tropas, Club El Timón, Ruta 9 (Escobar) y El Carmel (Pilar) presentaron valores de cipermetrina entre 3,55 y 66,4 µg.Kg<sup>-1</sup>, con un valor promedio de 25,0 µg.Kg<sup>-1</sup>. En las muestras correspondientes a Ruta 41, reserva Pilar, Ruta 8, Aº Larena, Ruta 6, Ruta 9 (Escobar) y El Carmel (Pilar), se encontraron concentraciones de heptacloroepóxido entre 5,36 y 21,4 µg.Kg<sup>-1</sup>.

Tabla VI.12: Composición granulométrica de los sedimentos de los sitios de estudio del Río Luján

Composición granulométrica	Sitio																
	ADS	ALS	PG	P3M	R41	PO	TJ	PLT	PABL	AORL	PR6	R8P	ALA	RP	ALD	R9E	CP
<b>Arena</b>	30,2	16,5	25,2	29,0	Nd	23,2	24,8	Nd	31,7	30,6	21,7	21,5	Nd	17,4	19,7	27,6	20,8
<b>Limo</b>	61,3	80,3	66,2	61,8	Nd	63,0	64,9	Nd	55,4	62,1	65	73,9	Nd	69,0	52,0	56,1	73,9
<b>Arcilla</b>	8,6	3,4	6,0	8,5	Nd	13,7	9,8	Nd	8,6	7,3	13,9	4,8	Nd	12,2	27,8	15,4	23,6

Nd: no determinada

**Tabla VI.13: Parámetros fisicoquímicos en las muestras de sedimentos de los sitios del Río Luján.** CO %: % de carbono orgánico; Sulfuros, Nitrógeno Total y Fósforo Total (mg.Kg<sup>-1</sup> masa seca); metales (mg.Kg<sup>-1</sup> masa seca).

Variable	Sitio																
	ADS	ALS	PG	P3M	R41	PO	TJ	PLT	PABL	AORL	PR6	R8P	ALA	RP	ALD	R9E	CP
CO %	1,62	1,74	1,56	6,20	Nd	Nd	3,96	6,00	4,62	2,10	2,16	2,16	Nd	13,92	7,26	2,04	2,58
Humedad %	36	35	28	52	Nd	Nd	49	47	58	36	35	42	Nd	70	64	43	45
Sulfuros	176	220	130	215	Nd	20	20	74	<20	34	27	310	Nd	98	1.409	23	<20
N Total	<0,10	<0,10	<0,10	0,30	Nd	Nd	0,36	<0,10	0,14	<0,10	0,15	0,50	Nd	0,46	<0,10	<0,10	<0,10
P Total	2.420	5.911	2.212	4.809	Nd	Nd	2.111	2.270	2.235	3.038	3.388	982	Nd	4.964	4.789	2.031	2.379
As	11,2	8,6	7,2	14,6	Nd	Nd	9,8	9,3	14,3	8,1	18,5	6,6	3,9	17,3	3,9	7,0	6,5
Hg	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	Nd	Nd	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Cd	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	Nd	Nd	<0,5	<0,5	<0,5	23,4	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Cr	9,40	13,3	17,0	807	Nd	Nd	149	13,2	220	19,5	5,80	40,9	35,7	60,0	51,4	28,1	40,9
Cu	23,3	18,8	20,3	126	Nd	Nd	31,4	26,4	98,8	23,1	37,2	24,3	25,1	142	466	26,8	27,3
Pb	23,6	24,3	26,2	64,1	Nd	Nd	73,3	26,5	57,1	33,0	34,9	172	24,6	63,8	105	29,1	31,1
Zn	39	32	22	190	Nd	Nd	170	25	196	75	145	38	68	265	751	79	98
Mn	206	535	476	542	Nd	Nd	351	298	316	343	198	1.214	Nd	387	281	446	759
Fe	28.945	26.692	26.701	28.750	Nd	Nd	24.804	14.387	20.714	16.094	25.308	28.017	Nd	20.750	68.125	25.219	32.818
Na	5.361	7.223	7.878	12.963	Nd	Nd	1.456	3.292	1.624	1.187	1.333	1.716	Nd	2.122	3.783	1.686	1.286
K	6.164	6.238	5.528	6.854	Nd	Nd	4.711	3.604	5.071	4.434	3.912	3.966	Nd	4.967	4.750	4.434	6.104

Nd: no fueron determinados. **Referencias:** ADS, A<sup>o</sup> Durazno; ALS, A<sup>o</sup> Leones; PG, Pte. García; P3M, Pte. 3 de Marzo; R41, Ruta 41; PO, Pte. Olivera; TJ, Club El Timón, Jáuregui; PLT, Pte. Las Tropas; PABL, Pte. Alte. Brown; AORL, Acceso Oeste Río Luján; PR6, Ruta 6; R8P, Ruta 8 Pilar; ALA, A<sup>o</sup> Larena Exaltación de la Cruz; RP, reserva Pilar; ALD A<sup>o</sup> Larena Pilar; R9E, Ruta 9 Escobar; CP El Carmel Pilar.

**Bioensayos de toxicidad: resultados de supervivencia y crecimiento**

Los parámetros de calidad del agua sobrenadante de los bioensayos de toxicidad correspondientes a los días 1 y 10 de exposición se muestran en las Tablas 6 y 7 en el Anexo. Los valores de pH y conductividad se mantuvieron constantes durante el tiempo de exposición, mientras que el OD fue más variable permaneciendo siempre por encima de los valores recomendados ( $<2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (USEPA, 2000).

Los porcentajes de supervivencia de los anfípodos en los sedimentos de referencia utilizados como controles en los cinco grupos de muestras ensayadas osciló entre 80 y 93% (Tabla VI.14), cumpliendo los criterios de aceptación recomendados por USEPA (2000) y OECD (2004) para bioensayos realizados con sedimento completo. Los porcentajes de supervivencia promedio en los controles (sedimento de referencia, A<sup>o</sup> Juan Blanco) en los bioensayos con los sedimentos del Río Luján fueron levemente inferiores a los controles utilizando el mismo sedimento de referencia en los bioensayos con los sedimentos correspondientes al grupo A (CO, RIA, JB, PZ y PR). Estas diferencias pueden explicarse si se considera el tamaño de los anfípodos al momento del inicio de las exposiciones al sedimento, siendo en promedio de 1,40 mm de longitud en los ensayos de toxicidad con muestras del grupo B y 2,3 mm en el grupo A de sitios de muestreo.

Del total de las muestras de sedimento evaluadas (16), sólo 3 indujeron una disminución significativa en la supervivencia de los anfípodos con respecto al grupo control (ver Tabla VI.13) en los ensayos de toxicidad con las muestras de sedimento sin diluir (100%). Las muestras de sedimento que provocaron mayores respuestas letales fueron las correspondientes al A<sup>o</sup> Larena y al Pte. 3 de Marzo, con una mortalidad de 90%. La muestra de sedimento del A<sup>o</sup> Durazno también mostró una disminución significativa en la supervivencia con respecto al grupo control, provocando una mortalidad del 66%. La Tabla VI.15 muestra los resultados de la supervivencia promedio de los anfípodos expuestos a las series de diluciones realizadas. Se muestran sólo los resultados de las muestras que presentaron algún grado de respuesta tóxica para los organismos (Figura VI.14), con excepción de la muestra Pte. 3 de Marzo que fue ensayada únicamente con la muestra completa (100%).

**Tabla VI.14: Supervivencia y longitud (promedio  $\pm$  DS) de *H. curvispina* en bioensayos con sedimentos del Río Luján luego de 10 días de exposición.**

Muestra	N	Respuesta	
		Supervivencia (%)	Longitud (mm)
<b>S. Referencia (C1)</b>	50	80 $\pm$ 7,0	1,88 $\pm$ 0,30
<b>ADS</b>	50	44 $\pm$ 11,4*	Nd
<b>ALS</b>	40	70 $\pm$ 14,1	1,70 $\pm$ 0,24
<b>R41</b>	50	77 $\pm$ 5,7	1,72 $\pm$ 0,23
<b>S. Referencia (C2)</b>	50	88 $\pm$ 4,5	2,00 $\pm$ 0,31
<b>PG</b>	50	68 $\pm$ 8,4	1,88 $\pm$ 0,23
<b>PO</b>	50	88 $\pm$ 8,4	2,01 $\pm$ 0,28
<b>PABL</b>	50	82 $\pm$ 16,4	2,11 $\pm$ 0,27
<b>S. Referencia (C3)</b>	50	93 $\pm$ 5,8	1,93 $\pm$ 0,22
<b>TJ</b>	50	58 $\pm$ 21,7*	1,59 $\pm$ 0,23*
<b>R8P</b>	50	84 $\pm$ 11,4	1,4 $\pm$ 0,17*
<b>ALD</b>	50	8 $\pm$ 8,3*	Nd
<b>S. Referencia (C4)</b>	50	82 $\pm$ 10,9	2,43 $\pm$ 0,25
<b>PR6</b>	50	80 $\pm$ 7,0	1,99 $\pm$ 0,09
<b>ALA</b>	50	87 $\pm$ 15,2	2,6 $\pm$ 0,26
<b>P3M</b>	50	10 $\pm$ 7,0*	Nd
<b>S. Referencia (C5)</b>	50	84 $\pm$ 11,4	2,12 $\pm$ 0,12
<b>AORL</b>	50	84 $\pm$ 11,2	2,09 $\pm$ 0,16
<b>RP</b>	50	66 $\pm$ 19,5	-----
<b>R9E</b>	50	90 $\pm$ 12,2	2,07 $\pm$ 0,22
<b>CP</b>	50	94 $\pm$ 8,9	2,13 $\pm$ 0,20

S. Referencia (C1-5) se refiere al sedimento de referencia utilizado como control en los bioensayos de cada grupo de muestras. \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control. Nd: no determinado debido a la supervivencia  $< 50$  %.

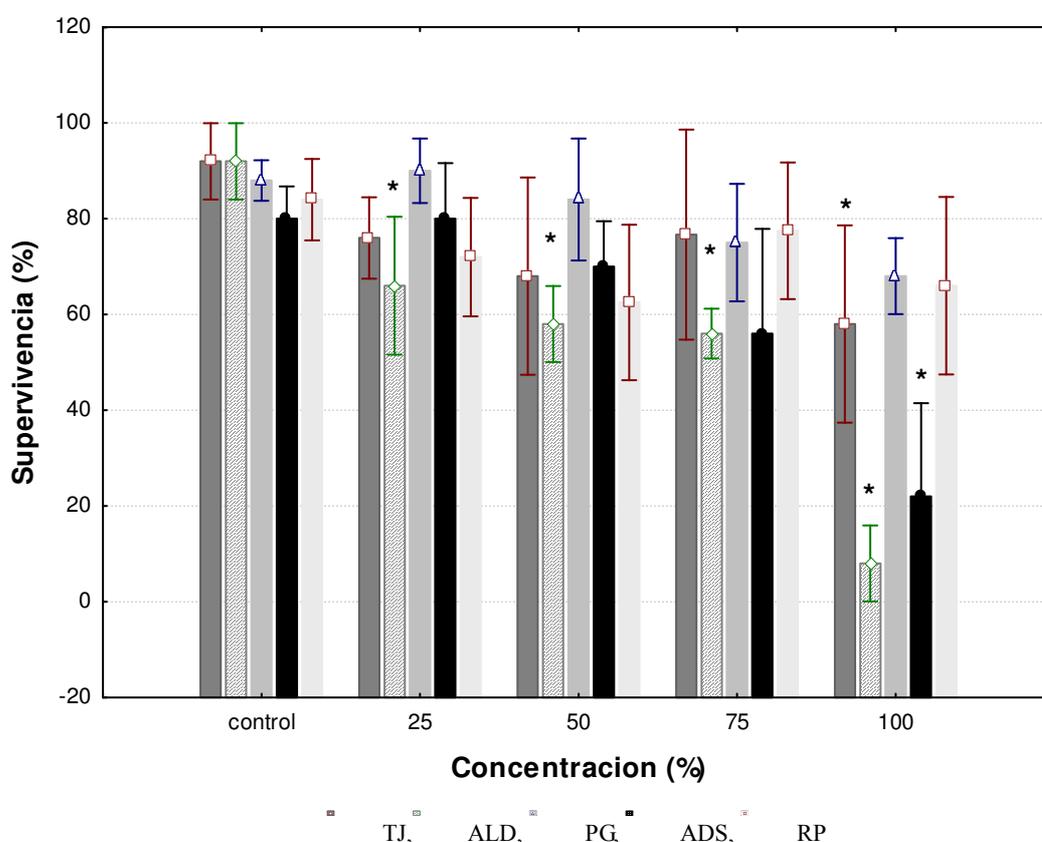
**Tabla VI.15: Porcentaje de supervivencia (promedio  $\pm$  DS) de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a los sedimentos que produjeron respuestas letales en los sedimentos del Río Luján en las diferentes diluciones con el sedimento de referencia.**

Sitio	n	% Sedimento				
		Sedimento Referencia	25%	50%	75%	100%
<b>TJ</b>	50	92 $\pm$ 8,4	76 $\pm$ 8,9	68 $\pm$ 21,7	77 $\pm$ 23,0	58 $\pm$ 21,7*
<b>ALD</b>	50	92 $\pm$ 8,4	66 $\pm$ 15,1*	58 $\pm$ 8,4*	56 $\pm$ 5,5*	8 $\pm$ 8,4*
<b>PG</b>	50	88 $\pm$ 4,5	90 $\pm$ 7,0	84 $\pm$ 13,4	75 $\pm$ 12,9	68 $\pm$ 8,4
<b>ADS</b>	50	80 $\pm$ 7,0	80 $\pm$ 12,1	70 $\pm$ 10,0	56 $\pm$ 23,0	44 $\pm$ 5,7*
<b>RP</b>	50	84 $\pm$ 8,9	72 $\pm$ 13,0	62 $\pm$ 17,0	77 $\pm$ 15,0	66 $\pm$ 19,5

\* indica diferencias significativas con el sedimento de referencia ( $p < 0,05$ ).

Los resultados de los ANOVA seguidos de la prueba de Dunnet indican que la muestra de sedimento del A<sup>o</sup> Larena (ALD) provocó disminuciones significativas en la supervivencia de los anfípodos, aún en la concentración más baja de sedimento (25%) ensayada. En las

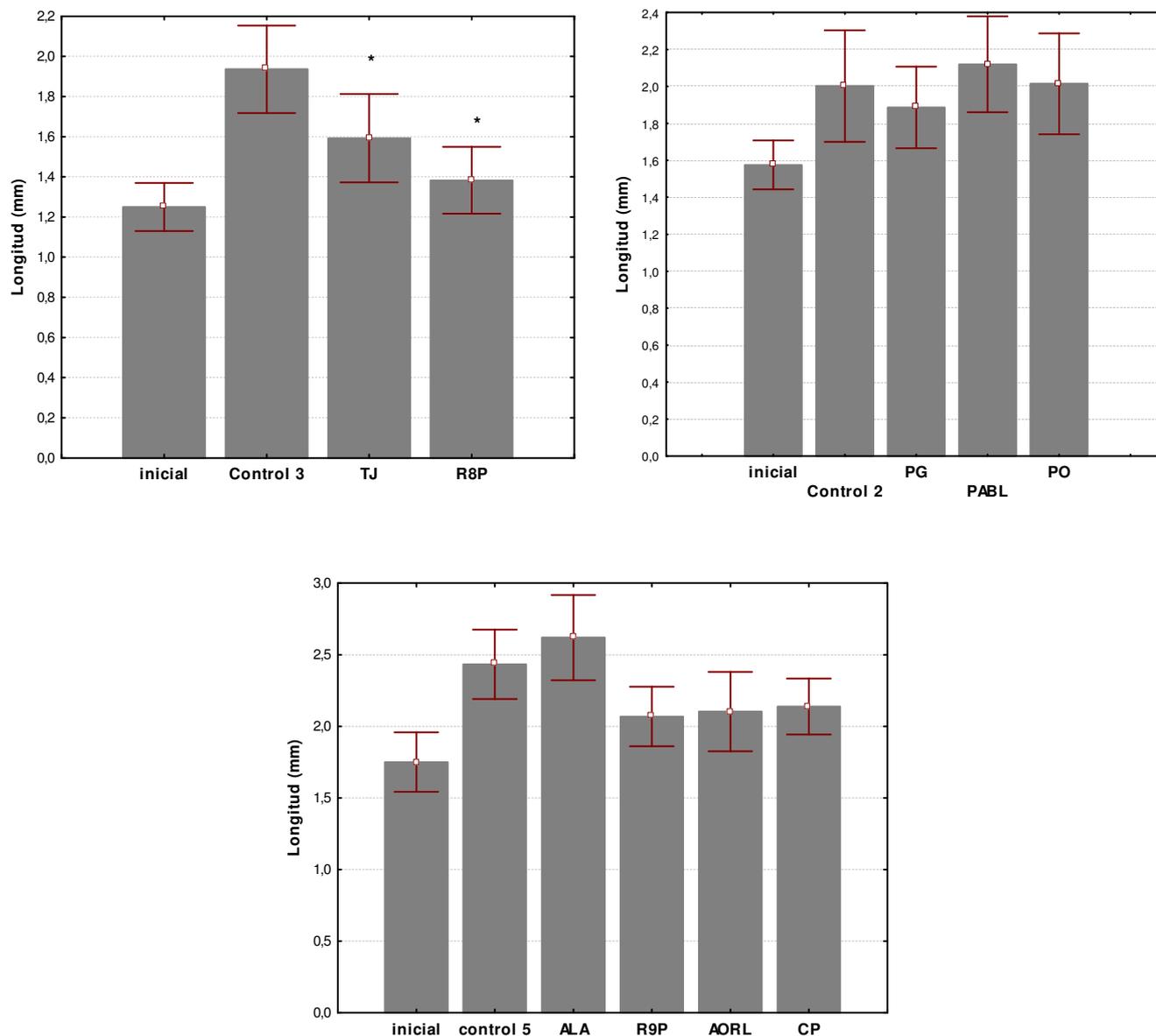
muestras del Timón (Jáuregui) y el A<sup>o</sup> Durazno sólo se evidenciaron disminuciones significativas respecto al grupo control en el sedimento sin diluir (100%). Los datos no permitieron obtener valores de CL50 significativos para las muestras analizadas, sin embargo se pudieron calcular los NOEC y LOEC para algunos de los sitios evaluados. Los valores de NOEC de los sedimentos de los sitios Club Timón y A<sup>o</sup> Durazno fueron iguales entre sí siendo de 75% de sedimento, mientras que los LOEC fue de 100%. Para la muestra de sedimento del A<sup>o</sup> Larena no se pudieron calcular los niveles de efecto debido a que este sedimento produjo disminución en la supervivencia de los anfípodos en la menor concentración evaluada.



**Figura VI.14: Porcentajes de supervivencia de *H. curvispina* luego de 10 días de exposición a los sedimentos que produjeron respuestas letales en las diferentes diluciones con el sedimento de referencia de los sitios del Río Luján.** TJ, Club Timón Jáuregui; ALD, A<sup>o</sup> Larena Pilar; PG, Pte. García; ADS, A<sup>o</sup> Durazno; RP, Reserva Pilar. \* indica diferencias significativas con el sedimento control ( $p < 0,05$ ).

El crecimiento de los anfípodos, como longitud del cuerpo, fue evaluado en las muestras de sedimento que mostraron una supervivencia mayor al 50% en todos los replicados ensayados. La Figura VI.15 (resultados de tres grupos de ensayos), muestra la longitud promedio de los anfípodos con sedimentos de los sitios del Río Luján luego de 10 días de exposición, además de las medidas de los grupos iniciales. Las únicas muestras de

sedimento que indujeron una disminución en el crecimiento de los anfípodos con respecto al grupo control fueron Club Timón (Jáuregui) y Ruta 8 (Pilar). En la primera también se evidenciaron respuestas letales significativas, sin embargo en el resto de las muestras que provocaron efectos letales no se pudo evaluar el crecimiento, ya que no superaron el 50% de supervivencia establecido para el análisis de los resultados.



**Figura VI.15:** Longitud promedio y desvío estándar de *H. curvispina* al tiempo inicial (primer grupo de barras) y final de exposición para el sitio control y los sedimentos correspondientes al grupo 2, 3 y 5 de bioensayos. \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control.

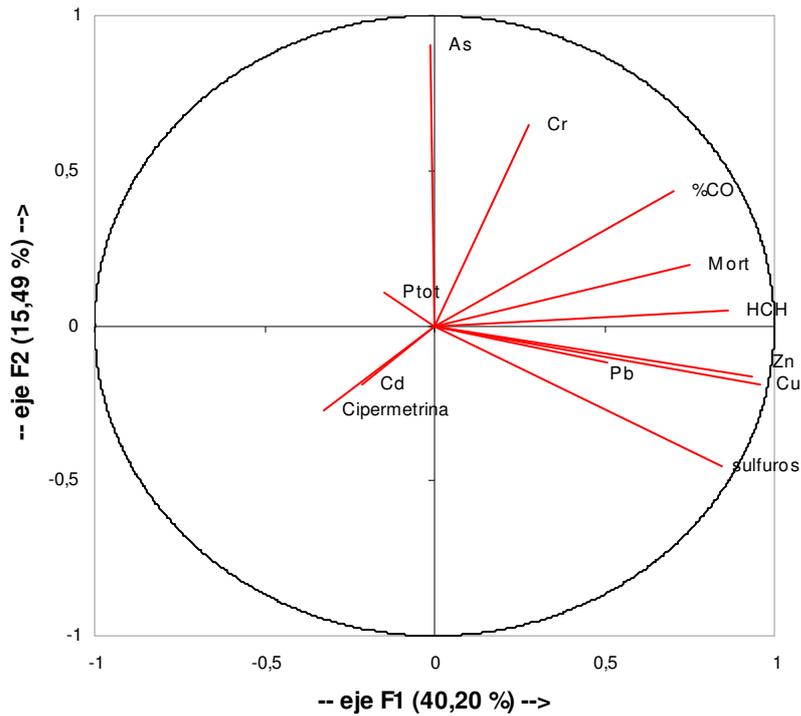
### **Análisis de componentes principales**

En el análisis de componentes principales correspondiente a las muestras del Río Luján, no se incluyeron las variables Hidrocarburos y Hg debido a que presentaron valores por debajo del límite de detección en todas las muestras analizadas. El criterio de selección de los factores fue que los valores propios fuesen mayores a 1 (Quinn & Keough, 2002), por lo tanto se trabajó con los cuatro primeros factores, (en adelante: F1, F2, F3 y F4) los cuales explican el 79,0% de la varianza inicial total (Tabla VI.15). El F1 fue el predominante ya que explica el 40,2% de la varianza total.

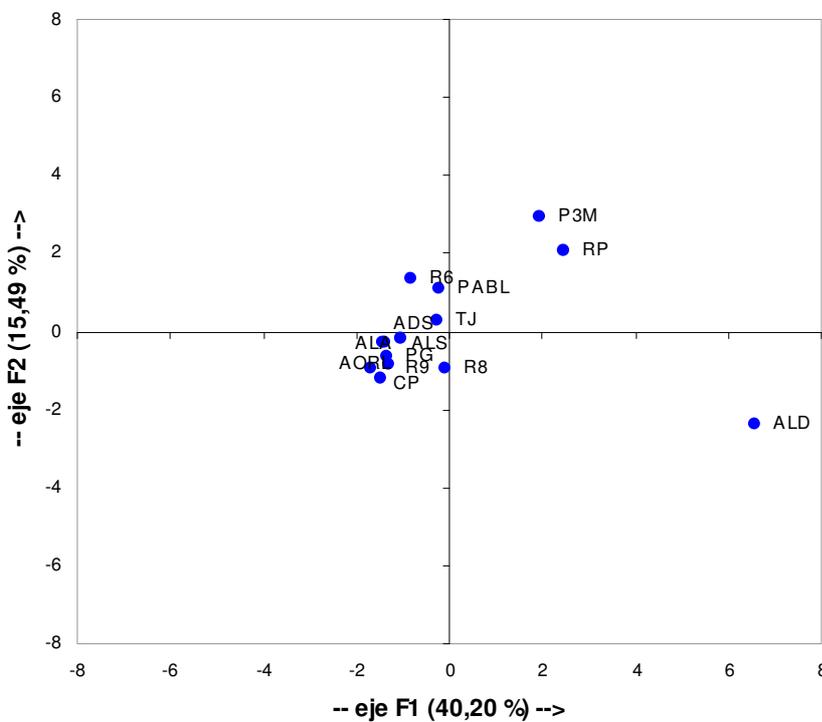
**Tabla VI.15: Coeficientes de correlación de las 11 variables utilizadas en el análisis multivariado con cada uno de los factores principales para las muestras del Grupo B. Los valores resaltados mostraron una correlación significativa con el factor.**

	F1	F2	F3	F4
<b>% Varianza</b>	40,2	15,5	12,6	10,3
<b>Valor propio</b>	4,82	1,85	1,51	1,23
<b>Sulfuros</b>	<b>0,846</b>	-0,452	0,199	-0,036
<b>Pb</b>	0,512	-0,117	0,346	-0,408
<b>Cr</b>	0,277	0,644	0,367	0,029
<b>Cd</b>	-0,212	-0,190	-0,429	-0,578
<b>Cu</b>	<b>0,956</b>	-0,188	-0,044	0,023
<b>Zn</b>	<b>0,935</b>	-0,166	-0,112	0,019
<b>As</b>	-0,010	<b>0,901</b>	-0,169	-0,014
<b>Ptot</b>	-0,148	0,108	<b>0,871</b>	-0,106
<b>%CO</b>	<b>0,704</b>	0,434	-0,427	0,059
<b>Mortalidad</b>	<b>0,754</b>	0,194	0,191	0,141
<b>Cipermetrina</b>	-0,325	-0,275	0,006	<b>0,813</b>
<b>HCH</b>	<b>0,863</b>	0,048	-0,121	0,197

El F1 agrupó las variables sulfuros, Cu, Zn, heptaclopoepoxido, % CO y en menor grado Pb, junto a la mortalidad de los anfípodos. Por lo tanto se puede asociar la presencia de dichos compuestos con los efectos toxicológicos sobre *H. curvispina*, sin embargo se debe tener en cuenta que el valor de coordenada para el Pb es menor a los valores para los demás metales, lo que significa que el grado de correlación de esta variable con el factor no es tan grande como con las demás variables. El F2 muestra valores positivos para el As, Cr, % CO y mortalidad, siendo este último bastante bajo en relación al resto. Las Figuras VI.17 y VI.18 muestran los resultados del análisis de ACP tomando los valores de las variables fisicoquímica de todas las muestras de sedimento. El ACP discriminó tres grupos correspondientes a las muestras de sedimento evaluadas (Figura VI. 18). El grupo 1 está conformado por una única muestra correspondiente al Aº Larena. El grupo 2 se compone de las muestras de sedimento de la Reserva Pilar y el Pte. 3 de Marzo de la ciudad de Mercedes, mientras que en el grupo 3 se encuentran el resto de los sitios estudiados.



**Figura VI.17: Diagrama en dos dimensiones del Análisis de Componentes Principales con dos componentes que explican el 61,7 % de la varianza total correspondiente a la distribución de las variables y su correlación parcial de las muestras del grupo B.**



**Figura VI.18: Diagrama en dos dimensiones del Análisis de Componentes Principales con dos componentes que explican el 61,7 % de la varianza total correspondiente a los sitios de muestreo del grupo B.**

Si observamos el diagrama de las coordenadas de las observaciones en la Figura VI.19, se ve que el Factor 1 fue muy predominante en el Aº Larena, y en menor grado en los sitios Pte. 3 de Marzo y Reserva Pilar. El factor 2 fue positivo mayormente en las muestras de los sitios Pte. 3 de Marzo, Reserva Pilar, y en menor medida en Pte. A. Brown y Ruta 6.

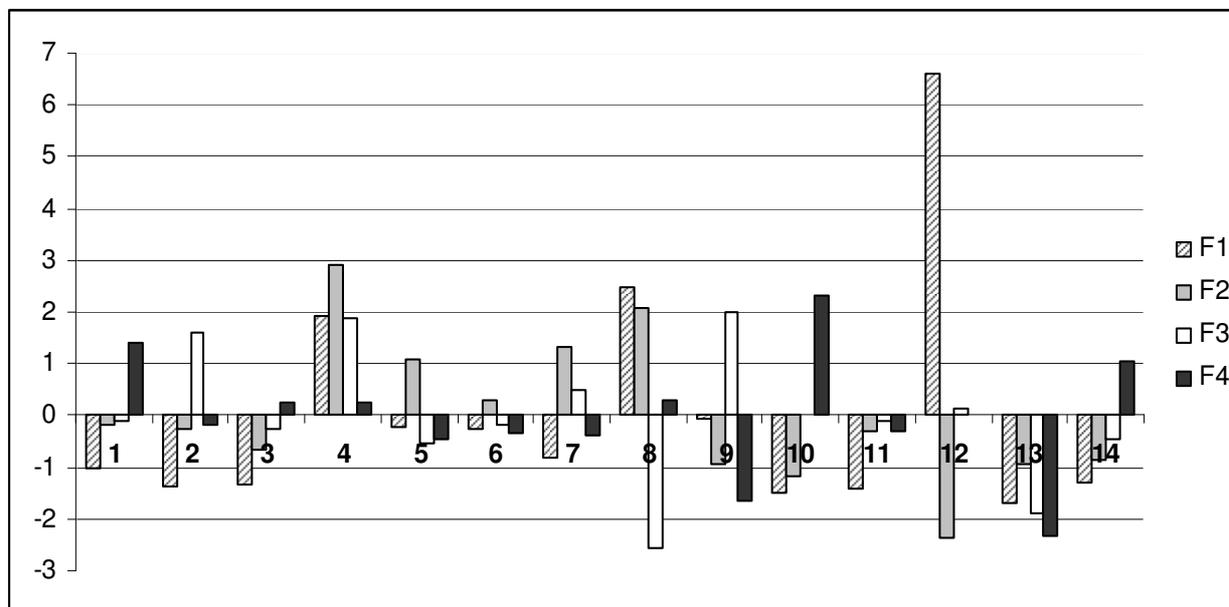


Figura VI.19: Coordenadas de las observaciones de los tres factores (F1, F2 y F3) obtenidos del análisis de componentes principales en los 8 sitios. Referencias: 1, ADS; 2, ALS; 3, PG; 4, P3M; 5, PABL; 6, TJ; 7, R6; 8, RP; 9, R8; 10, CP; 11, ALA; 12, ALD; 13, AORL; 14, R9.

## VI.5 Discusión

**Dilución de las muestras de sedimentos:** generalmente los bioensayos de toxicidad con matrices sólidas se realizan en una única concentración utilizando la totalidad (100%) de la muestra y los efectos observados son comparados con un control negativo (sedimento blanco o de referencia). De esta forma la única conclusión que se obtiene es que la muestra es “tóxica” o “no tóxica” y no hay una estimación cuantitativa de la toxicidad (Suedel *et al.*, 1996; Blaise & Ferard, 2005). Las diluciones de contaminantes son ampliamente utilizadas en investigación, regulación y monitoreos sobre matrices acuosas (efluentes, aguas receptoras, compuestos puros), sin embargo también se pueden realizar diluciones con la fase sólida diluyendo el sedimento completo con un sedimento “limpio” ya sea natural (Nelson *et al.*, 1993) o formulado (Suedel *et al.*, 1996). Los estudios realizados con diluciones de sedimentos son útiles para priorizar sitios para su remediación, o la cantidad de dilución para reducir la toxicidad a límites aceptables. Por otro lado, los resultados de concentración-respuesta de las pruebas con dilución de los sedimentos contribuyen a la comprensión de los efectos de las mezclas químicas complejas que se encuentran en los

sedimentos sobre la biota, especialmente donde se observa una mortalidad elevada. Los resultados obtenidos en este trabajo a partir de la exposición de *H. curvispina* a diluciones de las muestras de sedimento de dos sitios altamente contaminados (Riachuelo y Canal Oeste) indican un contenido de contaminantes de diferentes tipos y concentraciones para ambas muestras. Estas diferencias no se evidencian a partir de los resultados de la exposición a las muestras completas, debido a que la mortalidad fue máxima para ambas.

**Selección de los puntos finales:** en los bioensayos de toxicidad con sedimento completo con anfípodos el punto final medido generalmente es la supervivencia. Sin embargo las respuestas subletales como el crecimiento y la reproducción son puntos finales que pueden estimar muy bien los efectos tóxicos sobre dichos organismos, junto con la supervivencia en ensayos de 10, 28 y 42 días (Kemble *et al.*, 1994; Ingersoll *et al.*, 1998; Steevens & Benson, 1998).

El crecimiento como punto final en los anfípodos puede ser medido de dos formas: peso y longitud. En el caso particular de *H. azteca* se han realizado estudios en los cuales se mide la longitud de cada individuo (Ingersoll & Nelson, 1990; Kemble *et al.*, 1994); a su vez en muchos estudios se midió el peso, como medida de crecimiento, utilizando un grupo de organismos para la obtención de una medida de peso seco (Borgmann *et al.*, 1993; Reynoldson *et al.*, 1994; Kubitz *et al.*, 1996). Si bien se observa buena correlación entre las dos medidas de crecimiento (Ingersoll *et al.*, 1998; García, 2009), Steevens & Benson (1998) observaron que la medida de longitud resulta un método más sensible que el peso, debido a que cuando se mide longitud se utilizan un conjunto de mediciones para determinar un valor promedio de la muestra, disminuyendo la varianza, lo que proporciona mayor potencia a la prueba estadística.

Los resultados de los efectos subletales medidos como crecimiento en longitud de los anfípodos en los bioensayos con sedimento completo realizados en este trabajo, mostraron una elevada sensibilidad a la contaminación asociada a los sedimentos de los sitios estudiados. La evaluación de dichos efectos subletales permite detectar sedimentos con un grado moderado de contaminación, aún en exposiciones de 10 días.

Los resultados obtenidos, tanto para las respuestas letales como subletales, muestran un gradiente de toxicidad entre los sedimentos evaluados. Dentro de los sitios del Grupo A el Riachuelo, Canal Oeste y Puerto Montevideo presentaron los mayores efectos tóxicos sobre *H. curvispina*, seguidos por los sitios Río Luján y Aº del Gato, los que generaron respuestas subletales; mientras que los sedimentos del Aº J. Blanco, Aº El Pescado y Zárate no

provocaron efectos tóxicos en los organismos prueba. Por otro lado, las muestras de sedimentos del Río Luján (Grupo B) que provocaron los mayores efectos tóxicos corresponden al sitio Pte. 3 de Marzo en la localidad de Mercedes y al A<sup>o</sup> Larena aguas abajo del Polo Industrial ubicado en Pilar; seguidas por las muestras del Club Timón en Jáuregui, el A<sup>o</sup> Leones y el sitio en la Reserva Pilar.

Los resultados del análisis exploratorio de los datos de las caracterizaciones químicas y toxicológicas de los datos, utilizando análisis de componentes principales, indican que existen correlaciones entre los contaminantes, principalmente los metales Cr, Cu, Zn y Pb y la toxicidad que se evidenció en la especie prueba en las exposiciones de 10 días a las muestras de sedimento evaluadas en ambos grupos. Por lo tanto se destaca la utilidad de esta herramienta estadística para la realización de una identificación preliminar de las variables que contribuyen en mayor proporción a la toxicidad de los sedimentos.

## CAPÍTULO VII

### **Análisis e interpretación de resultados del estudio de los efectos biológicos y la caracterización fisicoquímica de sedimentos. Propuestas para la categorización de peligrosidad de muestras.**

#### **VII.1 Introducción**

Cuando se realizan evaluaciones ecotoxicológicas de sedimentos contaminados y su caracterización fisicoquímica, la interpretación de los resultados no es sencilla debido a los numerosos factores que pueden modificar la toxicidad de los contaminantes como la presencia de mezclas de compuestos, procesos de complejación de los tóxicos con los componentes de la matriz, aditividad y sinergismo de los compuestos, etc.

Para poder tomar decisiones sobre las acciones de remediación en ambientes deteriorados (eliminación o no de fuentes de contaminación; dragado de cursos de agua; selección de sitios de disposición de sedimentos provenientes de dragado; etc) se definen niveles de exposición de la biota a químicos que cause perjuicio sobre el cuerpo de agua, dichos niveles guía pueden ser utilizados en la toma de decisiones. Sin embargo, hay acuerdo en que los valores guía por si solos no pueden predecir efectos adversos como resultado de la exposición de los organismos a los sedimentos contaminados (Chapman *et al.*, 1999; Long, 2000; Wenning *et al.*, 2004).

A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos de toxicidad con *H. curvispina*, junto a la caracterización física y las concentraciones de compuestos contaminantes en las muestras de sedimentos de todos los sitios estudiados, se realiza una propuesta para la categorización de la peligrosidad, además de la identificación de los componentes responsables de la toxicidad observada en los sedimentos evaluados.

## VII.2 Metodología

### VII.2.1 Análisis de componentes principales

Con el objetivo de interpretar los datos obtenidos en la totalidad de las muestras de sedimentos (22 sitios) estudiados, se realizó un análisis multivariado con los resultados de la caracterización fisicoquímica. Las variables incluidas en el análisis fueron las siguientes: sulfuros, % carbono orgánico (CO), As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn. No se incluyeron en el mismo los datos de plaguicidas e hidrocarburos, por presentar valores por debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras analizadas. Tampoco se incluyó el Ni, dado que no se analizó en la totalidad de los sitios estudiados.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP), que permite limitar el conjunto de variables que caracterizan fisicoquímicamente las muestras de sedimentos a un número reducido de componentes (factores), que expliquen la variabilidad total que presentan las muestras. El criterio de selección de los factores fue que tuvieran valores propios mayores a 1 (Quinn & Keough, 2002). Posteriormente se procedió, por medio de análisis de regresión y correlación (Zar, 2010), a determinar la relación entre los factores seleccionados y la toxicidad observada en *H. curvispina* expresada como CL50 y NOEC (expresados en % de concentración de sedimento), en cada una de las muestras ensayadas.

### VII.2.2. Índice de calidad sedimentos (SQI)

Para realizar una primera clasificación de los sedimentos, las muestras fueron categorizadas utilizando un índice que considera sólo las concentraciones de contaminantes en relación a los valores guía (VG) para cada sitio de estudio. Se utilizó el índice propuesto por Grapentine *et al.* (2002b), el cual se detalla a continuación:

$$F_1 = (\text{Variables que exceden el VG} / \text{Variables totales}) * 100$$

$$F_2 = \text{mdcn} / 0,01 * \text{mdcn} + 0,01$$

Donde *mdcn* = suma (valores de conc/VG) - 1 / Nº de muestras

$$\text{SQI} = 100 - \sqrt{F_1^2 + F_2^2} / 1,414$$

El valor de concentración/VG es indica el grado en que una variable excede su valor guía. Tomando como base la clasificación realizada por los autores del índice, se adoptó el

siguiente criterio de clasificación para las muestras de acuerdo a la calidad de sus sedimentos:

- No peligroso: valores de SQI entre 95-100
- Probablemente no peligroso: valores de SQI entre 80-94
- Peligroso: valores de SQI entre 45-79
- Muy peligroso: valores de SQI entre 0-44

Debido a la ausencia de valores guía de calidad de sedimentos para nuestro país, se tomaron los valores de referencia de la norma holandesa (IADC/CEDA, 1997), los cuales fueron desarrollados para la legislación de dragado de sedimentos; y los valores de concentración de efecto probable (en inglés: PEC), promedio de los valores guía más ampliamente utilizados en los EEUU de Norteamérica (MacDonald *et al.*, 2000). El índice de calidad de sedimentos (SQI) se calculó de dos formas, utilizando los dos valores guía mencionados.

### VII.2.3 Índice Ecotoxicológico de Peligrosidad de Sedimentos

Se desarrolló un índice propio de categorización de la peligrosidad (Índice EPS), que incluye variables químicas y la respuesta biológica de *H. curvispina* obtenida en los bioensayos de toxicidad aguda. El índice se calculó a partir de la relación entre el promedio de los cocientes de los niveles guía y la concentración medida, y la respuesta biológica (expresada como NOEC).

Las categorías de calidad de los sedimentos fueron establecidas de la siguiente manera:

- Índice entre 0,001-0,009: no peligroso
- Índice entre 0,010-0,099: probablemente no peligroso
- Índice entre 0,100-0,990: peligroso
- Índice entre >1: muy peligroso

El índice ecotoxicológico de peligrosidad de sedimentos (IEPS) se calculó con el valor guía correspondiente al Valor de Referencia de la norma holandesa, y por otro lado tomando como valores de referencia las concentraciones correspondientes al sitio de referencia (A° J. Blanco) seleccionado en este trabajo.

## VII.3 Resultados

### VII.3.1 Análisis de Componentes Principales

A partir de los resultados obtenidos del ACP se seleccionaron los tres primeros componentes (F1, F2 y F3) del análisis, los cuales explicaron el 73 % de la varianza total explicada. La Tabla VII.1 muestra las variables que fueron agrupadas por cada uno de los factores, en base a las correlaciones entre cada una con el factor. El F1 explica el mayor porcentaje de variación y agrupa los sulfuros, Pb, Cr, Zn y Cu, mientras que el F2 agrupa el As y Hg.

**Tabla VII.1: Coeficientes de correlación de las variables utilizadas en el análisis con los 3 factores principales. Los valores resaltados mostraron una correlación significativa con el factor.**

	F1	F2	F3
<b>% Varianza</b>	40,5	19,9	12,5
<b>Valor propio</b>	3,64	1,80	1,13
<b>Sulfuros</b>	<b>0,934</b>	0,176	-127
<b>Pb</b>	<b>0,658</b>	-0,521	-0,127
<b>Cr</b>	<b>0,704</b>	-0,185	-0,189
<b>Cu</b>	<b>0,650</b>	-0,185	0,580
<b>Zn</b>	<b>0,908</b>	-0,201	-0,217
<b>As</b>	0,254	<b>-0,548</b>	-0,498
<b>Hg</b>	0,546	<b>0,643</b>	-0,388
<b>% CO</b>	0,475	0,817	-0,011
<b>Cd</b>	-0,079	-0,087	-0,541

El análisis de correlación entre los factores y la respuesta de los organismos prueba en los bioensayos de toxicidad muestra una correlación negativa altamente significativa (Tabla VII.2), entre la respuesta como % de supervivencia (Figura VII.1), NOEC (Figura VII.2) y CL50 (Figura VII.3) y el F1. Por otro lado no se encontraron correlaciones entre las variables de respuesta y los factores 2 y 3 (Tabla VII.2). Estos resultados indicarían que el componente 1, representado por los metales Zn, Cu, Cr y Pb, junto con los sulfuros, es representativo de la composición de la matriz que genera toxicidad en las muestras de sedimento evaluadas.

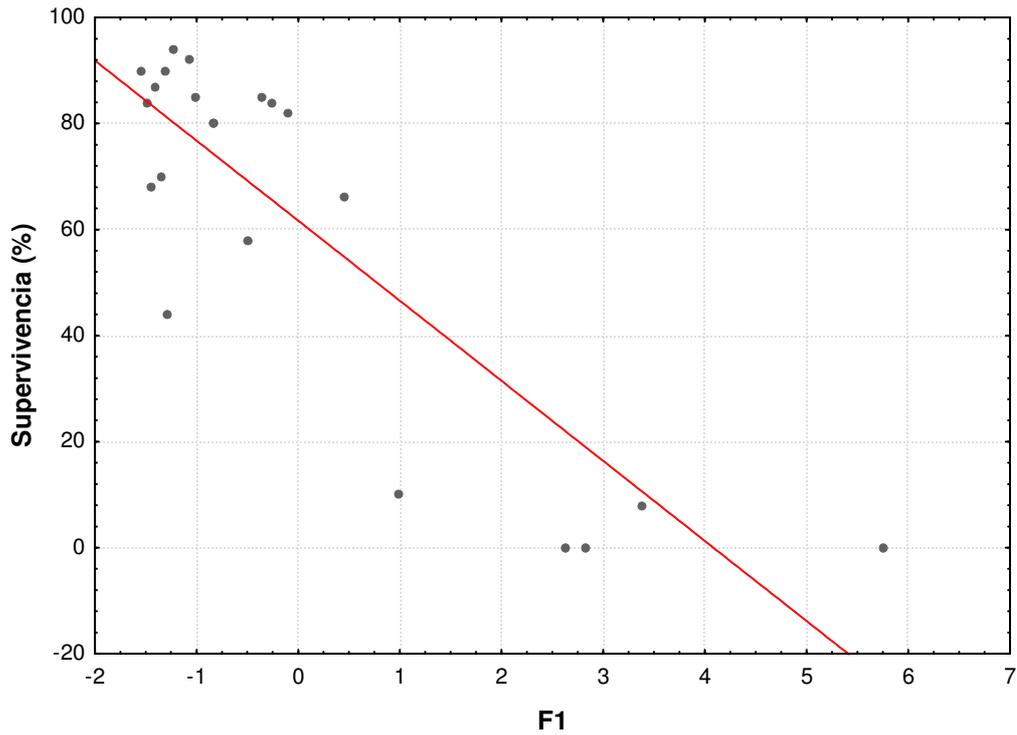


Figura VII.1: Relación entre el factor 1 del análisis de componentes principales y la supervivencia de *H. curvispina* en exposiciones de 10 días al sedimento de los sitios de estudio.

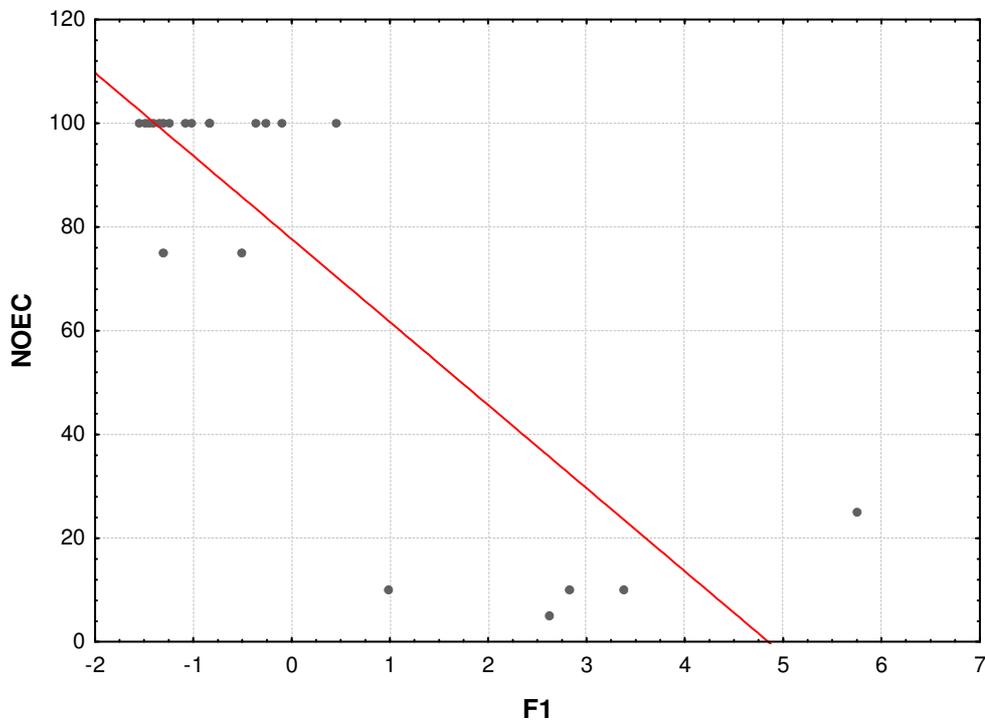
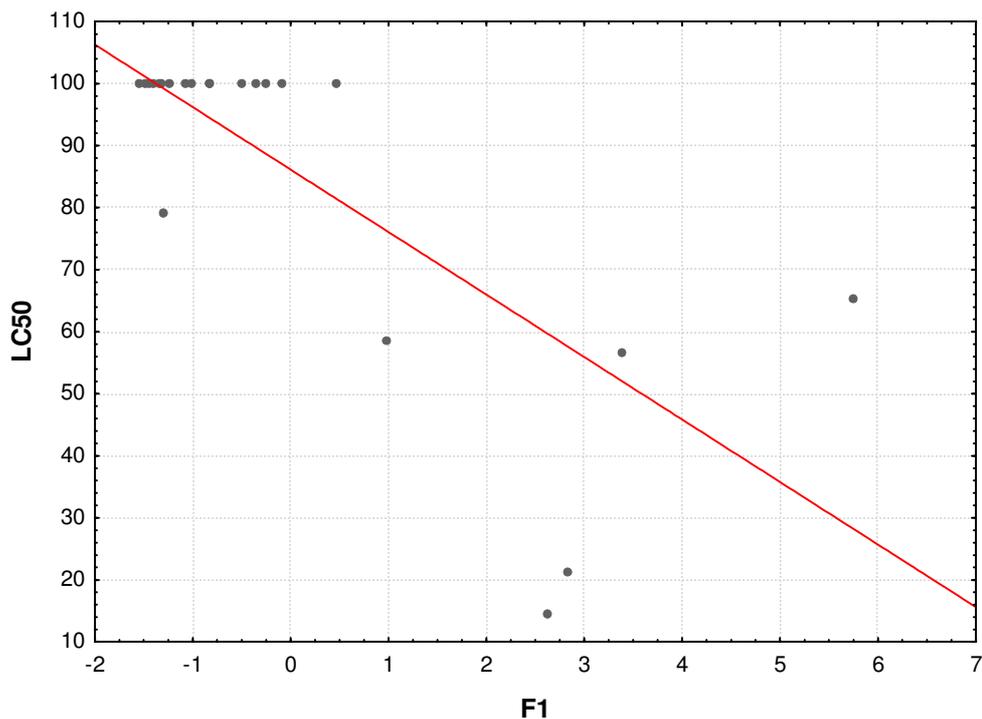


Figura VII.2: Relación entre el factor 1 del análisis de componentes principales y los NOEC (como porcentaje de sedimento) correspondientes a *H. curvispina* en exposiciones de 10 días al sedimento de los sitios de estudio.



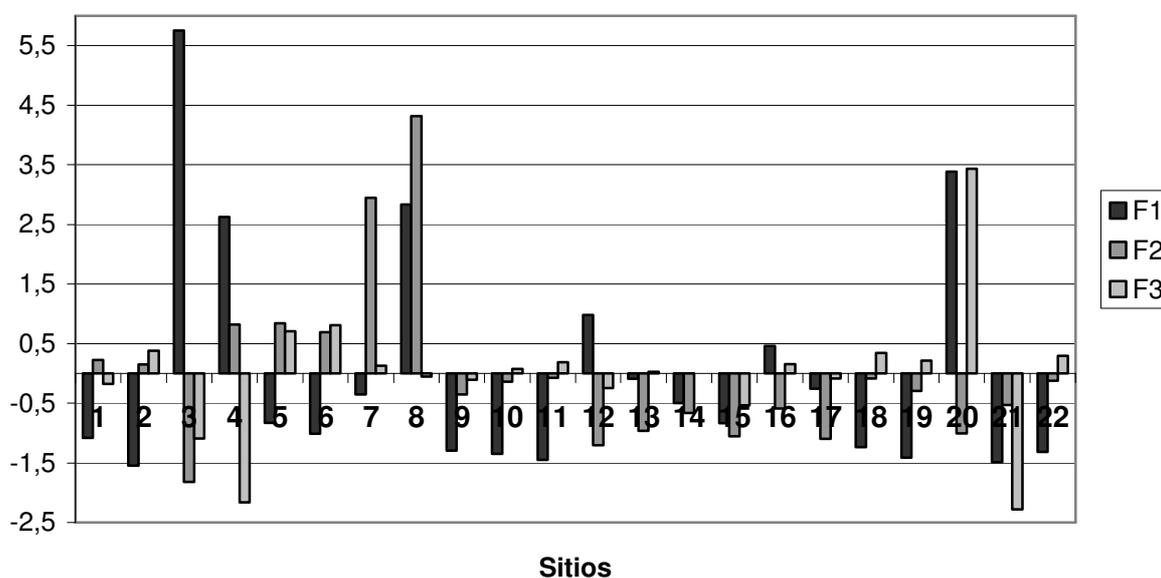
**Figura VII.3: Relación entre el factor 1 del análisis de componentes principales y las CL50 (como porcentaje de sedimento) correspondientes a *H. curvispina* en exposiciones de 10 días al sedimento de los sitios de estudio.**

De las tres formas de expresar la respuesta de los anfípodos en las exposiciones al sedimento completo, el % de supervivencia y el NOEC, correlacionan mejor que la respuesta expresada como CL50, lo cual se relaciona con el hecho de que en la mayoría de las muestras no se pudo calcular dicho valor. En los casos en que la CL50 no pudo ser calculada el dato fue igual a 100%.

**Tabla VII.2: Correlaciones entre los componentes principales (F1, F2 y F3) de la matriz ambiental y las respuestas biológicas de *H. curvispina*. \* indica diferencias significativas**

	Parámetros		
	$r^2$	R	p
<b>F1-Supervivencia</b>	0,74	-0,86 *	0,000000
<b>F1-NOEC</b>	0,70	-0,84 *	0,000001
<b>F1-CL50</b>	0,56	-0,75 *	0,00006
<b>F2-Supervivencia</b>	0,004	-0,06	0,78
<b>F2-NOEC</b>	0,00	-0,09	0,66
<b>F2-CL50</b>	0,10	-0,32	0,14
<b>F3-Supervivencia</b>	0,00	0,05	0,82
<b>F3-NOEC</b>	0,00	0,01	0,96
<b>F3-CL50</b>	0,02	0,15	0,50

Los factores son representativos de las características de una muestra, cuando el valor de la coordenada es  $>0$  para esa muestra en particular. La distribución de las coordenadas de las observaciones, para la totalidad de los sitios evaluados, se muestra en la Figura VII.4. Se puede observar que el F1 fue el predominante en las muestras Riachuelo y en menor medida en las muestras A<sup>o</sup> Larena (aguas abajo del Polo Industrial, Pilar), Canal Oeste, Pto. de Montevideo y Pte. 3 de Marzo también fue positivo, pero con un valor muy bajo, en el sitio correspondiente a la Reserva Pilar. El F2 presentó valores de coordenadas positivos principalmente en la muestra del Pto de Montevideo, Blanco Uruguay y en menor medida Canal Oeste, A<sup>o</sup> del Gato y El Pescado. De esta forma también se puede visualizar la relación entre las variables químicas y las respuestas biológicas observadas en cada muestra. Las muestras que presentaron valores positivos elevados para el F1 y F2, coinciden con las que generaron mayores respuestas tóxicas. A su vez, las muestras que presentaron valores de coordenadas positivos para el F2 presentaron concentraciones de mercurio elevadas en relación al valor del sedimento de referencia. Sin embargo, este factor no presentó buena correlación con las respuestas tóxicas de los anfípodos. Lo que indicaría que dicho metal no sería responsable de la toxicidad de las muestras.

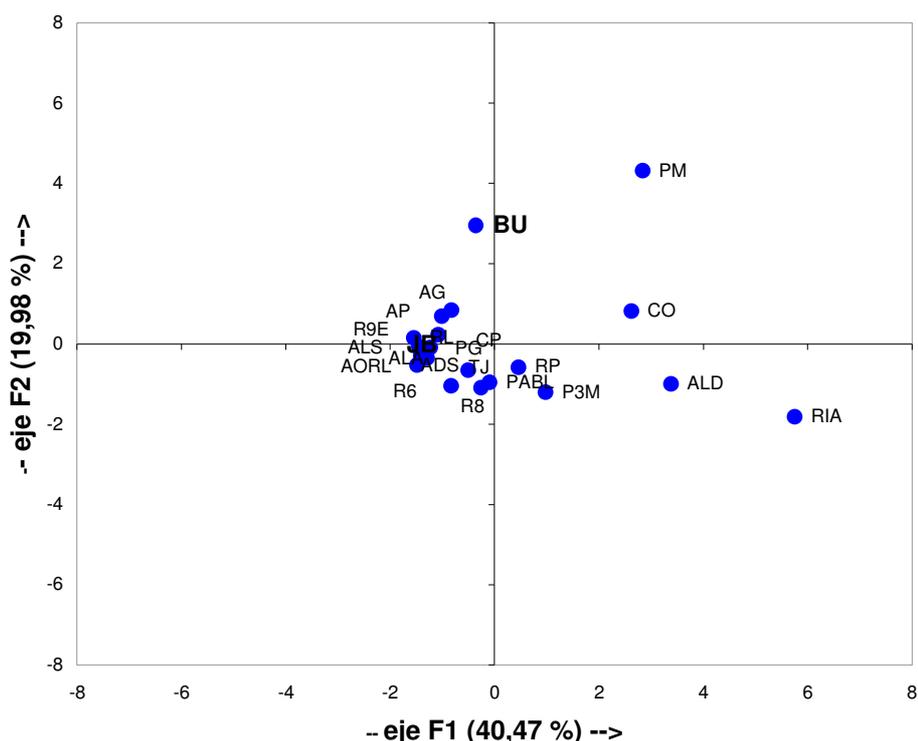


**Figura VII.4: Coordenadas de las observaciones de los tres factores (F1, F2 y F3) obtenidos del análisis de componentes principales en los 22 sitios.** Referencias: 1, JB; 2, RL; 3, RIA; 4, CO; 5, AG; 6, AP; 7, BU; 8, PM; 9, ADS; 10, ALS; 11, PG; 12, P3M; 13, PABL; 14, TJ; 15, R6; 16, RP; 17, R8; 18, CP; 19, ALA; 20, ALD; 21, AORL; 22, R9.

Considerando que el F1 correlaciona muy bien (en forma negativa), con la supervivencia de los anfípodos en los bioensayos de toxicidad con las muestras de sedimento, se puede utilizar como una aproximación para clasificar los sitios estudiados de acuerdo a la peligrosidad de sus sedimentos. En este sentido los sedimentos correspondientes al

Riachuelo, al Canal Oeste, el Aº Larena (aguas abajo parque industrial Pilar) y el Puerto de Montevideo serían los sitios de mayor peligrosidad en relación a las características químicas y toxicológicas estudiadas. Dado que en este análisis no se consideraron las respuestas subletales, esta primera clasificación sólo estaría valorando efectos adversos y a corto plazo, seguramente asociados a las muestras más contaminadas.

La Figura VII.4 muestra la ubicación de los sitios estudiados en el gráfico de dos dimensiones, correspondiente a los dos componentes principales (F1 y F2) del ACP. Se puede observar que las muestras que indujeron toxicidad se encuentran alejadas de la ubicación en el gráfico de los sitios de referencia Juan Blanco y Uruguay. El resto de los sitios estudiados se agrupan junto a los blancos. A su vez las muestras tóxicas están separadas entre si. Estos resultados evidencian las diferencias existentes entre los sitios contaminados en relación a los tipos de contaminantes que predominan en cada una de las muestras.



**Figura VII.4: Diagrama de dos dimensiones del análisis de componentes principales correspondiente a la totalidad de los sitios estudiados. Referencias: JB Aº J. Blanco (sedimento referencia); RL Río Luján desembocadura; RIA Riachuelo; CO Canal Oeste; AP Aº El Pescado; AG Aº del Gato; BU Blanco Uruguay; PM Pto. Montevideo; ADS, Aº Durazno; ALS, Aº Leones; PG, Pte. García; P3M, Pte. 3 de Marzo; TJ, Club El Timón, Jáuregui; PABL, Pte. Alte. Brown; AORL, Acceso Oeste Río Luján; PR6, Ruta 6; R8P, Ruta 8 Pilar; ALA, Aº Larena Exaltación de la Cruz; RP, reserva Pilar; ADL Aº Larena Pilar; R9E, Ruta 9 Escobar; CP El Carmel Pilar.**

### VII.3.2 Índice SQI

Se calcularon los índices de calidad de sedimentos (SQI) utilizando las fórmulas explicadas en la metodología con los valores guía PECs (MacDonald *et al.*, 2000) y el Valor de Referencia de la norma holandesa, para todos los sitios estudiados. La Figura VII.5 muestra el gráfico de barras correspondientes a los valores del índice para cada sitio, que se obtuvieron utilizando los valores PECs en el cálculo. Los sitios Canal Oeste, Puerto de Montevideo, Pte. 3 de Marzo y Aº Larena aguas abajo, se categorizan como peligrosos según la calidad de sus sedimentos. La muestra del Riachuelo fue categorizada como muy peligrosa. Las muestras correspondientes a los sitios peligrosos o muy peligrosos coinciden con las que generaron mayores respuestas tóxicas en los anfípodos. Sin embargo, si consideramos las respuestas como CL50 obtenidas para dichas muestras a partir de las diluciones de sedimentos, se observa que dicho valor para el Aº Larena (56,5%) fue similar al de Riachuelo (65,4%) y ambos mayores a los del Canal Oeste (14,5%) y Pto de Montevideo (21,3%). Sin embargo el índice calculado para el Canal Oeste (62,9) fue el doble al correspondiente a Riachuelo (32,6), esto se explica si consideramos que el Canal Oeste presentó niveles muy elevados de hidrocarburos totales (22,1 g.Kg<sup>-1</sup>) en relación al resto de las muestras evaluadas (<0,3 g.Kg<sup>-1</sup>) y dichos contaminantes no fueron considerados en los cálculos del índice de calidad utilizado.

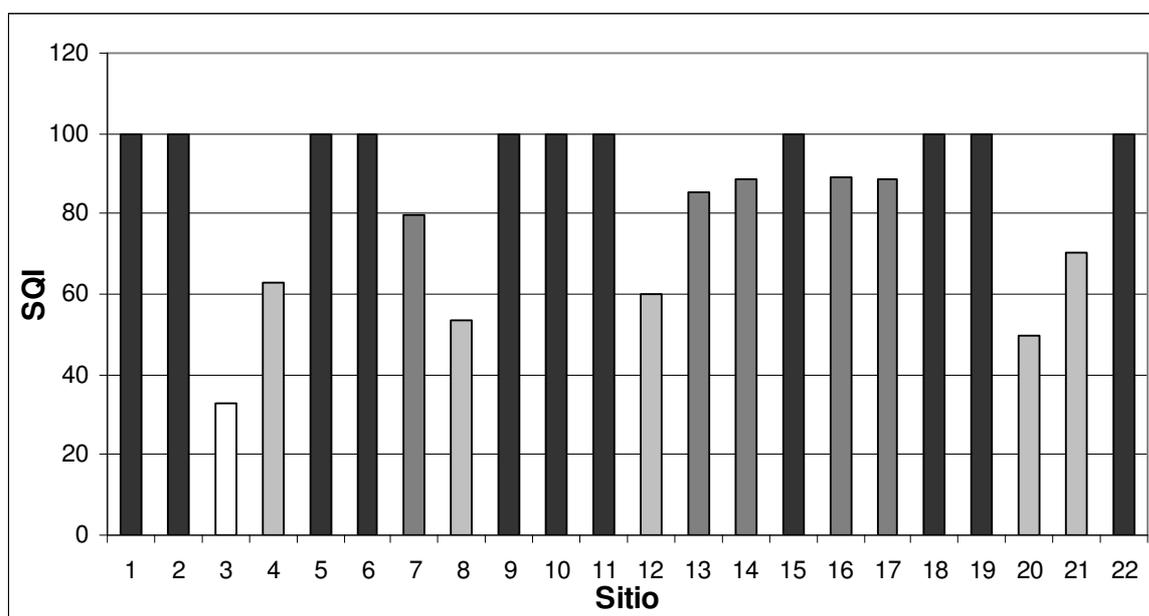
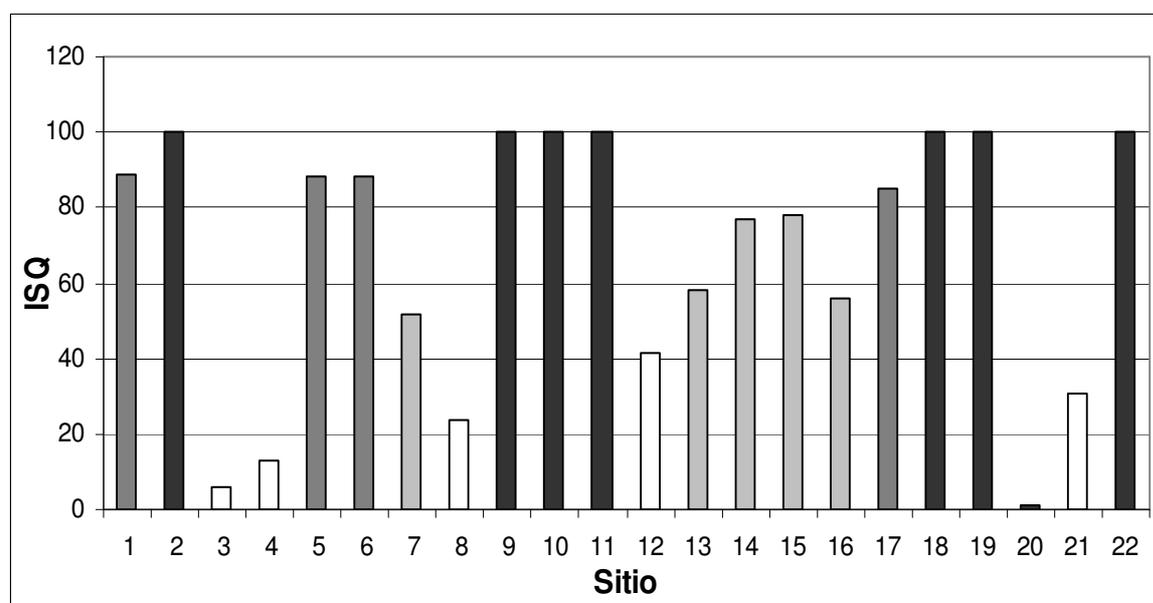


Figura VII.: Valores del índice de calidad de sedimentos (SQI) para los sitios evaluados utilizando PECs como valor guía. El gradiente de colores indica las categorías del oscuro al claro: no peligroso, probablemente no peligroso, peligroso, muy peligroso. Referencias: 1, JB; 2, RL; 3, RIA; 4, CO; 5, AG; 6, AP; 7, BU; 8, PM; 9, ADS; 10, ALS; 11, PG; 12, P3M; 13, PABL; 14, TJ; 15, R6; 16, RP; 17, R8; 18, CP; 19, ALA; 20, ALD; 21, AORL; 22, R9.

Los resultados de los índices de calidad de sedimentos SQI calculados a partir del valor de referencia de la norma holandesa (IADC/CEDA, 1997), para todos los sitios, se muestran en la Figura VII.6. En este caso, los índices fueron bajos para las muestras Riachuelo, Canal Oeste, Pto. de Montevideo, Pte. 3 de Marzo, A<sup>o</sup> Larena y Acceso Oeste Río Luján, indicando peligrosidad de sus sedimentos. Los bioensayos con sedimento del Acceso Oeste Río Luján no evidenciaron respuestas letales ni subletales significativas para *H. curvipina*, sin embargo según el índice SQG este sitio es considerado peligroso. Dentro de los metales evaluados la concentración de Cd superó cuatro veces el valor guía en esta muestra, y fue el único metal que superó los valores guía utilizados en los cálculos. Los índices calculados para Blanco Uruguay, Pte. Alte. Brown (Río Luján), Club el Timón (Jáuregui), Ruta 6 (Luján) y Reserva Pilar se encuentran en el intervalo 45-80, por lo tanto se los incluye en la categoría de sedimentos peligrosos en cuanto a su calidad. De los cinco sitios mencionados sólo el sedimento del Club el Timón generó respuesta tóxica en los bioensayos de toxicidad.



**Figura VII.6: Valores del índice de calidad de sedimentos (SQI) para los sitios evaluados utilizando Valor Ref. Holanda como valor guía. El gradiente de colores indica las categorías del oscuro al claro: no peligroso, probablemente no peligroso, peligroso, muy peligroso. Referencias: 1, JB; 2, RL; 3, RIA; 4, CO; 5, AG; 6, AP; 7, BU; 8, PM; 9, ADS; 10, ALS; 11, PG; 12, P3M; 13, PABL; 14, TJ; 15, R6; 16, RP; 17, R8; 18, CP; 19, ALA; 20, ALD; 21, AORL; 22, R9.**

Las diferencias en la categorización de los sitios en base a los SQI en las diferentes categorías de calidad de sedimentos seleccionadas, se relacionan con los distintos valores guía utilizados para el cálculo de dichos índices. Los valores PECs corresponden a las concentraciones del compuesto por encima de la cual es probable que cause efectos en la biota. El valor de referencia de la norma holandesa para calidad de sedimentos es más

conservativo, ya que se calcula dividiendo la concentración máxima permitida en la misma norma (MPCsed), por un factor de 100 (IADC/CEDA, 1997), por lo tanto los criterios químicos de protección de la biota varían dependiendo del límite seleccionado (Griffith & Kravitz, 2008).

A partir de los valores guía de calidad de sedimentos no se pueden inferir las relaciones causa-efecto entre los contaminantes y las respuestas tóxicas observadas (Smith *et al.*, 1996; Batley *et al.*, 2002; Burton, 2002). A partir de las comparaciones entre las concentraciones de los contaminantes y sus respectivos niveles guía no se puede identificar cual es el contaminante que genera una respuesta tóxica (Chapman *et al.*, 1999). Los niveles guía de calidad de sedimentos no suelen ser buenos indicadores de los efectos adversos sobre los organismos con excepción de los sitios con niveles elevados de contaminación (Burton, 2002), por lo tanto dichos valores son muy útiles para una primera categorización de sedimentos que pueden generar toxicidad, en una evaluación más detallada de los mismos.

### VII.3.3 Índice Ecotoxicológico de Peligrosidad de Sedimentos

Se calcularon los IEPS de las muestras evaluadas utilizando las concentraciones de los metales As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn; los plaguicidas heptaclorohepóxido y cipermetrina; e hidrocarburos totales. Para el término correspondiente a la respuesta biológica se utilizaron los NOEC calculados a partir de la supervivencia, como punto final para cada muestra evaluada. En las muestras en las cuales la supervivencia no disminuyó significativamente en ninguna de las diluciones de sedimento ensayada, se decidió utilizar el porcentaje máximo de concentración de sedimento (sedimento sin diluir) para el cálculo. De esta forma sólo se incluyen en el índice las respuestas letales observadas en *H. curvispina* luego de 10 días de exposición en bioensayos de toxicidad con sedimento completo.

Los valores del índice calculados para cada uno de los sitios utilizando los valores de referencia de la norma holandesa se muestran en la Tabla VII.3. Los sitios categorizados como peligrosos corresponden al Pte. 3 de Marzo en la ciudad de Mercedes, la desembocadura del Riachuelo, el Puerto de Montevideo y el A<sup>o</sup> Larena aguas abajo del Parque Industrial Pilar. El Canal Oeste en Ensenada fue el único sitio que se incluyó en la categoría de mayor peligrosidad. Del total de las muestras de sedimento que generaron toxicidad en los anfípodos (6 muestras), el índice incluyó en la categoría de peligrosas y muy peligrosas el 84% (5 muestras).

**Tabla VII.3: Valores de los índices EPS calculados para cada sitio evaluado utilizando los valores guía Norma Holanda. Los sitios se ubican en orden creciente según el criterio de peligrosidad adoptado.**

Sitio		IEPS
Aº Larena aguas arriba	ALA	0,002
Aº Leones, Suipacha	ALS	0,002
Pte. García, Río Luján	PG	0,003
Aº El Pescado, La Plata	AP	0,003
Aº Juan Blanco	JB	0,004
Aº del Gato, La Plata	AG	0,004
Ruta 6, Luján	R6	0,006
Ruta 8, Pilar	R8	0,006
Club Timón, Jáuregui	TJ	0,007
Pte. Alte Brown, Luján	PABL	0,007
Aº Durazno, Suipacha	ADS	0,008
Ruta 9, Escobar	R9E	0,009
Blanco Uruguay	BU	0,010
Carmel Pilar	CP	0,013
Reserva Pilar	RP	0,015
Acceso O Río Luján	AORL	0,028
Río Luján, desembocadura	RL	0,043
Riachuelo, desembocadura	RIA	0,123
Pte. 3 de marzo, Mercedes	P3M	0,184
Pto. Montevideo	PM	0,267
Aº Larena Aguas Abajo	ALD	0,281
Canal Oeste	CO	2,560

La Tabla VII.4 muestra los valores del índice calculados utilizando como valores guía las concentraciones de los compuestos correspondientes al sedimento de referencia (Aº J. Blanco). En este caso, los sitios que fueron categorizados como no peligrosos en los cálculos con los valores guías norma holandesa, fueron incluidos en la categoría probablemente no peligrosos. El Río Luján (desembocadura) y el Aº Larena aguas abajo del Parque Industrial Pilar, fueron categorizados como sedimentos peligrosos y el Riachuelo, Pte. 3 de Marzo, Pto. Montevideo y Canal Oeste como sedimentos muy peligrosos en cuanto a los riesgos para la fauna bentónica. El hecho de que se incluya la muestra del Río Luján como peligrosa se relaciona con la presencia del plaguicida cipermetrina en concentraciones muy elevadas con respecto al resto de las muestras analizadas. Sin embargo esta muestra fue la única considerada peligrosa según su IEPS que no mostró efectos letales significativos en los anfípodos.

**Tabla VII.3: Valores de los índices EPS calculados para cada sitio evaluado utilizando como valor guía las concentraciones del sedimento de referencia. Los sitios se ubican en orden creciente según el criterio de peligrosidad adoptado.**

Sitio		IEPS
Aº Juan Blanco	JB	0,006
Aº Leones, Suipacha	ALS	0,009
Aº El Pescado	AP	0,012
Pte. García, Río Luján	PG	0,013
Aº del Gato	AG	0,015
Ruta 6, Luján	R6	0,016
Aº Larena, aguas arriba	ALA	0,017
Blanco Uruguay	BU	0,026
Aº Durazno, Suipacha	ADS	0,027
Ruta 8, Pilar	R8	0,028
Acceso O Río Luján	AORL	0,032
Ruta 9, Escobar	R9E	0,033
Carmel Pilar	CP	0,051
Reserva Pilar	RP	0,058
Club Timón, Jáuregui	TJ	0,084
Pte. Alte. Brown, Luján	PABL	0,090
Río Luján, desembocadura	RL	0,134
Aº Larena aguas abajo	ALD	0,822
Riachuelo, desembocadura	RIA	1,789
Pto. de Montevideo	PM	1,869
Canal Oeste	CO	2,754
Pte. 3 de Marzo, mercedes	P3M	3,204

#### VII.4 Discusión

El análisis de componentes principales permitió relacionar la toxicidad observada con composición química. Es una herramienta de análisis estadístico que siempre debería ser utilizada para determinar las variables de un sistema que inciden en la asignación de la peligrosidad de un sedimento y por ende en la calidad del ecosistema en estudio.

Los tres tipos de análisis realizados con los resultados de las caracterizaciones fisicoquímicas y toxicológicas de las 22 muestras de sedimento consideradas para la realización de los índices incluyeron como peligrosas a las muestras que presentaron mayores respuestas tóxicas en los bioensayos. En este sentido, se debe tener en cuenta por un lado, que tanto las mediciones de los contaminantes como su comparación con valores guías desarrollados empíricamente, fueron buenos estimadores de la toxicidad cuando ésta alcanzó valores elevados de reducción de la supervivencia (entre 90 y 100%). Por otro lado, se encuentran muestras que presentaron niveles de concentración de algunos contaminantes por encima de los valores guías, aunque no determinaron respuestas letales

ni subletales. Por ejemplo, tales son los casos de la muestra del Acceso Oeste Río Luján, o la muestra del sitio Blanco de Uruguay. En estas muestras en particular se encontraron niveles elevados de Cd para Acceso Oeste y Hg en el sitio Blanco Uruguay. Los valores guía para dichos metales son bajos, sin embargo los valores de calidad de sedimentos seleccionados no consideran las variables que afectan la biodisponibilidad de los tóxicos, tales como el contenido de materia orgánica o de sulfuros ácidos volátiles (AVS) (MacDonald *et al.*, 2000; Burton, 2002; Griffith & Kravitz, 2008). Para el caso particular del mercurio, en el presente trabajo (Capítulo V), se observó que en sedimentos con contenido de carbono orgánico incluso menores a los que presentaron las muestras con valores elevados de mercurio, no se observaron respuestas letales, aún en concentraciones que superan hasta 10 veces mayores a las concentraciones de efecto probable (PEC) para dicho metal. Rifkin *et al.* (2004), encuentra que la presencia de cromo en mayores concentraciones a los niveles guía en sedimentos no tienen efecto sobre la supervivencia de los anfípodos expuestos, y lo importante es la valencia en la que se encuentra el metal y no la concentración total presente. Berry *et al.* (2004) no encuentran buena correlación entre la concentración de cromo total en presencia de sulfuros por encima de  $3,4 \text{ g.Kg}^{-1}$  y la toxicidad en anfípodos, sin embargo estos valores de sulfuros indican un sedimento de tipo anóxico por lo cual el cromo se encontraría en su estado de valencia de menor toxicidad (CrIII).

La incidencia de toxicidad en las muestras categorizadas como peligrosas, cuando se calculó el índice SQI utilizando los niveles guía de la norma holandesa, fue del 54,5%. Cuando se calculó el índice utilizando los PECs como valores guía la incidencia de toxicidad fue del 83%, sin embargo clasifica en dos categorías de peligrosidad muestras como Riachuelo (Muy Peligrosa) y Canal Oeste (Peligrosa) las cuales indujeron la misma respuesta tóxica sobre *H. curvispina* en los bioensayos de toxicidad. A partir del IEPS desarrollado en el presente trabajo se incluyeron en las categorías de peligrosidad los sitios cuyos sedimentos provocaron respuestas tóxicas elevadas, es decir que la incidencia de toxicidad de los sitios categorizados como peligrosos fue del 100%. El índice EPS que se calculó utilizando las concentraciones del sedimento de referencia como valores guía de calidad de sedimentos agrupó los sitios que presentaron respuesta tóxica elevada en la categoría de mayor peligrosidad.

## CAPÍTULO VIII

### Conclusiones generales

**El trabajo experimental original realizado permitió alcanzar las siguientes conclusiones generales:**

Se logró una descripción detallada de las condiciones para mantener cultivos en laboratorio de la especie de anfípodo nativa *Hyalella curvispina* de manera continua, mediante una técnica que permite disponer de individuos para su utilización como organismo prueba en bioensayos de toxicidad.

Se determinaron las tasas de crecimiento y reproducción de dicha especie, que se utilizan como variables de respuestas subletales para la evaluación de efectos en bioensayos de toxicidad de muestras ambientales de sedimentos.

Se logró establecer una metodología estandarizada de ensayo de toxicidad aguda de laboratorio (en matriz acuosa y en sedimento completo) con dicha especie nativa como organismo de referencia.

Se demostró que los juveniles de *H. curvispina* son sensibles a varios metales pesados (Cu, Cr, Hg, Zn) y al herbicida Glifosato en matriz acuosa, con una sensibilidad comparable a la de otras especies de invertebrados utilizados como organismos prueba.

Los valores de LC50 determinados para los metales Cr, Hg, Zn para juveniles de *H. curvispina* constituyen los primeros estudios sobre la toxicidad y sensibilidad para esta especie autóctona, permitiendo contar con información de base en futuros estudios ecotoxicológicos.

Los resultados obtenidos en el control y el aseguramiento de calidad de los bioensayos de toxicidad en matriz acuosa, permiten garantizar la reproductibilidad y sensibilidad de la técnica descrita.

Dado el interés y la conveniencia de contar con organismos autóctonos para el diagnóstico ambiental de los impactos de la contaminación, los resultados obtenidos en este estudio, contribuyen a la generación de una línea de base para incorporar a los juveniles de *H. curvispina* como organismo prueba, de referencia, en el desarrollo de herramientas bioanalíticas estandarizadas de relevancia regional, para su potencial uso en programas de monitoreo de ambientes acuáticos contaminados.

Los efectos tóxicos del mercurio sobre la supervivencia de *H. curvispina* en bioensayos con sedimentos adicionados con dicho elemento, en ausencia de materia orgánica en la matriz, son muy superiores a los registrados en presencia de materia orgánica. Estos resultados mostraron que la presencia de materia orgánica en el sedimento es un factor determinante sobre el efecto tóxico del Hg, evaluado mediante la supervivencia de la especie prueba, aun en exposiciones prolongadas.

Los resultados del monitoreo ecotoxicológico realizado sobre muestras de los sedimentos de fondo de ríos y arroyos de varias cuencas de la región pampeana confirmaron que la herramienta bioanalítica desarrollada es apta para la evaluación de efectos letales y subletales en los cuerpos de agua estudiados y brinda resultados confiables y reproducibles. Dichos efectos se correlacionaron muy bien con la contaminación química asociada a los mismos (cuyo perfil se determinó en forma paralela en cada muestra), teniendo gran relevancia, según lo demostró el análisis de componentes principales, la contaminación por metales y la presencia de sulfuros (vinculada a procesos de deterioro por anaerobiosis en algunos de los sitios estudiados).

La caracterización química de las muestras de sedimentos junto a la evaluación simultánea de efectos biológicos en los ambientes estudiados, permitió detectar sitios de alta peligrosidad en arroyos, ríos y canales, que atraviesan sectores urbanos o industriales, advirtiendo sobre la urgente necesidad de introducir estrategias para su remediación y control.

La información generada advierte objetivamente sobre el deterioro en la calidad de los sedimentos de casi todos los cuerpos de agua estudiados; los resultados de las evaluaciones indicaron severos efectos letales asociados a la contaminación química en las muestras del Riachuelo, el Canal Oeste, el A<sup>o</sup> Larena y en algunos sectores del río Luján. A su vez, la herramienta bioanalítica utilizada mostró su versatilidad ya que también permitió detectar niveles de contaminación intermedia (en la desembocadura del Río Luján y en el A<sup>o</sup> del Gato).

Dentro de las herramientas utilizadas para el análisis de la información obtenida a partir de la caracterización química y ecotoxicológica de las muestras ambientales, se destacó la utilidad del Análisis de Componentes Principales para la realización de una identificación preliminar de las variables que contribuyen en mayor proporción a la toxicidad de los sedimentos.

Se desarrolló un Índice original ecotoxicológico de categorización de peligrosidad (IEPS), basado en los parámetros químicos y toxicológicos de los sedimentos. Su aplicación a las muestras ambientales estudiadas mostró muy buena correspondencia entre la contaminación química detectada y los efectos registrados en los bioensayos de toxicidad. La comparación de estos resultados con los obtenidos aplicando otros métodos existentes, que incluyen valores de referencias de normas extranjeras, indicó que el índice permite una mejor categorización de las muestras.

Ante la ausencia de criterios de calidad de sedimentos en reglamentaciones para la protección de la vida acuática en cuerpos de agua superficiales del país en general y de la región en particular, la prueba de toxicidad con *H. curvispina* es propuesta como una herramienta estratégica para la generación de información ecotoxicológica de base para el diseño de criterios y modelos de protección, en forma complementaria a los análisis químicos de las muestras.

En resumen, el presente trabajo: a) contribuye con información de base sobre las condiciones de cría y mantenimiento de una especie apta como organismo prueba en ensayos de toxicidad de laboratorio, aportando datos de su sensibilidad a compuestos puros de interés ambiental, en particular los vinculados al mercurio como contaminante y su partición en el ambiente acuático; b) muestra la importancia de integrar la información fisicoquímica con la toxicológica brindada por un bioensayo normalizado de laboratorio; c) permitió describir un procedimiento estandarizado para la evaluación de efectos adversos de contaminantes asociados a sedimentos, ponderando efectos letales y subletales a corto y mediano plazo, junto con su aplicación al diagnóstico de problemas de contaminación de cuerpos de agua de la región y la interpretación de resultados en forma integrada, determinando relaciones causales mediante análisis estadísticos *ad hoc*.

*Lo antedicho, en su conjunto integrado, permitió elaborar y aplicar un sistema original de categorización de la peligrosidad de muestras de sedimentos dulceacuícolas, la que, además, constituye un aporte novedoso como herramienta de diagnóstico ambiental para ser utilizada en programas de gestión y control ambiental.*

## Referencias bibliográficas

**AA, AGOSBA, ILPLA, SHN. 1997.** Calidad de las aguas de la franja costera sur del Río de la Plata (San Fernando-Magdalena), Consejo Permanente para el monitoreo de las Aguas de la Franja Costera Sur del Río de la Plata, Buenos Aires. 119 pp.

**Abessa, D.M.S., Carr, R.S., Ecpm, S., Rachid, B.R.F., Zaroni, L.P., Pinto, Y.A., Gasparro, M.R. & Maciel, P.M. 2008.** Integrative ecotoxicological assessment of a complex tropical estuarine system. *Marine Pollution: New Research*. Nova Science Publishers, Inc, New York, USA.

**Achiorno, C.L., de Villalobos, C. & Ferrari, L. 2008.** Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha), *Chemosphere* 71: 816-1822.

**Adams, W.J., Kimerle, R.A. & Barnett, J.W. 1992.** Sediment quality and aquatic life assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 26(10):1864-1875.

**Adams, S.M. 2003.** Establishing causality between environmental stressors and effects on aquatic ecosystems. *H. Ecol. Risk Assess.*, 19: 17-35.

**Aguirre-Martínez G., Rudolph A., Ahumada R. & Loyola R. 2009.** Toxicidad no específica en sedimentos portuarios, una aproximación al contenido de contaminantes críticos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(3):725-735.

**Ahumada R., Rudolph, A. & Mudge, S.M. 2008.** Trace metals in sediments of Southeast Pacific Fjords, North Region (42.5° to 46.5°S). *Journal of Environmental Monitoring* 10: 231-238.

**Alzuet, P.R., Gaspes, E & Ronco, A.E. 1996.** Mutagenicity of environmental samples from an industrialized area of the Río de la Plata estuary using the Salmonella/microsomal assay. *Environ. Toxic. Water* .11:231-236.

**Andrade, M.I. 1986.** Factores de deterioro ambiental en la cuenca del Río Luján. *Contribución del Instituto de Geografía, Fac. de Filosofía y Letras (UBA)*, 224 p. Buenos Aires.

**Ankley, G.T., Di Toro, D.M., Hansen, D.J & Berry, W.J. 1996.** Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:2056-2066.

**Anguiano, O.L., Vaca, M.M., Ferrari, A. & D'Angelo, A. 2005.** Efectos del carbarilo sobre la supervivencia y la actividad de ACHE de *Hyalella* sp. *Acta Toxicol. Argent.* 13(Suppl.), 73.

**Anguiano, O.L., Ferrari, A., Soleño, J, Martínez, M.C., Venturino, A., Pechen de D'Angelo, A.M. & Montagna, C.M. 2008.** Enhanced esterase activity and resistance to azinphosmethyl in target and nontarget organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27: 2117-2123.

**ANZECC & ARMCANZ, 2000.** Australian and New Zeland guidelines for fresh and marine water quality. Australian and New Zeland Environment and Conservation Council and Agriculture and Resource management Council of Australia and New Zeland, Canberra, Australia.

**APHA, AWWA, WEF, 1998.** Standard methods for examination of water and wastewater, American Public Health Association, Washington DC.

**Artaxo, P., De Campos, R.C., Fernandes, E.T., Martins, J.V., Xiao, Zifan, Lindqvist, O., Fernandez-Jimenez, M.T. & Maenhaut, W. 2000.** Large scale mercury and trace element measurements in the Amazon Basin. *Atmos. Environ.*, 34(24):4085-4096.

**ASTM. 1990.** American Society of Testing and Materials. Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing. Designation E 1391-90.

**ASTM. 1999.** Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. E1706-95b. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05, Philadelphia, PA.

**ASTM. 1994.** American Society for Testing and Materials: Standard guide for designing biological tests with sediments. ASTM E 1521-94, Philadelphia.

**Balogh, S.J, Swain, E.B & Nollet, Y.H. 2008.** Characteristics of mercury speciation in Minnesota rivers and streams. *Sci. Tech.*, 15: 43-11.

**Baran, E. J. 1995.** Química Bio-inorgánica. McGraw Hill. Madrid.

**Bartlett, A.J., Borgmann, U., Dixon, D.G., Batchelor, S.P. & Maguire, R.J. 2004.** Accumulation of tributyltin in *Hyalella azteca* as an indicator of chronic toxicity: survival, growth, and reproduction. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23 (12): 2878-2888

**Bat, L. & Raffaelli, D. 1998.** Sediment toxicity testing: a bioassay approach using the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Arenicola marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 226: 217-239

**Batley, G.E., Burton, G.A., Chapman, P.M. & Forbes, V.E. 2002.** Uncertainties in sediment quality Weight-of-Evidence (WOE) assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 8(7):1517-1547.

**Beatrici, A. C. 2000.** Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas. Dissertação de Bacharelado, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

**Beiras, R & His, E. 1995.** Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126:15-189.

**Beiras, R., Fernández, N., Bellas, J., Besada, V., González-Quijano, A. & Nunes, T. 2003.** Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo-larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52: 1209-1224.

**Bendell-Young, L.I., Chouinard, J. & Pick, F.R. 1994.** Metal concentrations in chironomids in relation to peatland geochemistry. *Arch. Environ. Con. Tox.*, 27:186-194.

**Benoit, J.M., Gilmour, C., Mason, R. & Heyes, A. 1999.** Sulfide controls on mercury speciation and bioavailability to methylating bacteria in sediment pore waters. *Environ. Sci. Technol.*, 33: 951-957.

**Benoit, J.M, Mason, R.P., Gilmour, C.C. & Aiken, G.R. 2001.** Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolates from the Florida Everglades, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65: 4445-4451.

- Berry, W.J., Hansen, D.J., Mahony, J., Robson, D., Di Toro, D.M. & Shipley B. 1996.** Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations. *Environ. Toxicol.*, 15(12): 2067-2079.
- Berry, W.J., Boothman, W.S, Serbst, J.R. & Edwards, P.A. 2004.** Predicting the toxicity of chromium in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 2981-2992.
- Besser, J.M., Ingersoll C.G. & Giesy, J.P. 1996.** Effects of spatial and temporal variation of acid-volatile sulfide on the bioavailability of copper and zinc in freshwater sediments, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 286–293
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., May, T.W. & Ingersoll, C.G. 2003.** Effects of organic amendments on the toxicity and bioavailability of cadmium and copper in spiked formulated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 805-815
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., Kemble, N.E., May, T.W. & Ingersoll, C.G. 2004.** Effects of sediments characteristics on the toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to the amphipod, *Hyalella azteca*. *Environ. Sci. Technol.*, 38:621-6216.
- Bettinetti, R., Giarei, C. & Provini, A. 2003.** Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). *Arch. Environ. Cont. Tox.*, 45(1): 72-78.
- Bianchini, A. & Wood, C.M. 2008.** Does sulfide or water hardness protect against chronic silver toxicity in *Daphnia magna*? A critical assessment of the acute-to-chronic toxicity ratio for silver. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 71: 32-40.
- Bilos, C., Colombo, J.C. & Rodriguez Presa, M.J. 1998.** Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Pollut.*, 99:1-11.
- Bisinoti, M.C., Sargentini, E. Jr. & Jardim W.F. 2007.** Seasonal Behavior of Mercury Species in Waters and Sediments from the Negro River Basin, Amazon, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(3): 544-553.
- Blaise, C., 2000.** Canadian application of microbiotest to assess the toxic potential of complex liquid and solid media. In: *New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring*. Kluwer Academic. Plenum publishers, New York. Contribution 1:3-11pp.
- Blaise, C. & Féraud, J-F (eds.), 2005.** *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, Vol. 2. Springer.
- Bloom, N.S. 1992.** On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 1010–1017.
- Bombardier, M. & Bermingham, N. 1999.** The SED-TOX index: Toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard – Concept and application. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 685-698.
- Bombardier, M. 2005.** The SED-TOX index for toxicity assessment of contaminated solid matrices. In: Blaise, C. and Féraud, J.F. (eds.) *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations (Volume 2, Hazard Assessment Schemes)*, Springer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pages 257-280.

- Bousfield, E.L. 1979.** A revised classification and phylogeny of the Amphipod Crustacea. *Trans. Roy. Soc. Can.*, 4(14): 343-390
- Borgmann, U., Ralph, K.M. & Norwood, W.P. 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(5):756-764
- Borgmann, U., Norwood, W.P. & C. Clarke. 1993.** Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyalella azteca*. *Hydrobiologia* 259: 79–89.
- Borgmann, U. & Norwood, WP. 1999.** Sediment toxicity testing using large water-sediment ratios: An alternative to water renewal. *Environ. Pollut.* 106(3):333-9.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., Reynoldson, T.B. & Rosa, F. 2001.** Identifying cause in sediment assessments: bioavailability and the Sediment Quality Triad. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 58: 950-960.
- Borgmann, U., Grapentine, L., Norwood, W.P., Bird, G., Dixon, D.G., Lindeman, D., Chapman, P.M., Goulet, R.R. & Wang, F. 2005.** Sediment toxicity testing with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: Relevance and application. *Chemosphere* 61(11): 1740-1745.
- Borgmann, U., Couillard, Y., Doyle, P. & Dixon, D.G. 2005.** Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(3):641-652
- Boszke L., Kowalski A., Głosińska G., Szarek R. & Siepak J. 2003.** Selected factors affecting the speciation of mercury in the bottom sediments: an overview. *Pol. J. Environ. Stud.*, 12 (1): 5-13.
- Boszke, L., Kowalski, A. & Siepak, J. 2004.** Grain size partitioning of mercury in sediments of the middle Odra river (Germany/Poland). *Water Air Soil Pollut.* 159(1), 125-138.
- Bryan, G.W. & Langston, W.J. 1992.** Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Poll.* 76: 89-131.
- Buikema, A.L. Jr & Benfield, E.F. 1979.** Use of macroinvertebrates life history information in toxicity tests. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36: 321-328.
- Buikema, A.L.J., Niedertehner, B.R. & Cairns, J.J. 1982.** Biological monitoring: Part IV. Toxicity testing. *Water Res.* 239-262.
- Burton, G.A., Suedel, C. & Rodgers, J.H.Jr. 1994.** Development of formulated sediment for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175
- Burton, G.A., Norberg-King, T., Ingersoll, C.G., Benoit, D., Ankley, G.T. & Winger, P.V. 1996.** Interlaboratory study of precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* freshwater sediment toxicity assays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(8):1335-1343.
- Burton, G.A., 2002.** Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*, pp.65-75.
- Burton, E.D., Hawker, D.W. & Redding, M.R. 2003.** Sludge-derived Cu and Zn in a humic-gley soil: effect of dissolved metal-organic matter complexes on sorption and partitioning. *Soil Sediment Contam.*, 12: 23-46.

- Burton, P.A. & Landrum, P.F. 2003.** Toxicity of sediments. In *Enciclopedia of Sediments and Sedimentary Rocks*. Middleton, G.V, Church, M.J., Corigilo, M., Hardie, L.A. and Longstaffe, F.J. (eds.) Kuwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 748-751.
- Burton Jr, G.A.B., Greenberg, M.S., Rowland, C.D., Irvine, C.A., Lavoie, D.R. & Brooker, J.A. 2005.** In situ exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environ. Pollut.*, 134: 133-144.
- Burton, E., Phillips, I. & Hawker, D. 2006.** Factors controlling the geochemical partitioning of trace metals in estuarine sediments. *Soil Sediment Contam.*, 15:253-276.
- Burton, G.A., Green, A., Baudo, R., Forbes, V.E., Nguyen, L.T.H., Janssen, C., Kukkonen, J., Leppanen, M., Maltby, L. & Soares, A. 2007.** Sediment characterizing volatile acid concentrations sulfide streams european. *Environ. Toxicol.*, 26(1): 1-12.
- Call, D.J., Brooke, L.T., Ankley, G.T., Benoit, D.A. & Hoke, R.A. 1994.** Appendix G: Biological Effects Testing Procedures. In *Great Lakes Dredged Material Testing and Evaluation Manual*. U.S. Environmental Protection Agency Regions II, III, V, Great Lakes National Program Office, and U.S. Army Corps of Engineers, North Central Division.
- Camilión, M.C., Manassero, M.J., Hurtado, M.A. & Ronco, A.R. 2003.** Copper, Lead and Zinc distribution in soils and sediments of the South Western coast of the Río de la Plata estuary. *J. Soils Sediments*, 3(3): 213-220
- CEQG. 2002.** Summary of Existing Canadian Environmental Quality Guidelines. [www.ccme.ca/assets/pdf/e1\\_06.pdf](http://www.ccme.ca/assets/pdf/e1_06.pdf)
- Carsen, A., Perdomo, A. & Arriola, M. 2005.** Contaminación de Sedimentos del Río de la Plata y su Frente Marítimo. FREPLATA. Proyecto de protección ambiental del Río de la Plata y su frente marítimo: Preservación y control de la contaminación y restauración de hábitats, 4pp.
- Carr, R.S., Williams, J.W. & Fragata, C.T.B. 1989.** Development and evaluation of a novel marine sediment pore water toxicity test with polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 533-543.
- Casset, M.A., Momo, F. & Giorgi, A. 2001.** Dinámica poblacional de dos especies de anfípodos y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del río Luján (Argentina). *Ecología Austral*.11: 79-85.
- Cattogio, J.A., 1990.** Contaminación del agua. Causas de la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Fundación J.E. Roulet-Fundación Nauman, Buenos Aires, p. 137-155
- Cavaliere, F. 1959.** Una nueva especie de anfípodo de agua dulce (Crustacea: Amphypoda). *Physis* 21 (4): 278-288.
- Cavaliere, F. 1968.** *Hyaella pampeana* sp. nov., una nueva especie de anfípodo de agua dulce (Gammaridea: Hyaellidae). *Neotrópica* 14 (45): 107-117.
- CEMR (Comité Ejecutor del Plan de Gestión Ambiental y Manejo de la Cuenca Hídrica Matanza-Riachuelo). 1999.** Operación de una Red de Monitoreo de Calidad de Agua y Sedimentos en la Cuenca de los ríos Matanza-Riachuelo y Puesta a Punto de un Modelo Matemático de Calidad Caracterización de las Estaciones de Calidad de Agua. CTUA. Tomos I y II.

- Cesar, A., Pereira, C. D. S., Santos, A. R., Abessa, D. M. S., Fernández, N., Choueri, R. & DelValls, A. 2006.** Ecotoxicology assessment of sediments from Santos and São Vicente Estuarine System – Brazil. *Braz. J. Oceanogr.*, 54(1): 55-63
- Cesar, A., Moledo, D., Abessa, D.S., Dias, C., Pereira, S. & Santos, R. 2009.** A Simple Approach to Integrate the Ecotoxicological and Chemical Data for the Establishment of Environmental Risk Levels. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 52(1): 233-240.
- Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G. & Allen, H. E. 1998.** Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55(10):2221-2243.
- Chapman, P.M., Wang, F., Adams, W.J. & Green, A. 1999.** Appropriate applications of sediment quality values for metals and metalloids. *Environ. Sci. Technol.* 33(22): 3937-3941.
- Chapman, P.M., Mcdonald, B.G. & Lawrence, G.S., 2002.** Weight-of-Evidence issues and frameworks for Sediment Quality (And Other) Assessments. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 8(7):1489-1515.
- Chappie, D.J. & Burton Jr, A.B. 2000.** Application of aquatic and sediment toxicity testing *in situ*. *J. Soil Contam.*, 9: 1-27.
- Choueri, R.B., Cesar, A., Torres, R.J, Abessa, D.M.S, Morais, R.D., Pereira, C.D.S, Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., Riba, I. & DelValls, T.A. 2009.** Integrated sediment quality assessment in Paranaguá Estuarine System, Southern Brazil. *Ecotox. Environ. Saf.*, 72(7): 1824-1831.
- Colombo, J.C., Kahlil, M.F., Arnac, M., Horth, A.C. & Catoggio, J.A. 1990.** Distribution of chlorinated pesticides and individual polychlorinated biphenils in biotic and abiotic compartments of the Río de la Plata, Argentina. *Environ. Sci. Technol.*, 24: 498-505.
- Colombo, J.C., Cappelletti, N., Laschi, I., Migoya, M.C., Speranza, E. & Skorupa, C.N. 2006.** Sources vertical fluxes and equivalent toxicity of aromatic hydrocarbons in coastal sediments of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.*, 40(3): 734-740.
- Collyard, S.A., Ankley, G.T., Hoke, R.A. & Goldenstein, T. 1994.** Influence of age on the relative sensitivity of *Hyalella azteca* to diazinon, alkylphenol ethoxylates, copper, cadmium, and zinc. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26(1):110-113
- Convenio INA-SOPyC - DNRH. 1999.** Diseño de una Red de Monitoreo de Calidad de agua y Sedimentos para el Río Matanza-Riachuelo (2 TOMOS) Como Anexo figura "Evaluación de la Cuenca Matanza Riachuelo a partir del estudio de la comunidad bentónica (macroinvertebrados-diatomeas)" Convenio INCYTH\_CTUA/ILPLA.
- Correia, A.D. & Costa, M.H. 2000.** Effects of sediment geochemical properties on the toxicity of copper-spiked sediments to the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Sci. Total. Environ.*, 247: 99-106.
- Correia, A.D., Lima, G., Costa, M.H. & Livingstone, D.R. 2002.** Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity. *Biomarkers*. 7: 101-127.
- Costa, F.O., Correia, A.D. & Costa, M. H. 1998.** Acute marine sediment toxicity: A potential new test with the amphipod *Gammarus locusta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 40: 81-87.

- Dave, G. & Nilsson, E. 1996.** Sediment storage: A critical factor in sediment quality assessments. *Development and Progress in Sediment Quality Assessment: Rationale, Challenges, Techniques and Strategies*, pp. 153–163.
- Davies, N.A., Edwards, P.A., Lawrence, M.A.M., Taylor, M.G. & Simkiss, K. 1999.** Influence of particle surfaces on the bioavailability to different species of 2,4-Dichlorophenol and Pentachlorophenol. *Environ. Sci. Technol.*, 33(14): 2465-2468.
- Day, P., 1965.** Particle fractionation and particle size analysis methods of soil analysis. In: C. Black (Ed.), *Methods of soil analysis, part I*. American Society of Agronomy, Wisconsin, pp 545-566.
- DeFoe, D.L. & Ankley, G.T. 1998.** Influence of storage on toxicity of freshwater sediments to benthic macroinvertebrates. *Environ. Pollut.* 99, 123–132.
- De Marco, S.G.D., Botte, S.E & Marcovecchio, J.E. 2006.** Mercury distribution in abiotic and biological compartments within several estuarine systems from Argentina: 1980–2005 period. *Chemosphere*. 65: 213-223.
- DelValls, T.A. & Chapman, P.M. 1998.** Site-specific quality values for the gulf of Cádiz (Spain) and San Francisco Bay (USA) using the sediment quality triad and multivariate analysis. *Ciencias Mar.*, 24(3): 313-336.
- DeWitt, T.H., Swartz, R.C., Hansen, D.J., McGovern, D. & Berry, W.J. 1996.** Bioavailability and chronic toxicity of cadmium in sediment to the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 2095–2101.
- DeWitt, T.H., Hickey, C.W., Morrissey, D.J., Nipper, M.G., Roper, D.S., Williamson, R.B., Van Dam, L. & Williams EK. 1999.** Do amphipods have the same concentration response to contaminated sediment in situ as in vitro? *Environ. Toxicol. Chem.*, 18:1026-1037.
- Di Marzio, W., Fuente, H., Alberdi, J.L. & Tortorelli, M.C. 1994.** Toxicidad aguda de un formulado comercial del herbicida paraquat sobre individuos de *Hyaella curvispina* (Crustáceo, Anfípodo) (24 horas). *Acta Toxicológica Argentina Vol 2* (1-2): 14.
- Di Marzio, W.D., 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 Toro, D. M., Mahony, J.U.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Hicks, M.B., Mayr, S.M. & Redmond, M.S. 1990.** Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide, *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 1487.
- Di Toro, D.M., Zarb, S.C., Hansen, D.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. & Paquin, P.R. 1991.** Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ.Toxicol.Chem.*, 10: 1541-1583.
- Di Toro, D.M., Mahony, J.D., Hansen, D.J., Scott, K.J., Carison, A.R. & Ankley, G.T. 1992.** Acid volatile sulfides predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 26: 96-101.
- Dutra, B.K., Castiglioni, D.S., Santos, R.B., Bond-Buckup, G. & Oliveira, G.T. 2007.** Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comp. Biochem. Physiol.*, 148: 239 - 247.

**Dutra, B.K., Santos, R.B., Bueno, A.A.P. & Oliveira, G.T. 2008.** Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 151: 322 - 328.

**Eisler, R. 2006.** Mercury: Hazards to living organisms. Eds. Taylor and Francis. 312 pp.

**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). 1999.** Guidance Document on Application and Interpretation of Single-species Tests in Environmental Toxicology. Method Development and Application Section. Environment Technology Centre. Report: EPS 1/RM/34.

**Erickson, R.J., Benoit, D.A., Mattson, V.R., Nelson, H.P.J. & Leonard, E.N. 1996.** The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 181-193.

**Feijoó C.S., Giorgi, A., García, M.E. & Momo, F. 1999.** Temporal and spatial variability in streams of a pampean basin. *Hydrobiologia*, 394: 41-52.

**Ferrara, R. 1999.** Mercury mines in Europe: assessment of emissions and environmental contamination. In R. Ebinghaus, R.R. Turner, L.D. Lacerda, O. Vasiliev, and W. Salomons (Eds.). *Mercury Contaminated Sites*, p. 51–72. Springer, Berlin.

**Ferrari, L., García, M.E., de la Torre, F.R. & Demichelis, S.O. 1998.** Evaluación ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. *Museo Argentino de Ciencias Naturales, Nueva Serie*, 148:1-16.

**Ferrer, L., De Marco, S., Pozzobon, V., Marcovecchio, J. & Pucci, A.E. 1996.** Heavy metal concentrations in surface sediments from Mar Chiquita Coastal Lagoon (Argentina). In: "Pollution Processes in Coastal Environments", J.E.Marcovecchio (ed.), U.N.M.d.P., Ch. II: pp.229-233

**Ferrer, L.D., Andrade, S., Astesuain, R., Marcovecchio J. & Pucci, A. 2000.** Heavy metals distribution in the estuarine ecosystem of Bahía Blanca, Argentina. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Heavy Metals in the Environment*, Contrib. No. 1120, University of Michigan, School of Public Health, Ann Arbor, MI (USA).

**Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge

**Fitzgerald, W.F., Engstrom, D.R, Mason, R.P. & Nater, E.A. 1998.** The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environ. Sci. Technol.*, 32:1-7.

- Folk, R.L. 1954.** The distinction between grain size and mineral composition in sedimentary rock nomenclature. *J. Geol.*, 62: 344-359.
- Folmar, L.C., Sanders H.O. & Julin, A.M. 1979.** Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 8:269-278.
- FREPLATA** (Proyecto Protección Ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la Contaminación y Restauración de Hábitats). 2002. Taller "Bioensayos Aplicados a Sedimentos".
- Galvín, R.F. 2003.** Fisicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ed. Díaz de Santos, S. A. Doña Juana I de Castilla, 22. 28027 Madrid.
- García Gonzáles, P. & Souto, M.E. 1987.** Estudio experimental sobre apareamiento y especificidad sexual en *Hyalella curvispina* (Amphipoda). *Hidrobiología* 6: 1-10.
- García, M.E. 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.
- García, M.E., 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(5): 771-778.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Chiffolleau, J.F., Coynel A. & Etcheber, H. 2004.** Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of *Crassostrea gigas* oysters. *Environ. Pollut.*, 129: 457-465.
- Giorgi, A.D.N. 2000.** Costo de la contaminación del río Luján. *UNLu Ciencia* 2:42-47
- Giesy, J.P. & Hoke, R.A. 1989.** Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *J. Great Lakes Res.*, 15:539-569.
- Giesy, J.P., Dobson, S. & Solomon, K.R., 2000.** Ecotoxicological risk assessment for roundup (R) herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 167, 35–120.
- Giusto, A. & Ferrari, L. 2008.** Copper toxicity on juveniles of *Hyalella pseudoazteca* Gonzalez and Watling, 2003. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81(2):169-173.
- Gómez, C.E. & Sabells, J. 2002.** Instituto Nacional del Agua (INA). Estudio de la Calidad de los Sedimentos Dragados en el Puerto Dock Sud. (Administración Portuaria Bonaerense).
- Gomez-Parra, A., Forja, J.M., Delvals, T.A., Saenz, I. & Riba, I. 2000.** Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcollar mining spill (SW Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 40(12): 1115-1123
- Gomez, S.E & Toresani, N.I. 1998.** Los humedales de la Argentina. Clasificación, situación actual y legislación. Región 3: pampas. *Wetlands International Publication*, N°46: 98:114.
- Gonzales, E.R. & Watling, L. 2002.** A new species of *Hyalella* from the Andes in Peru (Crustacea: Hyalellidae). *Rev. Biol. Trop.*, 50: 649-658.

- González, E.R., Bond-Buckup, G. & Araujo, P.B. 2006.** Two new species of *Hyalella* from southern Brazil (Amphipoda: Hyalellidae) with a taxonomic key. *J. Crustacean Biol.*, 26(3): 355-365.
- Gorski, P.R., Armstrong, D.E., Hurley, J.P. & Shafer, M.M. 2006.** Speciation of aqueous methylmercury influences uptake by a freshwater alga (*Selenastrum capricornutum*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 534-540
- Gorski, P.R., Armstrong, D.E., Hurley, J.P. & Krabbenhoft, D.P. 2008.** Influence of natural dissolved organic carbon on the bioavailability of mercury to a freshwater alga. *Environ. Pollut.*, 154: 116-123.
- Graca, M.A., Rodrigues Capítulo, A., Ocón, C. & Gomez, N. 2002.** In situ tests for water quality assessment: a case study in Pampean rivers. *Water Res.*, 36(16): 4033-4040.
- Grapentine, L., Anderson, J., Boyd, D., Burton, G.A, Johnson, G. & Marvin C. 2002a.** A decision making framework for sediment assessment developed for the Great Lakes. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 8(7):1641-1655.
- Grapentine, L., Marvin, C. & Painter, S. 2002b.** Initial development and evaluation of a Sediment Quality Index for the Great Lakes Region. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 8(7):1549-1567.
- Griffith, M.B., Kaufmann, P.R., Herlihy, A.T. & Hill, H.B. 2001.** Analysis of macroinvertebrate assemblages in relation to environmental gradients in Rocky Mountain streams. *Ecol. Appl.*, 11: 489-505.
- Griffith, M.B. & Kravitz, M. 2008.** Relationships among exceedences of sediment guidelines, the results of ambient sediment toxicity tests, and community metrics in estuarine systems. *Estuaries Coasts*, 31: 101-114.
- Grosso, L.E. & Peralta, M. 1999.** Anfípodos de agua dulce Sudamericanos. Revisión del género *Hyalella* Schmitt. I. *Acta Zool. Lilloana*, 45: 79-98.
- Grothe D. & Kimerle R. 1985.** Inter-and intra-laboratory variability in *Daphnia magna*. Effluent toxicity results. *Environ. Toxicol. Chem.*, 4:189-192
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Carolina Silva, M. & Soares, A.M.V.M. 2000.** Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46: 357-362.
- Gustin, M.S. 2003.** Are mercury emissions from geologic sources significant? A status report. *Mercury. Sci. Total Environ.*, 304: 153-167.
- Hair J. F. Jr, Anderson, R. E., Tatham, R. L. & Black, W. C. 1999.** Análisis multivariante. 5ta Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid.
- Haitzer, M., Aiken, G.R. & Ryan, J.N. 2003.** Binding of mercury(II) to aquatic humic substances: influence of pH and source of humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 2436-2441
- Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W. & Steinberg, C. 1999.** Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo(a)pyrene. *Aquat. Toxicol.*, 45:147-158.

- Han, I.T., Holsen, T.M. & P.K. Hopke, P.K. 2007.** Estimation of source locations of total gaseous mercury measured in New York State using trajectory-based models. *Atmos. Environ.*, 41: 6033-6047.
- Harrahy, E.A. & Clements, W.H. 1997.** Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 317-327.
- Heijerick, D.G., Janssen, C.R. & De Coen, W.M. 2003.** The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: development of a surface response model. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 210–217
- Heise, S. 2009.** Sediments in river basins, from the perspective of SedNet, the European Sediment Network. *J. Soil Sediments*, 9:393-399.
- Hill, M.K. 2010.** Understanding environmental pollution. Cambridge University Press, 562 pp.
- Hintzen, E.P., Lydy, M.J. & Belden, J.B. 2009.** Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central Texas. *Environ. Pollut.*, 157(1): 110-116
- Hollert, H., Heise, S., Pudenz, S., Bruggemann, R., Ahlf, W. & Braunbeck, T. 2002.** Application of a sediment quality triad and different statistical approaches (Hasse diagrams and fuzzy logic) for the comparative evaluation of small streams. *Ecotoxicology*, 11(5):311-321
- Horowitz, A.J. 1986.** A primer on trace metal-sediment chemistry. U.S. Geological Survey Water-Supply paper 2277.
- Hose, G.C., Murray, B.R., Park, M., Kelaher, B. & Figueira W. 2006.** A meta-analysis comparing the toxicity of sediments in the laboratory and in situ. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25(4):1148-1152.
- Huh, C-A., Finney, B.P. & Stull, J.K. 1992.** Anthropogenic inputs of several heavy metals to nearshore basins off Los Angeles. *Prog. Oceanog.*, 30, 335-351.
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., Phillips, B.M., Newman, J., Tjeerdema, R., Fairey, R., Puckett, H.M., Stephenson, M., Smith, R.W., Wilson, C.J. & Taberski, K.M. 2001.** Evaluation and use of sediment toxicity sites for statistical comparisons in regional assessments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1266-1275.
- Hutchinson, T.H., Solbe, J. & Kloepper-Sams, P.J. 1998.** Analysis of the ecotoc aquatic toxicity (EAT) database III- Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere*, 36(1): 129-142.
- Hyland J.L., Balthis, W.L., Engle, V.D., Long, E.R., Paul, J.F., Summers, J.K. & Van Dolah, R.F. 2003.** Incidence of stress in benthic communities along the U.S. Atlantic and Gulf of Mexico coasts within different ranges of sediment contamination from chemical mixtures. *Environ. Monit. Assess.*, 81: 149-161.
- Hylander, L.D. & Meili, M. 2003.** 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci. Total Environ.*, 304: 13-27.
- INA (Instituto Nacional del Agua). 1998.** Estudio para la Determinación de Valores Guía, Criterios de Calidad y Procedimientos para el Manejo de Sedimentos a Dragar. (Administración General de Puertos S.E.)

**IADC/CEDA, 1997.** Guide 2 – Conventions, Codes and Conditions, Marine Disposal and Land Disposal. International Association of Dredging Companies/Central Dredging Association.

**Ingersoll, C.G. & Nelson, M.K. 1990.** Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera). In Aquatic Toxicology and Risk Assessment, 13th volume, eds. W.G. Landis and W.H. van der Schalie, 93-109. ASTM STP 1096. Philadelphia, PA.

**Ingersoll, C.G. 1995.** Sediment Test. In: "Fundamental of aquatic toxicology". Rand, G. M. (eds) Taylor and Francis, Washinton, DC. pp: 231-255.

**Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Dwyer, F.J., Hardesty, D.K. & Kemble, N.E. 1998.** Use of sublethal endpoints in sediment toxicity tests with the amphipod *Hyalella azteca*. Environ. Toxicol. Chem., 17: 1508-1523.

**IRAM, 2003.** Norma Argentina, Calidad ambiental y Calidad del agua de muestreo. Parte 16: Guía para el bioensayo de muestras. IRAM 29012-16:2003.

**Janssen, C.R., Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C. & Allen, H E. 2003.** Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. Environ. Int., 28(8): 793-800.

**Jergentz, S., Mugni, H., Bonetto, C. & Schulz, R. 2004.** Runoff-related endosulfan contamination and aquatic macroinvertebrate response in rural basins near Buenos Aires, Argentina. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 46(3):345-352.

**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, 61: 817-826.

**Kemble, N.E., Brumbaugh, W.G., Brunson, E.L., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G., Monda, D.P. & Woodward, D.F. 1994.** Toxicity of metal-contaminated sediments from the upper Clark Fork River, MT, to aquatic invertebrates in laboratory exposures. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1985-1997.

**Kemble, N.E., Dwyer, F.J., Ingersoll, C.G., Dawson, T.D. & Norberg-King, T. 1999.** Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem., 18(2):222-230.

**King, C.K., Dowse, M.C., Simpson, S.L. & Jolley, D.F. 2004.** An assessment of five Australian polychaetes and bivalves for use in whole-sediment toxicity tests: toxicity and accumulation of copper and zinc from water and sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47: 314–323.

**Kooijman S.A.L.M. 1987.** A safety Factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. Water Res., 21(3):269-76.

**Krebs, F. 2005.** The pt-method as a hazard assessment scheme for sediments and dredged material. In: Blaise, C. and Féraud, J.F. (eds.) "Small-scale Freshwater Toxicity Investigations" (Volume 2, Hazard Assessment Schemes), Springer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pages 281-304.

**Kreimer, E.D., Palacios, D.E. & Ronco, A.E. 1996.** A proposal for dredging contaminated sediments at the Dock Sud Port, Argentina. Proceedings of the International Symposium on Coastal Ocean Space Utilization, COSU'96, 435-445, Buenos Aires.

- Kubitz, J.A., Besser, J.M., & Giesy, J.P. 1996.** A two step experimental design for a sediment bioassay using growth of amphipod *Hyalella azteca* for the test endpoint. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:1783-1792.
- Kukkonen, J.V.K. & Landrum, P.F., 1996.** Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. *Chemosphere*, 32:1063-1076.
- Kukkonen, J.V.K., Landrum, P.F., Mitra, S., Gossiaux, D.C., Gunnarson, J. & Weston, D. 2003.** Sediment characteristics affecting desorption kinetics of select PAH and PCB congeners for seven laboratory spiked sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 4656-4663.
- Lacerda, L.D. 1997.** Global mercury emissions from gold and silver mining. *Water Air Soil Pollut.*, 97:209–221.
- Landrum, P.F. & Robbins, J.A. 1990.** Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In Baudo R, Giesy JP, Muntau H, eds, *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants*. Lewis, Ann Arbor, MI, USA, pp 237–263.
- Lahr, J., Maas-Diepeveen, J.L., Stuijzand, S.C., Leonards, P.E.G., Druke, J.M., Lucker, S., Espeldoorn, A. Kerkum, L.C.M., Van Stee, L.L.P. & Hendriks, A.J. 2003.** Responses in sediment bioassays used in the Netherlands: Can observed toxicity be explained by routinely monitored priority pollutants? *Water Res.*, 37: 1691-1710
- Lasier, P.J., Winger, P.V. & Reinert, R.E. 1997.** Toxicity of alkalinity to *Hyalella azteca*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59:807-814.
- Lee, H., Boese, B.L., Pellitier, J., Winsor, M., Specht, D.T. & Randall, R.C. 1989.** Guidance manual: Bedded sediment bioaccumulation tests. U.S. Environmental Protection Agency, Pacific Ecosystems Branch, Bioaccumulation Team, Newport, Oregon. EPA 60 O/x-89-302.
- Lee, B. 2000.** Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. *Science*, 287(5451): 282-284.
- Long, E.R. & Chapman, P.M. 1985.** A sediment quality triad measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Mar. Pollut. Bull.*, 16: 405-415.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Cubbage, J.C. & Ingersoll, CG. 1998.** Predicting the toxicity of sediment-associated trace metals with simultaneously extracted trace metals: acid-volatile sulfide concentrations and dry weight-normalized concentrations: a critical comparison. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(5): 972-974.
- Long, E.R. & Morgan, L.G. 1991.** The potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the National Status and Trends Program. NOAA Technical Memorandum NOS OMA 52, National Oceanic and Atmospheric Administration, Seattle, WA, 175 pp.
- Long, E.R. 2000.** Spatial extent of sediment toxicity in US estuaries and marine bays. *Environ. Monit. Assess.*, 64:391-407.
- Lomniczi, I., Boemo, A. & Musso, H. 2004.** Mercury pollution of the Juramento River water system (Salta province, Argentina). *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 92(4/6): 65-75.

- Lopretto, E.C. 1983.** Contribución a la bioecología del anfípodo dulceacuícola *Hyalella pampeana* Cavalieri. Desarrollo embrionario. Limnobiós, 2(7): 471-490.
- Losso, C., Arizzi Novelli, A., Picone, M., Marchetto, D., Pessa, G., Molinaroli, E., Ghetti, P.F. & Volpi Ghirardini, A. 2004.** Evaluation of surficial sediment toxicity and sediment physicochemical characteristics of representative sites in the Lagoon of Venice (Italy). J. Marine Syst., 51: 281-292.
- Lu, H., Moran, C.J., Prosser, I.P. & DeRose, R. 2004.** Investment prioritization based on broadscale spatial budgeting to meet downstream targets for suspended sediment loads, Water Resources Research 40 -W09501
- McCahon, C.P., Carling, P.A. & Pascoe, D. 1998.** Chemical and ecological effects of a Pennine peat-slide. Environ. Pollut., 45: 275-289.
- MacDonald, D.D, Ingersoll, C.G. & Berger, T.A. 2000.** Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39:20-31.
- Machado, W., Santelli, R.E., Loureiro, D.D., Oliveira, E.P., Borges, A.C. & Lacerda, L.D. 2008.** Mercury accumulation in sediments along an eutrophication gradient in Guanabara Bay, Southeast Brazil. J. Braz. Chem. Soc., 19(3):569-575.
- Mackay, D. 2001.** Multimedia Environmental Models: The Fugacity Approach, 2nd ed., CRC Press/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p. 272.
- Mahony, J.D., Di Toro, D.M., Gonzales, A.M., Curto, M., Dilg, M., De Rosa, L. & Sparrow, L.A. 1996.** Partitioning of metals to sediment organic carbon. Environ. Toxicol. Chem., 15(12): 2187-2197.
- Manassero, M., Camilión, C. & Ronco, A. 2010.** Análisis y vinculación de texturas, argilominerales y metales en sedimentos de fondo de arroyos de la Franja Costera Sur Bonaerense. Revista de la Asociación Geológica Argentina, 67(1): 105-111.
- Marcovecchio, J.E., Moreno, V.J. & Pérez, A. 1986a.** Biomagnification of total mercury in Bahia Blanca Estuary shark. Mar. Pollut. Bull., 17: 276-278.
- Marcovecchio, J.E., Obenat, S.M., Pérez, A. & Moreno, V.J. 1986b.** Total mercury and lead contents in the biota at Mar Chiquita coastal lagoon, Province of Buenos Aires, Argentine Republic. J. Shoreline Manage, 2: 207-222.
- Marcovecchio, J.E. & Moreno, V.J., 1993.** Cadmium, zinc and total mercury levels in the tissues of several fish species from La Plata River estuary, in Argentina. Environ. Monit. Assess., 25 (2): 119-130.
- Marcovecchio, J., Andrade, S., Ferrer, L., Asteasuain, R., De Marco, S., Gavio, M.A., Scarlato, N., Freije, R.H. & Pucci, A.E. 2001.** Mercury distribution in estuarine environments from Argentina: the detoxification and recovery of salt-marshes after 15 years. Wetl. Ecol. Manag., 9 (4):317-322.
- Marcovecchio, J. 2004.** The use of *Micropogonias furnieri* and *Mugil liza* as biological indicators of heavy metals pollution in La Plata River estuary (Argentina). Sci. Total Environ., 323 (1-3):219-226.

- Marino, D. & Ronco, A. 2005.** Cypermethrin and chlorpiryfos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 75:820-826.
- Martin, J.W. & Davis, G.E. 2001.** An updated classification of the recent crustacea, Natural History Museum of Los Angeles County, Los Angeles, California.
- Mathiessen, P., Sheahan, D., Harrisson, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, V. & Williams, R. 1995.** Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 30: 111-119.
- Mayer, F.L.Jr. & Ellersieck, M.R. 1986.** Manual of Acute Toxicity: Interpretation and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals. Resour.Publ.No.160, U.S.Dep.Interior, Fish Wildl.Serv., Washington, DC :505 pp. (USGS Data File)
- McNulty, E.W., Dwyer, F.J., Ellersieck, M.R., Greer, E.I., Ingersoll, C.G., & Rabeni, C.F. 1999.** Evaluation of ability of reference toxicity tests to identify stress in laboratory populations of the amphipod *Hyalella azteca*. *Environ.Toxicol.Chem.* 18: 544-548.
- McPherson, C., Chapman, P.M, deBruyn, A.M.H. & Cooper, L. 2008.** The importance of benthos in weight of evidence sediment assessments - a case study. *Sci. Total. Environ.*, 394 (2-3): 252-264.
- Meister, R. & Van Den Brink, P.J. 2000.** The analysis of laboratory toxicity experiments. In : *Statistics in Ecotoxicology*. Sparks T., John Wiley & Sons (Eds.), Chichester, England. Cap 4: 99-118.
- Milani, D., Reynoldson, T.B., 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(4):845-854
- Mirlean, N., Baraj, B., Niencheski, L.F., Baisch, P. & Robinson, D. 2001.** The effect of accidental sulphuric acid leaking on metal distributions in estuarine sediment of Patos Lagoon. *Mar. Pollut. Bull.*, 42:1114-1117.
- Moore, J. W. 1975.** The Role of Algae in the Diet of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *J. Anim.I Ecol.*, 44: 719-730.
- Moore, D.W. & Farrar, J.D. 1996.** Effect of growth on reproduction in the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Hydrobiologia* 328:127-134.
- Moore, J.N. & Luoma, S.N. 1990.** Hazardous wastes from large-scale metal extraction, *Environ. Sci. Technol.*, 24: 1278-1285.
- Mountouris, A., Voutsas, E. & Tassios, D. 2002.** Bioconcentration of heavy metals in aquatic environments: the importance of bioavailability. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 1136-1141.
- Morel, F.M., Kreapiel, A.M.L. & Amyot, M. 1998.** The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 29: 543-566.
- Moresco, H. & Dol, L. 1996.** Metales en sedimentos de la Bahía de Montevideo, *Rev. Asoc. Cienc. Naturales Litoral* 27: 1-5.
- Mugni, H.D. 2009.** Concentración de nutrientes y toxicidad de pesticidas en cuerpos de agua superficial de areas rurales. Tesis Doctoral, Universidad nacional de La Plata 140 pp.

- Munawar, M., Dermott, R., McCarthy, L.H., Munawar, S.F. & van Stam, H.A. 1999.** A comparative bioassessment of sediment toxicity in lentic and lotic ecosystems of the North American Great Lakes. *Aquat. Ecosyst. Health Mang.*, 2(4): 367-378.
- Muniz, P., Venturini, N. & Martínez, A. 2002.** Physico-chemical and pollutants of the benthic environment of the Montevideo Coastal Zone, Uruguay. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 962–968.
- Muniz, P., Danulat, E., Yanicelli, B., García Alonso, J., Medina, G. & Bicego, M.C. 2004.** Assessment of contaminated heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environ. Int.*, 29: 1019-1028.
- Muskó, I. B. 1993.** The Life History of *Corophium curvispinum* Sars (Crustacea, Amphipoda) Living on Macrophytes in Lake Balaton. *Hydrobiology*, 243/244: 197-202.
- Muyssen, B.T. & Janssen, C.R. 2007.** Age and exposure duration as a factor influencing Cu and Zn toxicity toward *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 68(3): 436-42.
- Naddi, C. & Collins, F. 2002.** The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater. *Environmental Toxicology.*, 21(2): 347-352.
- Nascimento, I.A. 2007.** Key issues on sediment quality assessment: A review of South American research with emphasis on Brazil. *Aquat. Ecosyst. Health*, 10(1): 9-22.
- Nebeker A.V., Cairns, M.A., Gakstatter, J.H., Malueg, K.W., Schuytema, G.S. & Krawczyk, D.F. 1984.** Biological methods for determining toxicity of contaminated freshwater sediments to invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 3:617-630.
- Nebeker, A.V., Onjukka, S.T., Stevens, D.G., Chapman, G.A. & Dominguez, S.E. 1992.** Effects of low dissolved oxygen on survival, growth and reproduction of *Daphnia*, *Hyalella* and *Gammarus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:373-379.
- Nelson, M.K., Landrum, P.F., Burton, G.A., Jr, Klaine, S. J., Crecelius, E.A., Byi, T.D., Gossiaux, D.C., Tsymbal, V.N., Cleveland, L., Ingersoll, C.G. & Sasson-Brickson, G. 1993.** Toxicity of contaminated sediments in dilution series with control sediments. *Chemosphere* 27:1789- 1812
- Neuparth, T., Correia, A.D., Costa, F.O. & Costa, M.H. 2005.** Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I . Biochemical endpoints. *Mar. Environ. Res.*, 60(1): 69-91.
- Newman, M.C. & Unger, M.A. 2003.** “Fundamentals of Ecotoxicology”. Eds. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Newman, M.C. & Clements, W.H. 2008.** *Ecotoxicology: A comprehensive treatment*. Eds. Taylor & Francis Group.
- Norton, B.L., Lewis, M.A. & Mayer, F.L. 1999.** Storage duration and temperature and the acute toxicities of estuarine sediments to *Mysidopsis bahia* and *Leptocheirus plumulosus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63: 157-166.
- O’Day, P.A., Carroll, S.A., Randall, S., Martinelli, R.E., Anderson, S.L., Jelinski, J. & Knezovich, J.P. 2000.** Metal speciation and bioavailability in contaminated estuary sediments, Alameda Naval Air Station, California. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 3665-3673.

**OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 1993.** Guidelines for the testing of chemicals. Vol. 1 y 2, Paris, Francia.

**OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2004a.** *Daphnia sp.*, acute immobilisation test. Guideline for testing of chemicals No. 202, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris .

**OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). 2004b.** Sediment-Water Chironomid toxicity test using spiked sediment. Guideline for testing of chemicals No. 218, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris .

**O'Farrell, I., Lombardo, L., De Tezanos Pinto, E. & Loez, C. 2002.** The assessment of water quality in the Lower Lujan River (Buenos Aires, Argentina): phytoplankton and algal bioassays. *Environ. Pollut.*, 120(2):207-218.

**Ogendi, G. Hannigan, R.E., Farris & Brumbaugh, J.L. 2007.** Effects of acid-volatile sulfide on metal bioavailability and toxicity to midge . *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(2): 325-334.

**Oliveira-Filho, E.C.D., Lopes, R.M. & Jos, F. 2004.** Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. *Chemosphere*, 56: 369-374.

**Paine, P.J. 1994.** Compliance with chlor-alkali mercury regulations, 1986–1989: status report, Report EPS 1/HA/2, 1–43. Avail. from Environmental Protection Publications, Environment Canada, Ottawa, Ontario K1A OH3.

**PARCOM. (1993).** Report of the Paris Commission sediment reworker ring test. London: Oslo and Paris Commissions.

**Park, E.J., Jo, H.J. & Jung, J. 2009.** Combined effects of pH, hardness and dissolved organic carbon on acute metal toxicity to *Daphnia magna*, *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 82-85.

**Pennak, R.W. 1989.** Freshwater Invertebrates of the United States. John Wiley and Sons, Inc., New York. 628 p.

**Pereira, M. E., Lillebo, A. I., Pato, P., Válega, M., Coelho, J.P., Lopes, C.B., Rodrigues, S., Cachada, A., Otero, M., Pardal, M.A. & Duarte, A.C. 2008.** Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal):a review of the system assessment. *Environ. Monit. Assess.*

**Phipps, G.L., Mattson, V.R. & Ankley, G.T. 1995.** Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten contaminants. *Environmental Protection*, 286: 281-286.

**Pickering, Q.H. 1988.** Evaluation and comparison of two short-term fathead minnow test for estimating chronic toxicity. *Water Res.*, 22:883-893.

**Pizarro, H & Alemanni, E.E. 2005.** Variables físico-químicas del agua y su influencia en la biomasa del perifiton en un tramo inferior del Río Luján (Provincia de Buenos Aires) . *Ecología Austral*, 15: 73-88.

**Poretti, T., Casset, M.A. & Momo, F. 2003.** Composición química y dinámica poblacional de. *Biología Acuática*, 20:2001-2004.

**Quinn, G.P. & Keough, M.J. 2002.** Experimental Design and Data for Biologists. Cambridge University Press, 537 pp.

- Rand, G. M., Wells, P. G. & McCarty, L. S. 1995.** Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G. M. (eds) "Fundamental of aquatic toxicology". Taylor and Francis, Washinton, DC. Pages: 3-66.
- Reddy, M.M. & Aiken, G.R. 2001.** Fulvic acide-sulfide ion competition for mercury ion binding in the Florida everglades. *Water, Air, Soil Pollution*, 132:89-104.
- Reynoldson, T.B., Day, K.E., Clarke, C. & Milani, D. 1994.** Effect of indigenous animals on chronic endpoints in freshwater sediment toxicity tests. *Environ. Contam. Toxicol.* 13:973-977.
- Riba, I., Casado-Martínez, M.C., Forja, J.M. & DeIvalls, T. 2004.** Sediment quality in the Atlantic coast of Spain. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(2): 271-282.
- Ribeiro -Guevara, S., Bubach, D. & Arribére, M. 2004.** Mercury in Lichens of Nahuel Huapi National Park, Patagonia, Argentina, *J. Radioanal. Nucl. Ch.*, 261, 679–687.
- Ribeiro Guevara, S., Rizzo, A., Sánchez, R. & Arribére, M. 2005.** Heavy metal inputs in Northern Patagonia lakes from short sediment cores analysis. *J. Radioanal. Nucl. Ch.*, 265: 481-493.
- Rifkin, E., Gwinn, P & Bouwer, E. 2004.** Chromium speciation indicates toxicity of benthic organisms better than total chromium does. *Environ. Sci. Technol*, 15: 267-271.
- Robinson, S., MacLellan, D., Tear, L. & Gribbon, K. 1997.** Triad evaluation of mercury contaminated sediments in a shallow Texas Gulf coast estuary. Abstract, 18th Annual Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) meeting, San Francisco, CA
- Roman, Y.E., Schamphelaere, K.A.C.D., Nguyen, L.T.H. & Janssen, C.R. 2007.** Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Environ. Toxicol.*, 387: 128-140.
- Ronco, A.E., Sobrero, M.C., Alzuet, P.R., Bulus Rossini, G. & Dutka, B.1995.** Screening for sediment toxicity in the Río Santiago basin: A base line study. *Environ. Toxicology and Water Quality. An International Journal*, 10 (1):35-39
- Ronco, A.E., Sobrero, M.C. & Bulus Rossini, G.D. 1993.** Pollution studies in the Río Santiago basin, tributary of the Río de la Plata estuary: Preliminary risk assessment evaluation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51:657-664.
- Ronco, A.E. 1997.** Hierro y manganeso en agua y sedimentos del Río de la Plata y Tributarios, Taller Internacional Hierro y Manganeso, Buenos Aires, Argentina, Noviembre de 1997. AIDIS Argentina, IWSA-AIDE. 7 pp.
- Ronco, A.E., Sobrero, C., Grassi, V., Kaminski, L., Massoio, L. & L. Mina. 2000.** Watertox bioassay intercalibration network: results from Argentina. *Environmental Toxicology*, 287-297.
- Ronco, A.E., Camilion, C. & Manassero, M. 2001.** Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Geochemistry and Health*, 23:89-103
- Ronco, A., Castillo, G., Díaz-Baez, M.C., Bulus, G., Ahumada, I., Espinoza, A., Mendoza, J., Sobrero, C. & Apartin, C. 2005.** The application of Hazard Assessment Schemes using the Watertox toxicity testing battery In: Blaise, C. and Férard, J.F. (eds.) "Small-scale

Freshwater Toxicity Investigations" (Volume 2, Hazard Assessment Schemes), Springer Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pages 233- 256.

**Ronco, A., Camilión, C. & Manassero, M. 2007.** Metal occurrence and textural-compositional properties in bottom sediments from right margin tributaries of the lower del Plata basin. *Latin Am. J. Sediment Basin Analysis*, 14(1):1-9.

**Rue, W.J., Fava, J.A. & Grothe, D.R. 1988.** A review of inter-and intralaboratory effluent toxicity test method variability. In: *Aquatic toxicology and hazard evaluation*. 10th Vol. Adams W.J., Chapman G.A. & Landis W.G. (Eds.). Philadelphia. p 190-203.

**Rudolph A., Franco, C., Becerra, J., Barros, A. & Ahumada, R. 2002.** Evaluación de materia orgánica e hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos superficiales, bahía Concepción-Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47: 403-410.

**Rust, A.J., Burgess, R.M., McElroy, A.E., Cantwell, M.E. & Brownawell, B. J. 2004.** Role of source matrix in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to deposit-feeding benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(11): 2604-2610.

**Sala, J.M. 1972.** Contribución al conocimiento geohidrológico de la porción oriental de la cuenca del río Luján y las correspondientes a los arroyos Escobar, Garin, Claro y de Las Tunas. Consejo Federal de Inversiones, 1- 49, EASNE, Buenos Aires.

**Salibian, A. 2006.** Ecological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 185: 35-65.

**Salomon, W. & Forstner, U. 1985.** *Metals in the Hydrocycle*. , Springer, Berlin .

**Santos, A., Alonso, E., Callejon, M. & Jimenez, J.C. 2002.** Heavy metal content and speciation in groundwater of the Guadiamar river basin. *Chemosphere* 48: 279-285.

**Shaw, I.C. & Chadwich, J. 1998.** *Principles of Environmental Toxicology*. Taylor & Francis, Ltd, London, 216 pp

**Sibley, P.K., Ankley, G.T., Cotter, A.M. & Lenoard, E.N. 1996.** Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc: An evaluation of the acid-volatile sulfide (AVS) model using a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:2102-2112.

**Schulz, R. 2003.** Using a freshwater amphipod in situ bioassay as a sensitive tool to detect pesticide effects in the field. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 1172-1176.

**Sferra, J.C., Fuchsman, P.C., Wenning, R.J. & Barber, T.R. 1999.** A site-specific evaluation of mercury toxicity in sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37: 488-495.

**Shoemaker, C.R. 1942.** A new species of Amphipoda from Uruguay and Brazil. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 32: 80-82.

**Shuhaimi-Othman, M. 2008.** Metal concentration in the sediments of Richard Lake, Sudbury, Canada and sediment toxicity in an amphipod *Hyalella azteca*. *J. Environ. Sci. Technol.*, 1(1): 34.

**Stooff, W. 1983.** Benthic Macroinvertebrates and Water Quality Assessment: Some Toxicological Considerations. *Aquat.Toxicol.* 4:73-82

- Smith, S.L., MacDonald, D.D., Keenleyside, K.A., Ingersoll, C.G. & Field, J. 1996.** A preliminary evaluation of sediment quality assessment values for freshwater ecosystems. *J Great Lakes Res* 22:624–638
- Simpson, S.L., Rochford, L. & Birch, G.F. 2002.** Geochemical influences on metal partitioning in contaminated estuarine sediments. *Marine and Freshwater Research*, 53(1):9-17.
- Simpson, S.L., Angel, B.M. & Jolley, D.F. 2004.** Metal equilibration in laboratory-contaminated (spiked) sediments used for the development of whole-sediment toxicity tests. *Chemosphere*, 54: 597-609.
- SMAyDS, OPS, PNA, UNLP. 2006.** Caracterización Sanitaria y Ambiental de las aguas en tramos específicos de los Ríos Paraná y Paraguay y sus afluentes. Informe Técnico, Secretaría de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable, Organización Panamericana de la Salud, Prefectura Naval Argentina, Universidad Nacional de La Plata, 90 pp.
- Smith, M.E., Lazorchak, J.M., Herrin, L.E., Brewer-Swartz, S., & Thoney, W.T. 1997.** A reformulated, reconstituted water for testing the freshwater amphipod, *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:1229-1233.
- Sormunen, A. 2008.** Bioavailability assessment of sediment-associated organic compounds through desorption and pore-water concentration. University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology N°55.
- Spencer, R.M., Montenegro, J.L., Gaibor, A, Perez, E.P, Mantilla, G, Viera, F & Spencer, C.E. 2002.** The Portovelo-Zaruma mining camp, SW Ecuador: porphyry and epithermal environments, *Society of Economic Geologists Newsletter* 49: 8-14.
- Sprovieri, M., Feo, M.L, Prevedello, L., Manta, D.S., Sammartino, S., Tamburrino, S. & Marsella, E. 2007.** Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy). *Chemosphere*, 67(5): 998-1009.
- Steevens, J.A. & Benson, W.H. 1998.** *Hyalella azteca* 10-day sediment toxicity test: Comparison of growth measurement endpoints. *Environ. Toxicol. Water. Qual.*, 13:243-248.
- Suedel, B.C. & Rodgers, Jr. J.H. 1994.** Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1163-1176.
- Suedel, B.C., Deaver, E. & Rodgers, J.H. 1996.** Formulated sediment as a reference and dilution sediment in definitive toxicity tests. *Arch Environ Contam Toxicol.*, 52: 47-52.
- Sznopek, J.L. & Goonan, T.G. 2000.** The materials flow of mercury in the economies of the United States and the world. US Geological Survey Circular 1197, version 1.0, Denver, Colorado, 28 pp.
- Traunspurger, W & Drews, C. 1996.** Toxicity analysis of freshwater and marine sediment with meio- and macrobenthos organisms. *Hydrobiologia*, 328:215-261
- Triverdi, P. & Axe, L. 2000.** Modelling Cd and Zn sorption to hydrous metal oxides. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 2215-2223.
- True, C.J. & Heyward, A.A. 1990.** Relationships between Microtox test results, extraction methods, and physical and chemical compositions of marine sediment samples. *Toxic Assess* 5:29–45.

**Tsui, M.T.K. & Chu, L.M. 2003.** Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52: 1189-1197.

**Tsui, M.T.K. & Chu, L.M. 2004.** Environmental contamination and comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46: 316 -323.

**UNEP (United Nations Environmental Program). 2008.** The global atmospheric mercury assessment: sources, emissions and transport. <http://www.chem.unep.ch/mercury>.

**USEPA (Environmental Protection Agency). 1983.** Method 418.1, Petroleum Hydrocarbons, *Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*, United States Environmental Protection Agency, EPA 600/4-79-020.

**USEPA (Environmental Protection Agency). 1989.** Short-Term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Cincinnati: EPA/600/4-89/001.

**USEPA (Environmental Protection Agency). 1986.** *Test methods for evaluating solid waste*. United States Environmental Protection Agency, Washington DC.

**USEPA (Environmental Protection Agency). 1991.** Technical Support Document for Water Quality-Based Toxic Control. EPA/440/4-85-032. Washington, DC.

**USEPA (Environmental Protection Agency). 1992.** Sediment Classification Methods Compendium. Office of Science and Technology. Report: EPA 823-R-92-006.

**USEPA (Environmental Protection Agency). 1993.** Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh- water and marine organisms, 4th ed. EPA-600/4-90/027F. Office of Research and Development, Cincinnati, OH.

**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), 1995.** QA/QC Guidance for Sampling and Analysis of Sediments, Water, and Tissues for Dredged Material Evaluations. Office of Water. Report: 823-B-95-001

**USEPA (Environmental Protection Agency).1998.** Contaminated sediment management strategy. EPA 823-R-98-001. Office of Water, Washington, DC.

**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 (Environmental Protection Agency). 2001.** Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA-823-B-01-002.

**USEPA. (Environmental Protection Agency). 2005.** Procedures for the derivation of equilibrium partitioning sediment benchmarks (ESBs) for the protection of benthic organisms:

metal mixtures (Cadmium, Copper, Lead, Nickel, Silver and Zinc). Office of Research and Development. Washington, DC 20460. EPA-600-R-02-011.

**USEPA ECOTOX Data Bank, AQUIRE** (Aquatic toxicity Information Retrieval) database. U.S. Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, Minnesota, USA. <http://www.epa.gov/ecotox>

**Venturino, A., Montagna, C.M. & De D'Angelo, A.M.P. 2007.** Risk assessment of Magnacide-« H herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 3: Studies on native species. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26(1): 176:182.

**Verrengia Guerrero, N.R. & Kesten, E.M. 1994.** Levels of heavy metals in waters from the La Plata River, Argentina: An approach to assess bioavailability. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 254-260.

**Verrengia Guerrero, N.R., Taylor, M.G., Wider, E.A. & Simkiss, K. 2003.** Influence of particle characteristics and organic matter content on the bioavailability and bioaccumulation of pyrene by clams. *Environ. Pollut.*, 121(1): 115-122.

**Villar, C., Stripeiskis, J., Tudino, M.D., Huicque, L., Troccoli, O. & Bonetto, C. 1999.** Trace metal concentrations in coastal marshes of the Lower Paraná River and the Río de la Plata Estuary. 1999. *Hydrobiologia*, 397: 187-195.

**Villar, C., Stripeikis, J., D'huicque, L., Tudino, M. & Bonetto, C. 2002.** Concentration and transport of particulate nutrients and metals in the Lower Paraná River during extreme flooding. *Archiv fur Hydrobiologie*, 153(2): 273-286.

**Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sidly, R.M. & Peakall, D.B. 2006.** Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, 315 pp.

**Wang, W.-X., Stupakoff, I., Gagnon, C. & Fisher, N.S. 1998.** Bioavailability of inorganic and methylmercury to a marine deposit-feeding polychaete. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 2564-2571

**Watras, C.J., Black, R.C., Halvorsen, S., Hudson, R.J.M., Morrison, K.A. & Wente, S.P. 1998.** Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Sci. Total Environ.*, 219: 183-208.

**Weber, C.I. 1993.** Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, fourth ed. Environmental Monitoring systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio. EPA 600/4-90/027.

**Wellborn, G.A. 2000.** Selection on a sexually dimorphic trait in ecotypes within the *Hyalella azteca* species complex (Amphipoda: Hyalellidae), *American Midland Naturalist* 143: 212-225.

**Wen, Y.H. 1992.** Life History and Production of *Hyalella azteca* (Crustacea, Amphipoda) in a Hypereutrophic Prairie Pond in Southern Alberta. *Can. J. Zoology*, 70: 1417-1424.

**Welsh, P.G., Lipton, J., Chapman, G.A. & Podrabsky, T.L. 2000.** Relative importance of calcium and magnesium in hardness-based modification of copper toxicity, *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1624-1631

**Wenning, R.J., Ingersoll, C.G., Batley, G. & Moore, D.W. 2004.** Use of Sediment Quality Guidelines (SQGs) and Related Tools for the Assessment of Contaminated Sediments, SETAC Press (Society of Environmental Toxicology and Chemistry): Pensacola, FL.

**Weston, D.P. 1996.** Further development of a chronic *Ampelisca abdita* bioassay as an indicator of sediment toxicity. San Francisco Estuary Regional Monitoring Program, San Francisco Estuary Institute, RMP Contribution # 17, Richmond.

**Wiener, J.G., Krabbenhoft, D.P., Heinz, G.H. & Scheuhammer, A.M. 2003.** Ecotoxicology of mercury. In: D.J. Hoffman, B.A. Rattner, G.A. Burton Jr and J. Cairns Jr, Editors, Handbook of ecotoxicology, Lewis Publishers, Boca Raton, FL , pp. 409–463.

**Winger, P.V., Lasier, P.J. & Geitner, H. 1993.** Toxicity of sediments and pore water from Brunswick Estuary, Georgia. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25:371-376

**Wright, D.A. & Welbourn, P. 2002.** Environmental Toxicology. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge University Press, xxiv+630 pp.

**Yong, N.R. 1995.** The fate of toxic pollutants in contaminated sediments. In Demars K.R, Yong R.N. and Chaney R.C. (eds.), *Dredging, Remediation, and Containment of Contaminated Sediments*. American Society for Testing and materials, Philadelphia, PA, pp 13-39

**Yim, J.H., Kim, K.W. & Kim, S.D. 2006.** Effect of hardness on acute toxicity of metal mixtures using *Daphnia magna*: prediction of acid mine drainage toxicity. J. Hazard. Mater., 138: 6-21

**Zar, J.H. 2010.** Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, New York, 944 pp.

**Zhong, H. & Wang, W.-X. 2006.** Sediment-bound inorganic Hg extraction mechanisms in the gut fluids of marine deposit feeders. Environ. Sci. Technol., 40: 6181-6186.

## Anexo

### Tablas correspondientes al Capítulo V

**Tabla 1: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el experimento 1 correspondientes a los tiempos inicial (Día 0) y final (Día 21) de ensayo para los distintos tratamientos.**

Tratamiento	pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	Conductividad ( $\mu$ s.cm <sup>-1</sup> )	Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	Amonio (mg NH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> )
<b>Día 0</b>					
<b>BI</b>	7,69	7,8	770	240	0,3
<b>0,1</b>	7,96	8,1	949	220	0,5
<b>0,5</b>	7,99	7,8	983	206	0,6
<b>1,0</b>	7,89	8,2	981	246	0,5
<b>2,0</b>	8,08	7,6	944	225	0,6
<b>3,0</b>	7,95	7,8	970	210	0,6
<b>Día 21</b>					
<b>BI</b>	7,93	6,5	877	281	0,2
<b>0,1</b>	8,06	6,0	950	265	0,3
<b>0,5</b>	8,01	7,1	962	240	0,2
<b>1,0</b>	8,16	6,8	976	278	0,4
<b>2,0</b>	7,76	6,0	960	245	0,3
<b>3,0</b>	7,89	6,2	970	258	0,2

**Tabla 2: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el experimento 2 correspondientes al tiempo inicial (Día 0) de ensayo para todas las concentraciones en los tres tratamientos: sedimento formulado sin materia orgánica (s/MO), sedimento formulado con materia orgánica (c/MO) y sedimento de Juan Blanco (JB).**

Tratamiento	pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	Conductividad (ms.cm <sup>-1</sup> )	Dureza (mg.L <sup>-1</sup> )	Amonio (mg NH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> )
<b>BI s/MO</b>	8,13	8,1	1,060	216	<0,2
<b>1,68 s/MO</b>	8,33	8,3	1,029	Nd	<0,2
<b>2,4 s/MO</b>	8,40	7,9	1,031	Nd	<0,2
<b>3,43 s/MO</b>	8,42	7,5	1,068	Nd	<0,2
<b>4,9 s/MO</b>	8,43	7,9	1,074	Nd	<0,2
<b>7 s/MO</b>	8,45	8,1	1,063	Nd	<0,2
<b>BI c/MO</b>	7,33	8,2	1,015	224	<0,2
<b>3,5 c/MO</b>	7,41	7,9	1,035	220	<0,2
<b>5 c/MO</b>	7,46	7,5	1,008	Nd	<0,2
<b>7 c/MO</b>	7,54	8,1	1,052	Nd	<0,2
<b>10 c/MO</b>	7,61	8,3	1,057	Nd	<0,2
<b>BI JB</b>	8,21	8,4	1,090	226	0,4
<b>3,5 JB</b>	7,98	7,8	1,065	Nd	0,3
<b>5 JB</b>	8,10	7,2	1,047	Nd	0,4
<b>7 JB</b>	7,85	7,5	1,068	Nd	0,2
<b>10 JB</b>	7,96	7,2	1,075	Nd	0,4

**Tabla 3: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante en el experimento 2 correspondientes al tiempo final (Día 21) de ensayo para todas las concentraciones en los tres tratamientos: sedimento formulado sin materia orgánica (s/MO), sedimento formulado con materia orgánica (c/MO) y sedimento de Juan Blanco (JB).**

Tratamiento	pH	OD (mg.L <sup>-1</sup> )	Conductividad (ms.cm <sup>-1</sup> )	Dureza (mg.L <sup>-1</sup> )	Amonio (mg NH <sub>4</sub> .L <sup>-1</sup> )
<b>BI s/MO</b>	7,96	6,8	1,154	264	0,4
<b>1,68 s/MO</b>	8,07	6,5	1,024	229	0,6
<b>2,4 s/MO</b>	8,07	6,2	1,075	Nd	0,6
<b>3,43 s/MO</b>	8,12	6,8	1,067	Nd	0,6
<b>4,9 s/MO</b>	8,11	7,1	1,058	Nd	0,5
<b>7 s/MO</b>	8,11	6,9	1,040	Nd	0,4
<b>BI c/MO</b>	7,66	6,2	0,948	242	0,5
<b>3,5 c/MO</b>	8,07	7,3	0,900	Nd	0,5
<b>5 c/MO</b>	8,11	6,9	0,929	Nd	0,3
<b>7 c/MO</b>	7,83	6,2	0,947	Nd	0,4
<b>10 c/MO</b>	7,90	6,8	0,935	Nd	0,6
<b>BI JB</b>	7,60	6,2	1,045	206	0,5
<b>3,5 JB</b>	7,69	6,8	1,042	Nd	0,4
<b>5 JB</b>	7,74	6,5	1,047	Nd	0,4
<b>7 JB</b>	7,70	7,2	1,075	Nd	0,5
<b>10 JB</b>	7,66	6,6	1,077	Nd	0,4

Nd: no determinado

## Tablas correspondientes al Capítulo VI

**Tabla 4: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante los bioensayo con sedimento completo del grupo A de muestras, correspondientes al tiempo inicial (Día 0) de ensayo.**

Sitio	pH				OD (mg.L <sup>-1</sup> )				Conductividad (ms.cm <sup>-1</sup> )				Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
<b>JB</b>	-----	-----	-----	7,9	-----	-----	-----	6,8	-----	-----	-----	1,072	-----	-----	-----	220
<b>RL</b>	7,9	8,2	7,8	8,1	7,0	6,8	6,5	6,7	0,78	0,77	0,74	0,70	200	195	208	185
<b>RIA</b>	8,1	8,0	7,9	8,2	7,2	6,6	6,4	6,2	1,17	1,20	1,25	1,31	200	223	200	204
<b>CO</b>	8,1	8,2	7,8	7,9	6,5	6,0	6,5	6,2	1,02	1,06	1,22	1,25	220	235	204	210
<b>AG</b>	7,9	7,7	7,9	7,8	7,2	7,1	6,8	6,5	1,25	1,07	1,22	1,08	196	220	207	187
<b>AP</b>	8,1	7,9	8,1	7,8	6,9	7,2	7,2	6,5	1,02	0,98	0,89	1,05	216	205	200	226
<b>PZ</b>	7,7	7,4	7,9	7,9	7,0	7,5	7,1	6,8	0,87	0,77	0,81	0,92	200	216	209	200

**Tabla 5: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante los bioensayo con sedimento completo del grupo A de muestras, correspondientes al tiempo final (Día 10) de ensayo.**

Sitio	pH				OD (mg.L <sup>-1</sup> )				Conductividad (ms.cm <sup>-1</sup> )				Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
<b>JB</b>	-----	-----	-----	7,9	-----	-----	-----	4,5	-----	-----	-----	0,76	-----	-----	-----	228
<b>RL</b>	8,1	8,5	7,8	8,2	4,1	3,8	3,5	4,0	0,70	0,72	0,85	0,87	220	208	224	200
<b>RIA</b>	7,9	8,1	7,8	8,5	3,5	3,8	3,4	-----	0,97	0,95	1,08	-----	200	223	200	235
<b>CO</b>	8,5	8,4	8,2	8,4	3,5	3,4	3,2	-----	0,82	0,82	1,2	-----	220	235	204	210
<b>AG</b>	8,2	8,4	8,1	8,5	4,2	5,1	4,2	3,8	1,30	1,25	1,18	1,08	235	220	225	245
<b>AP</b>	7,9	7,9	8,2	8,1	5,1	5,3	4,5	4,3	1,24	1,12	1,18	1,05	216	205	200	248
<b>PZ</b>	8,2	8,4	8,5	8,3	4,8	5,2	4,6	4,0	0,85	0,80	0,79	0,98	229	233	229	239

**Tabla 6: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante los bioensayo con sedimento completo del grupo B de muestras (Río Luján), correspondientes al tiempo inicial (Día 0) de ensayo.**

Sitio	pH				OD (mg.L <sup>-1</sup> )				Conductividad (ms.cm <sup>-1</sup> )			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
<b>ADS</b>	6,5	7,0	7,0	7,0	7,5	7,5	7,3	6,8	0,77	0,79	1,15	1,08
<b>ALS</b>	6,5	7,0	7,0	7,5	7,2	7,5	6,8	6,9	0,8	0,98	0,99	1,02
<b>R41</b>	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5	6,8	6,2	6,5	0,75	0,79	0,86	0,87
<b>PABL</b>	7,5	7,5	8,0	8,0	7,0	6,5	5,9	6,1	1,25	1,25	1,36	1,71
<b>PO</b>	7,5	7,0	8,0	8,0	6,8	6,4	6,2	6,2	1,08	0,98	1,25	1,35
<b>PG</b>	7,0	7,0	7,5	7,5	6,5	6,0	6,5	6,2	1,93	2,6	3,47	4,05
<b>TJ</b>	7,0	8,0	7,5	8,0	5,8	6,2	6,1	5,7	0,74	0,85	0,77	0,89
<b>ALD</b>	8,0	8,0	7,5	7,5	6,1	6,5	5,8	5,4	1,69	2,32	2,71	4,24
<b>R8P</b>	7,0	7,0	7,0	7,0	5,8	5,6	5,7	5,6	0,67	0,70	0,74	0,75
<b>RP</b>	7,5	7,5	7,5	8,0	5,2	5,1	5,3	4,9	1,23	1,39	1,50	1,55
<b>AORL</b>	-----	-----	-----	-----	6,5	7,1	6,8	6,5	1,09	1,07	1,06	1,06
<b>R9</b>	7,5	7,0	8,0	8,0	6,0	5,8	5,9	5,2	0,99	1,10	1,08	1,20
<b>CP</b>	7,5	7,5	8,0	8,0	6,2	6,5	5,5	5,8	0,85	0,97	0,98	1,06
<b>R6</b>	7,5	7,5	8,0	8,0	5,8	5,1	5,5	5,1	0,70	0,98	1,00	1,20
<b>ALA</b>	7,5	7,5	7,5	7,5	6,1	6,2	5,4	5,2	0,80	0,82	0,92	0,95

Sitio	Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )				Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )				Amonio (mg.L <sup>-1</sup> N-NH <sub>4</sub> )			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
<b>ADS</b>	202	193	214	210	284	361	438	528	1,5	<0,1	16,6	5,0
<b>ALS</b>	----	206	226	198	----	322	322	451	----	0,1	<0,1	2,59
<b>R41</b>	173	179	113	129	245	283	348	322	0,1	<0,1	<0,1	1,5

**Tabla 7: Valores medios de parámetros de calidad del agua sobrenadante los bioensayo con sedimento completo del grupo B de muestras (Río Luján), correspondientes al tiempo final (Día 10) de ensayo.**

Sitio	pH				OD (mg.L <sup>-1</sup> )				Conductividad (ms.cm <sup>-1</sup> )			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
ADS	8,0	7,5	----	8,0	5,7	5,8	6,4	6,5	1,07	1,14	1,21	1,27
ALS	7,5	8,0	8,0	8,0	5,0	5,7	6,3	6,6	1,17	1,28	1,21	1,30
R41	7,5	7,5	8,0	7,5	5,1	4,6	4,7	5,1	0,86	1,05	1,14	1,16
PABL	8,0	8,0	8,0	8,0	4,0	3,7	3,7	3,6	1,40	1,44	1,25	1,21
PO	7,5	7,5	8,0	8,5	3,8	4,0	3,8	3,7	1,88	1,24	1,28	1,32
PG	7,0	7,5	7,5	8,0	4,1	3,9	4,0	3,7	1,83	2,51	2,27	2,29
TJ	8,0	8,0	8,0	8,0	5,4	5,5	5,1	4,9	1,28	1,18	1,09	1,35
ALD	8,0	8,0	----	----	4,8	4,9	4,5	4,1	3,03	3,11	4,75	5,58
R8P	7,5	7,0	7,5	8,0	4,1	3,9	3,8	3,9	1,47	1,12	1,07	1,06
RP	8,0	8,0	8,0	8,0	4,7	3,7	3,5	3,5	1,09	1,03	1,05	0,94
AORL	7,5	7,0	8,0	8,0	5,8	6,2	6,3	6,3	0,90	1,00	1,02	0,99
R9	7,5	8,0	8,0	8,0	5,0	4,2	4,5	4,9	0,96	1,08	1,10	1,20
CP	7,5	8,0	8,0	8,0	5,6	5,0	5,2	4,8	0,93	0,97	0,98	1,06
R6	7,5	7,5	8,0	8,0	4,9	4,7	4,3	4,0	1,02	1,03	1,11	1,15
ALA	7,5	7,5	8,0	8,0	4,9	4,7	4,3	4,0	0,85	0,80	0,95	0,97

Sitio	Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )				Alcalinidad (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )				Amonio (mg.L <sup>-1</sup> N-NH <sup>4</sup> )			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
ADS	202	169	178	166	297	335	387	426	2,3	<0,1	3,8	3,8
ALS	258	202	182	165	284	297	288	322	3,9	3,8	3,9	0,32
R41	234	198	178	149	297	297	297	310	4,5	4,5	6,0	4,7

