

Respuestas comportamentales de *Hyaella curvispina* Shoemaker,
1942 (Crustacea, Amphipoda) como herramientas para la
detección de toxicidad de sedimentos

María Elena Bouvier Machado

3 de mayo de 2013



**Respuestas comportamentales de *Hyaella curvispina*
Shoemaker, 1942 (Crustacea, Amphipoda) como
herramientas para la detección de toxicidad de sedimentos.**

María Elena Bouvier Machado (mariaelenabouvier@gmail.com)

Director de la Tesis: Dr. Pablo Muniz (pmmaciel@fcien.edu.uy)

Resumen

Los sedimentos son el destino final de los contaminantes que ingresan al medio acuático, comprometiendo su calidad y generando un problema relevante y complejo. Una herramienta utilizada con éxito para la detección de posibles impactos en la biota son los bioensayos de toxicidad. Los puntos finales de tipo comportamentales son señales de alarma temprana de efectos tóxicos que sin provocar la muerte de los organismos, pueden generar cambios a largo plazo en las comunidades presentes en los sitios impactados. En esta Tesis se analizó la sensibilidad de 3 respuestas comportamentales del crustáceo anfípodo *Hyalella curvispina* para evaluar la toxicidad de sedimentos: 1- generación de turbidez; 2- consumo de alimento y 3- evasión. El análisis se realizó en 3 etapas: en la primera etapa se pusieron a punto las técnicas para medir estas respuestas. En la segunda etapa se probaron dichas técnicas en sedimentos dosificados con cobre y fenantreno. En la etapa siguiente se aplicaron al análisis de sedimentos de la zona costera de Montevideo, Uruguay. Los resultados obtenidos representan el primer reporte de efectos comportamentales de *H. curvispina* en respuesta a la contaminación. El ensayo de turbidez mostró sensibilidad para detectar sedimentos contaminados con concentraciones subletales de cobre, pero no así de fenantreno. El test de alimentación permitió detectar sedimentos con elevadas concentraciones de cobre pero fue inefectivo para detectar sedimentos dosificados con fenantreno. El ensayo de evasión fue el más sensible de los tres ensayos, detectando concentraciones de cobre y fenantreno por debajo del nivel probable de efecto. Los resultados de los bioensayos con sedimentos costeros, mostraron concordancia con los niveles de contaminación química y caracterización de comunidades biológicas previamente reportados, discriminando zonas de alta y moderada contaminación. Estos resultados permiten postular a esta batería de bioensayos de comportamiento como herramienta sensible de alerta temprana para la vigilancia ambiental.

Abstract

Sediments are the ultimate fate of contaminants entering the aquatic environment, compromising their quality and generating a significant and complex problem. Toxicity bioassays of aquatic sediments are tools successfully used to detect possible impacts on biota. Behavioral endpoints are early warning signs of toxic effects without causing the death of organisms, can cause long-term changes in the communities at the impacted sites. This thesis analyzed the sensitivity of three behavioral responses of the crustacean amphipod *Hyalella curvispina* to assess the toxicity of sediments: 1 - turbidity generation, 2 - feed intake and 3 - avoidance. The analysis was performed in three stages: in the first stage techniques were developed for measuring these responses. In the second stage, these techniques were applied to sediment dosed with copper and phenanthrene. In the next stage were applied to the analysis of sediments from the coastal area of Montevideo, Uruguay. The results represent the first report of *H. curvispina* behavioral effects in response to contamination. Turbidity test showed a high sensitivity to detect contaminated sediment with sublethal concentrations of copper, but not for phenanthrene. The feeding test allowed the detection of sediment with high levels of copper but it was ineffective to detect sediment dosed with phenanthrene. The avoidance test was the most sensitive of the three tests, detecting effects on sediments with concentrations below the probable level of effect for both copper and phenanthrene. The results of bioassays with coastal sediments showed concordance with levels of chemical contamination and characterization at the previously reported biological communities, discriminating areas of high and moderate pollution. These results postulate this battery of behavioral bioassays as a sensitive early warning instrument for environmental monitoring.

Agradecimientos

Llegando al final de este intrincado proceso deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

A la ANII por la beca de Maestría y a PEDECIBA por la financiación de la pasantía en el exterior.

A los miembros del tribunal: Beatriz Brena, Gabriela Eguren y Diego Lercari, por el tiempo dedicado a la revisión y por sus valiosos aportes.

A las Hyalellas, por entregar sus vidas para la protección de otros seres vivos, ojalá que el desarrollo de los ensayos planteados en esta tesis minimice estos sacrificios.

En especial a mi orientador, Pablo, por tener la paciencia y comprensión (infinitas, ¡doy fe!) que me permitieron llegar hasta el fin en este desafío. Gracias por sentarte a pensar conmigo, por estar siempre disponible y facilitarme todo lo que estuvo a tu alcance.

Al Prof. Dr. Cesar de Castro Martins y a la Prof. Yolanda González Quintana por las determinaciones de fenantreno y cobre en sedimentos, respectivamente.

A Susana y Raúl, mis padres, por el apoyo incondicional e irrestricto en todas las direcciones que tomé en mi vida, como dice Cortázar; “las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”.

A mi hija Eliana, sol de mi vida, por darme la fuerza y la alegría para seguir hasta el final. ¡Te adoro hijita! A vos va dedicado este trabajo.

A mis hermanos: Inés, Marcel y Gastón, Clarisa y Mariela, por estar siempre en las buenas y en las malas, a mis sobrinos: Sofía, Santiago y Rodrigo, por bancarse a la tía siempre ocupada y a las recién llegadas; Amélie y Juliette que con su pureza y lección de fortaleza iluminaron nuestras vidas.

A mis amigas Lucía, Mona, Malu, compañeras de la vida, a Mariana, amiga del alma, GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS por la ayuda técnica y espiritual, las charlas, los té, los asaditos, por estar siempre para cuidarme y aguantarme la cabeza. Tengo mucha suerte de tenerlas como amigas.

A mis amigos del piso 10, Noelia, Marisa, Laura, Viviana, Camila, Nuria, Ana, Anabel, Analía, Adriana, Loreley, Caro's, Andrea, Marito, Marcel, Felo, Come, Irene, Natalia, Leticia, Alicia, gracias por el apoyo, la buena onda, por los “dragazos extra” y por compartir tantos momentos divertidos, mates, té, ricas comidas y festejos varios. En especial, a Noelia por sus aportes con la estadística y a Marisa por la ayuda con las Hyalellas!

Índice general

Resumen	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice general	1
Índice de Figuras	4
Índice de Tablas.....	5
1. Introducción y antecedentes	6
1.1. Contaminación en zonas costeras	6
1.2. El sedimento estuarino como trampa o fuente de contaminantes.....	6
1.3. Evaluación de toxicidad en sedimentos	7
1.3.1. Respuestas comportamentales como punto final en evaluaciones ecotoxicológicas.....	8
1.3.2. Especies para evaluaciones toxicológicas.....	10
1.4. Antecedentes de evaluación de la calidad de sedimentos en Uruguay	11
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo general.....	13
2.2. Objetivos específicos	13
2.3. Hipótesis y Predicciones	13
3. Material y Métodos.....	16
3.1. Área de estudio	16
3.2. Colecta, preparación y caracterización del sedimento control.....	17

3.3. Sedimentos problema.....	19
3.4. Caracterización de la sensibilidad de los organismos.....	20
3.4.1. Ensayos de toxicidad en matriz acuosa	20
3.5. Ensayos de toxicidad en matriz mixta: sedimento-agua.....	22
3.5.1. Efecto de la granulometría y la densidad de organismos en la generación de turbidez.....	22
3.5.2. Efectos del cobre y fenantreno en la generación de turbidez.....	23
3.5.3. Efectos del cobre y fenantreno en la actividad de alimentación	26
3.5.4. Efectos del sedimento de la costa de Montevideo en la generación de turbidez y la alimentación	26
3.5.5. Ensayos de evasión	26
3.6. Análisis de datos	27
4. Resultados.....	28
4.1. Caracterización del sedimento control.....	28
4.1.1. Ensayos de sobrevivencia y crecimiento con sedimento control y sedimento de la costa de Montevideo.....	28
4.2. Caracterización de la sensibilidad de los organismos.....	30
4.2.1. Ensayos de toxicidad en matriz acuosa	30
4.3. Ensayos de toxicidad en matriz mixta: sedimento-agua.....	31
4.3.1. Efecto de la granulometría y la densidad de organismos en la generación de turbidez.....	31
4.3.2. Efecto del cobre y fenantreno en la generación de turbidez	32
4.3.3. Efecto del cobre y fenantreno en la alimentación	37

4.3.4. Efecto del sedimento de la costa de Montevideo en la generación de turbidez y la alimentación	41
4.3.5. Ensayos de evasión	46
5. Discusión	48
5.1. Caracterización de la sensibilidad de los organismos en cultivo.....	48
5.3. Efecto del cobre y el fenantreno en la generación de turbidez y la alimentación	51
5.3.1 Cobre.....	52
5.3.2. Fenantreno.....	55
5.4. Efecto del sedimento de la costa de Montevideo en la generación de turbidez y la alimentación.....	56
5.5. Ensayos de evasión	58
6. Conclusiones.....	59
7-Bibliografía	61
ANEXOS.....	71
Anexo I: Condiciones de cultivo	71
Anexo II: Ensayos de sobrevivencia y crecimiento en sedimentos- Condiciones de ensayo	72
Anexo III: Ensayos de toxicidad en matriz acuosa- Condiciones de ensayo.....	73
Anexo IV: Artículo enviado a la revista Brazilian Journal of Oceanography (se encuentra en revisión).....	74

Índice de Figuras

Figura 1- Estrategia de investigación.	15
Figura 2-Ubicación de los puntos de muestreo de donde se obtuvieron las muestras de sedimento (círculos rojos) (IMM, 2011a).	20
Figura 3- Diseño experimental aplicado para evaluar el efecto de la granulometría y la densidad de los organismos en la generación de turbidez.....	23
Figura 4- Supervivencia (%) de <i>H. curvispina</i> obtenida en la exposición de 10 días al sedimento control. (n=5)	29
Figura 5- Turbidez a lo largo del tiempo para los ensayos de sedimentos con agregado de 50,100 y 500 µg Cu/g sedimento.	33
Figura 6- Supervivencia (%) de <i>H. curvispina</i> obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento con 500, 1000 y 1500 µgCu/g sedimento.	34
Figura 7- Turbidez a lo largo del tiempo (ensayo 3) para sedimentos con agregado de 500, 1000 y 1500 µgCu/g sedimento	34
Figura 8- Turbidez registrada en el tiempo=48 horas (sedimentos adicionados con cobre).....	35
Figura 9- Turbidez a lo largo del tiempo en sedimentos adicionados con fenantreno. ...	36
Figura 10- Consumo de alimento (pixeles) luego de la exposición a 50,100 y 500 µgCu/g sedimento.	38
Figura 11- Consumo de alimento (pixeles) luego de la exposición a 500, 1000 y 1500µgCu/g sedimento.	39
Figura 12- Consumo de alimento (pixeles) luego de la exposición a sedimentos con agregado de fenantreno.	40
Figura 13- Turbidez registrada en el tiempo=48 horas.	41
Figura 14- Turbidez a lo largo del tiempo, para la exposición a sedimentos provenientes de la Bahía de Montevideo.....	42
Figura 15- Supervivencia (%) de <i>H. curvispina</i> obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento proveniente de la Bahía de Montevideo.	42
Figura 16- Consumo de alimento (pixeles) luego de la exposición al sedimento de la Bahía.	43

Figura 17- Turbidez a lo largo del tiempo para la exposición a sedimentos provenientes de PY y PC.....	43
Figura 18- Supervivencia (%) de <i>H. curvispina</i> obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento proveniente de PY y PC.....	44
Figura 19- Consumo de alimento (pixeles) obtenido luego de la exposición a sedimentos provenientes de PY y PC.....	44
Figura 20- Turbidez a lo largo del tiempo, para la exposición a sedimentos provenientes de L9.....	45
Figura 21- Supervivencia promedio (%) de <i>H. curvispina</i> obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento proveniente de L9.....	45
Figura 22- Consumo de alimento (pixeles) luego de la exposición a sedimento proveniente de L9.....	46
Figura 23- Distribución de los organismos (%) a ambos lados de la pecera, para exposiciones a 50, 100 y 500 µgCu/g sedimento.....	47
Figura 24- Distribución de los organismos (%) a ambos lados de la pecera, para exposiciones a 0,5 y 1 µg fenantreno/g sedimento.	47
Figura 25- Distribución de los organismos (%) a ambos lados de la pecera, para la exposición a sedimento proveniente de la Bahía de Montevideo (B1).....	48

Índice de Tablas

Tabla 1- Niveles de contaminantes analizados a febrero de 2011 en sedimentos de la zona a 2000 m de Playa Pascual (punto de muestreo: L8) (IMM, 2011a; b) y valores umbral.....	18
Tabla 2- Detalles de los ensayos de caracterización de la sensibilidad de <i>H. curvispina</i> , en fase acuosa.....	21
Tabla 3- Ensayos realizados con adición de contaminantes cobre y fenantreno, concentraciones analizadas y valores de referencia TEL (Threshold effect level) y PEL (Probable effect level).....	24
Tabla 4- Supervivencias promedio y nivel de significancia p obtenidos en la exposición de <i>H. curvispina</i> a sedimentos de la costa de Montevideo.....	30

Tabla 5- Resultados obtenidos en los ensayos de fase acuosa.....	31
Tabla 6- Valores reportados de LC50 para el género Hyalella.....	49

1. Introducción y antecedentes

1.1. Contaminación en zonas costeras

Actualmente casi el 25% de la población mundial vive en zonas costeras, desarrollando importantes centros urbanos. La presión demográfica y las actividades económicas asociadas llevan a un deterioro de los hábitats costeros y a la sobreexplotación de los recursos naturales que en ellos se encuentran (Adger et al., 2005; FAO, 2007).

Las zonas costeras incluyen a los estuarios, que integran los ecosistemas más productivos del planeta (Odum, 1971) siendo zonas de alimentación, migración y cría de varios organismos con importancia económica y ecológica. A su vez, los estuarios presentan características fisicoquímicas únicas con gradientes de salinidad, pH, oxígeno disuelto, potencial redox y partículas en suspensión (Chapman & Wang, 2001; Chapman, 2002). Estos ambientes reciben significativas descargas antropogénicas provenientes de las ciudades e industrias. Debido al rol que estos complejos y dinámicos ambientes cumplen en la historia de vida de numerosas especies acuáticas, es necesario evaluar los efectos de la contaminación generada por las actividades humanas para implementar medidas de mitigación.

1.2. El sedimento estuarino como trampa o fuente de contaminantes

La mayoría de los contaminantes descargados en los sistemas acuáticos terminan acumulándose en los sedimentos (Rand, 1995), estos últimos cumplen un importante papel en los ciclos biogeoquímicos siendo la base de la cadena trófica (Burton et al., 2001). Dado que los estuarios son sistemas someros y con una importante actividad biológica, los impactos de sedimentos contaminados en la biota acuática que habita la columna de agua y el fondo son importantes, afectando la integridad ecológica de los sistemas (Libes, 1992).

Las variaciones espaciales y temporales de la salinidad que ocurren en los estuarios provocan cambios químicos en los sedimentos. Estos cambios, inducen la precipitación o resuspensión de partículas determinando que los contaminantes adsorbidos a ellas

sean retenidos o liberados, modificando su biodisponibilidad y las rutas de exposición de los organismos (Libes, 1992; Chapman & Wang, 2001).

El proceso de decantación de partículas de los sedimentos (sedimentación) comúnmente finos de los estuarios también se ve afectado por los cambios en las condiciones del medio. Los cambios de salinidad, en el nivel del agua, o la presencia de un máximo de turbidez pueden aumentar la decantación de los contaminantes asociados a estas partículas (Chapman & Wang, 2001). Otros procesos químicos (e.g. variaciones de pH, cambios en el nivel de oxígeno disuelto), físicos (e.g. el dragado) o biológicos (e.g. la bioturbación) pueden incrementar la biodisponibilidad, causando efectos adversos en la biota (Eggleton & Thomas, 2004; Davoren et al., 2005). En un perfil en profundidad de los sedimentos acuáticos se puede encontrar, generalmente, una capa superficial oxidada de unos pocos centímetros, por encima de una capa reducida libre de oxígeno. Entre estas dos zonas se diferencia una de transición, donde los procesos oxidativos son suplantados por reducciones (Levinton, 1982). Los sedimentos una vez extraídos del ambiente, quedan expuestos a condiciones ambientales diferentes de las que estaban, por ejemplo con respecto a la concentración de oxígeno, provocando cambios en la especiación y la concentración de algunos contaminantes. La extracción de las muestras de sedimento, su almacenamiento, y las condiciones redox en que se realizan los ensayos han sido señalados como factores de confusión en el análisis de la toxicidad de sedimentos (Luoma & Ho, 1993). Reducir el tiempo de almacenamiento previo a los análisis e implementar ensayos sensibles y de corta duración son factores clave para mejorar la detección de zonas impactadas y proceder con rapidez a tomar medidas de mitigación por parte de las agencias de control.

1.3. Evaluación de toxicidad en sedimentos

Los test de toxicidad de sedimentos son una herramienta fundamental para realizar evaluaciones rápidas de muestras ambientales y detectar zonas impactadas, permitiendo estimar los riesgos para la biota (Luoma & Ho, 1993; Ingersoll, 1995; Kaschl & Carballeira, 1999; Pascoe et al., 2000). Generalmente las pruebas consisten en la exposición bajo condiciones experimentales controladas de organismos modelo, a muestras de sedimento o agua intersticial. Luego de finalizado el tiempo de exposición, se procede a cuantificar la variable respuesta (punto final o efecto) de dicha exposición en los organismos (Rand et al., 1995; Castillo Morales, 2004).

Los test de toxicidad se pueden clasificar según el tiempo de la exposición en: agudos (tiempo de exposición menor al 10 % del ciclo de vida del organismo) o crónicos (que abarca el ciclo entero o parte significativa del ciclo de vida del organismo). A su vez, pueden clasificarse en letales y subletales según el efecto medido en los organismos. Los efectos subletales incluyen respuestas de tipo: comportamentales (nado, alimentación, atracción/evasión e interacciones predador/presa), fisiológicas (crecimiento y reproducción), bioquímicas (enzimas, niveles iónicos) e histológicas (Rand et al., 1995). Los test de toxicidad cuyo punto final es una respuesta subletal, permiten detectar efectos en la biota a bajas concentraciones de contaminantes, efectos que sin ser letales en el corto plazo pueden llevar a cambios ecológicos que afectarán a largo plazo la capacidad de sobrevivencia de los organismos. Son útiles en el análisis de zonas con polución moderada a leve (Briggs et al., 2003; Allen et al., 2006).

1.3.1. Respuestas comportamentales como punto final en evaluaciones ecotoxicológicas

En los últimos años ha tomado gran impulso el desarrollo de la ecotoxicología comportamental, rama de la ecotoxicología que estudia los cambios en el comportamiento de los organismos debido a la exposición a contaminantes. Las respuestas comportamentales son señales sensibles e integrativas de respuestas bioquímicas que tienen efectos a nivel poblacional y de las comunidades (Anderson et al., 2004; Gerhardt, 2007; Amiard-Triquet, 2009; Hellou, 2011). Los efectos de los tóxicos en el comportamiento se basan en mecanismos bioquímicos que provocan reacciones compensatorias o respuestas adaptativas reversibles o irreversibles (Gerhardt, 2007). El comportamiento frente a la exposición a contaminantes es una respuesta abarcativa, producto de procesos fisiológicos y del nivel de desarrollo del organismo. Para la comprensión de los efectos de los contaminantes en la biota es necesario entonces contar con un enfoque de evaluación a múltiples niveles, que permita relacionar las respuestas comportamentales con otras respuestas a nivel suborganísmico y poblacional (Zala & Penn, 2004; Gerhardt, 2007; Hellou, 2011).

Actividades como la construcción de túneles y su ventilación, el nado y la alimentación de los organismos bentónicos, producen removilización de las sustancias químicas presentes en el sedimento y resuspensión de partículas hacia la columna de agua (Rand et al., 1995). Los puntos finales comportamentales en anfípodos han mostrado ser útiles

indicadores de exposición a contaminantes. Se ha comprobado que el cadmio en concentraciones subletales provoca una disminución en la actividad de nado de anfípodos *Gammarus aequicauda* (Morillo et al., 2011). La exposición a concentraciones ambientales muy bajas del piretroide cipermetrina provoca cambios en el comportamiento locomotor del anfípodo *Gammarus pulex*. Estos consisten en aumento en la velocidad, la distancia, en el movimiento y en la proporción de tiempo que pasan nadando, lo cual estaría relacionado a un comportamiento de evasión de la zona contaminada. (Norum et al., 2011).

La respuesta de generación de turbidez como punto subletal de evaluación de la toxicidad ha sido analizada en estudios con organismos de diferentes taxa. Bartsch et al. (1999) analizaron la turbidez generada por ninfas de la efímera *Hexagenia bilineata* expuestas al cadmio. Asimismo, Briggs et al. (2003) en ensayo de turbidez de 10 días de duración con el anfípodo *Corophium volutator*, encontraron que respuestas comportamentales frente a la exposición a sedimentos contaminados con cobre e hidrocarburos provocan aumento de la turbidez a bajas concentraciones y disminución a concentraciones altas. Cho (2005) en ensayo de toxicidad de sedimentos con larvas de *Chironomus tentans* reportó disminución de la turbidez frente a la exposición con cobre y fluoranteno (Cho, 2005).

La actividad alimentaria como punto final en test de toxicidad ha sido utilizada en estudios realizados con cladóceros, anfípodos y nematodos, entre otros (Bitton et al., 1996; Anderson et al., 2004; Alonso et al., 2009; Bundschuh et al., 2011). Se ha reportado la inhibición de la actividad alimentaria de *Ceriodaphnia dubia* luego de la exposición a metales (Bitton et al., 2006). A su vez, Anderson et al. (2004) detectaron efectos en el comportamiento locomotor y alimentación del nematodo *Caenorhabditis elegans*, en exposiciones de tan solo cuatro horas, para compuestos con efecto neurotóxico, mientras que para los compuestos cuyo efecto probable no es neurotóxico (por ejemplo el cobre), las respuestas se comienzan a detectar a partir de las 24 horas de exposición.

La respuesta de tipo evasión a sedimentos contaminados se considera una señal temprana de afectación de los organismos. Este tipo de efecto ha sido analizado desarrollando diferentes sistemas de exposición, en variados grupos taxonómicos (Oakden et al., 1984; Hansen et al., 1999; Kravitz et al., 1999; Eriksson et al., 2006;

Amorim et al., 2008; Dornfeld et al., 2009; Sardo & Soares, 2010; Hellou, 2008; 2011). Anfípodos (*Rhepoxynius* spp) que fueron expuestos durante 72 horas a sedimentos contaminados con efluentes domésticos, o metales (cadmio y zinc) evitaron activamente enterrarse en los sedimentos con agregado de efluentes domésticos, y los que sobrevivieron a la exposición con metales, se ubicaron en el sedimento control (Oakden et al., 1984). Eriksson et al. (2006) desarrolló un ensayo de evasión con anfípodos del género *Monoporeia* en sedimentos contaminados con el compuesto antifouling zinc piritona, encontrando que los organismos evitaron el sedimento contaminado a concentraciones no agudas. En sedimento contaminado con HAP (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos), Kravitz et al. (1999) reportaron evasión del anfípodo *Eohaustorius estuarius*, tanto al sedimento altamente contaminado con HAP como al de moderada contaminación.

1.3.2. Especies para evaluaciones toxicológicas

Los organismos deben cumplir con algunos requisitos que son fundamentales para el éxito de la evaluación toxicológica: i) alta sensibilidad frente a los contaminantes, ii) máxima sensibilidad en el estadio de vida a testear, iii) hábito de vida en estrecho contacto con el sedimento (incluyendo hábito alimenticio), iv) máxima relevancia ecológica, v) facilidad de cultivo en condiciones de laboratorio, vi) fácil identificación, vii) amplia distribución geográfica, viii) que sea indígena al sitio a ser evaluado, o que tenga un nicho similar a los organismos afectados, ix) amplia tolerancia a diferentes composiciones granulométricas (Ingersoll, 1995; USEPA, 2000). Los invertebrados bentónicos, por estar en íntimo contacto con el sedimento, ya sea por vivir en su superficie, enterrados, o por ingerir partículas, se postulan como los organismos más adecuados para analizar los efectos de los contaminantes del sedimento en la biota acuática, mediante test de toxicidad (Reynoldson & Day, 1993). Dentro de ellos, los crustáceos se presentan como buenos candidatos para estos fines. Los peracáridos abarcan el 40% de las especies reportadas de crustáceos y se caracterizan por la presencia en las hembras de un saco ventral incubatorio o marsupio donde se desarrollan las crías, que al ser liberadas del marsupio presentan casi todas las características de los adultos. Incluyen organismos de los órdenes: Amphipoda, Cumacea, Isopoda y Tanaidacea, entre otros (Barnes, 1989). Los anfípodos son organismos extremadamente comunes en los sistemas acuáticos de nuestro país (Graça

et al., 2002); en particular, la especie *Hyaella curvispina* se destaca por su importancia ecológica y gran abundancia.

Hyaella curvispina Shoemaker, 1942 (Crustacea: Amphipoda) es un anfípodo muy abundante en cuerpos de agua de Argentina, Uruguay y Brasil (Graça et al., 2002; Gonzalez, 2003; Jergentz et al., 2004). Organismos de esta especie se pueden encontrar asociados a sustratos duros, vegetación vascular acuática y algas, así como al bentos de arroyos (Poi de Neiff & Carignan, 1997; Casset et al., 2001; Poretti et al., 2003). Tienen gran importancia en la trama trófica de ecosistemas acuáticos, siendo alimento para otros invertebrados y peces (Giorgi & Tiraboschi, 1999; Casset et al., 2001). Cumplen un rol importante en la circulación de la materia, debido a su pastoreo sobre algas epífitas, fitobentos, tejido vegetal e ingestión de sedimentos y detritos (Giorgi & Tiraboschi, 1999; Saigo et al., 2009).

En particular, *H. curvispina* ha sido utilizada en estudios de laboratorio, para evaluar la toxicidad de lodos y sedimentos así como también en estudios *in situ* con organismos confinados en limnocorrales ubicados en el fondo de arroyos, mostrando que es sensible a la polución (Di Marzio et al., 1999, 2006, 2010; Graça et al., 2002; Jergentz et al., 2004; Venturino et al., 2007; Giusto & Ferrari, 2008; García et al., 2010; Peluso, 2011; Peluso et al., 2011; García et al., 2012; Giusto et al., 2012; Bouvier et al., enviado). El cultivo de individuos de la especie *H. curvispina* ha sido protocolizado (Somma et al., 2011). El rango de tolerancia a la salinidad de *H. curvispina* no ha sido determinado y es uno de los productos de este trabajo. Se ha reportado su presencia en aguas del Río de la Plata medio y exterior, en valores de salinidades variando de 0,6 a 17 (FREPLATA, 2001). Otra especie congénere, nativa de América Central y América del Norte, *Hyaella azteca*, se ha utilizado ampliamente como organismo estándar para evaluar la contaminación de aguas y sedimentos estuarinos (Chapman & Wang, 2001) existiendo protocolos internacionales donde se proporcionan pautas para su cría y realización de ensayos de toxicidad (EPS 1/RM/33 (1997) y USEPA 600/R-99/064 (2000)).

1.4. Antecedentes de evaluación de la calidad de sedimentos en Uruguay

A nivel nacional se han realizado estudios ecotoxicológicos de sedimentos del Río Negro y del Río Uruguay (Míguez et al. 2010; 2011).

La zona costera del departamento de Montevideo está ubicada en el sistema marino-fluvial del Río de la Plata. Recibe el impacto de aproximadamente la mitad de la población del Uruguay, por lo que su calidad ambiental es de gran preocupación. Numerosos trabajos han analizado el estado de salud ambiental de esta zona combinando componentes ecosistémicos como la composición de la comunidad bentónica y la materia orgánica sedimentaria, índices de contaminación, concentraciones de contaminantes, parámetros fisicoquímicos y técnicas paleoambientales (ver entre otros: Danulat et al., 2000; Muniz et al., 2000; 2002; 2004; 2006; 2011; Venturini et al., 2004; 2012; FREPLATA, 2004; García-Rodríguez, 2010). Estudios previos (Moyano et al., 1993; Moresco & Dol, 1996; Danulat et al., 2000; Muniz et al., 2002; 2004; 2011; Venturini et al., 2004) han reportado en sedimentos de la costa de Montevideo la presencia de concentraciones de cobre e HAP (entre ellos, el fenantreno) que exceden los valores tolerables para la conservación de la biota. A pesar de que no existen en Uruguay niveles guía de calidad de sedimentos (NGCS), a nivel mundial se han desarrollado diferentes NGCS para la evaluación de la peligrosidad de los sedimentos. Una guía de calidad de sedimentos comúnmente aplicada en Uruguay (IMM, 2011) es la establecida por la agencia ambiental canadiense, Environment Canada (Canadian Council of Ministers of the Environment, CCME, 1999). Ésta propone dos tipos de valores orientadores límites para las sustancias tóxicas, un valor umbral de efecto, por debajo del cual los efectos biológicos adversos raramente ocurren (ISQG o TEL- Threshold effect level) y otro por encima del cual efectos severos son observados frecuentemente en la biota (PEL- Probable effect level). Estos valores definen tres rangos de concentraciones químicas: un rango de efectos mínimos en el cual los efectos adversos se dan en menos del 25 % de los casos, un segundo rango entre el TEL y el PEL, en que los efectos adversos ocurren ocasionalmente, y un tercer rango por encima del PEL en que los efectos adversos ocurren en más del 50 % de los casos (CCME, 1999). Una aproximación a la generación de nuevos umbrales de calidad de sedimentos para la zona costera de Montevideo se puede encontrar en Hutton (2011).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar una metodología de evaluación de la toxicidad de sedimentos estuarinos basada en respuestas comportamentales de *Hyaella curvispina* para ser aplicada en sedimentos de la costa uruguaya.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Diseñar ensayos basados en respuestas comportamentales (generación de turbidez, consumo de alimento y evasión) para detectar respuestas subletales a la contaminación.
- 2- Ensayar la sensibilidad de las pruebas diseñadas mediante sedimentos contaminados artificialmente con cobre y fenantreno
- 3- Aplicar las técnicas desarrolladas a sedimentos de la zona costera de Montevideo.

2.3. Hipótesis y Predicciones

Hipótesis 1) Los organismos de la especie *Hyaella curvispina* son bioturbadores del sedimento por lo que su actividad genera turbidez y ésta puede ser detectada mediante un turbidímetro casero.

Predicción 1) La turbidez del agua en sedimentos con *Hyaella curvispina* será mayor que la turbidez del agua en los recipientes sin organismos.

Hipótesis 2) La exposición de *Hyaella curvispina* a sedimentos contaminados con niveles por encima del TEL de cobre, fenantreno o provenientes de la costa de Montevideo producirá alteraciones fisiológicas que inducirán cambios en los niveles de actividad corporal.

Predicción 2) En comparación con la exposición a sedimentos no contaminados, la turbidez del agua y el consumo de alimento serán mayores en sedimentos moderadamente contaminados y menores en sedimentos de alta contaminación.

Hipótesis 3) Los organismos expuestos a sedimentos contaminados (con niveles por encima del TEL de cobre, fenantreno o provenientes de la costa de Montevideo) cuentan con mecanismos que les permiten detectar dicha contaminación y evitarla.

Predicción 3) Cuando los organismos tienen la posibilidad de seleccionar entre un sedimento contaminado y un sedimento control, elegirán el sedimento control.

Para contrastar las hipótesis planteadas y cumplir con los objetivos propuestos en esta tesis se realizaron una serie de actividades de acuerdo al esquema general presentado en la **Figura 1**.

ENSAYOS EN FASE ACUOSA

ENSAYOS EN FASE MIXTA (sedimento-agua)

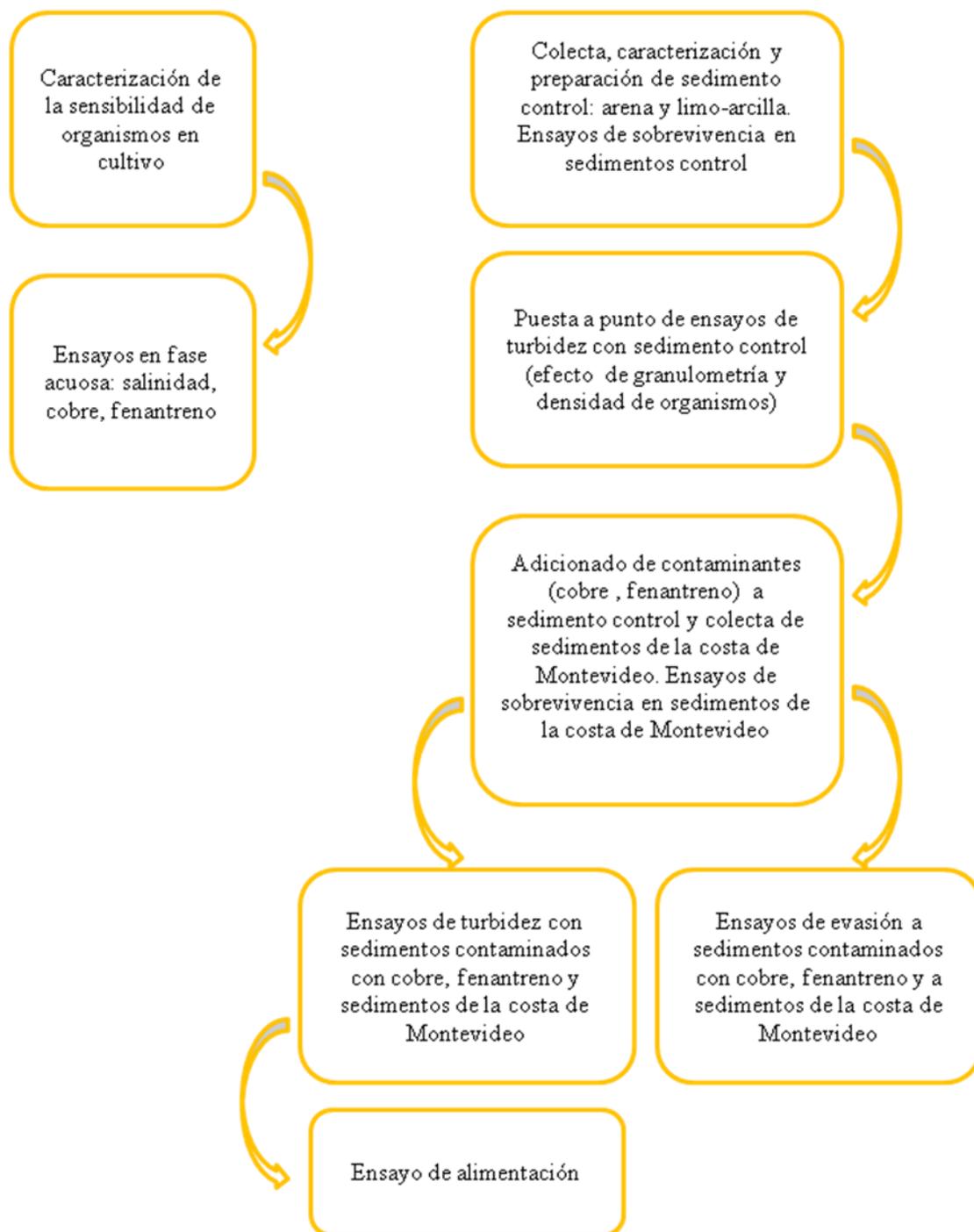


Figura 1- Estrategia de investigación.

Se detallan las actividades realizadas para alcanzar los objetivos planteados.

3. Material y Métodos

Para la realización de los ensayos de toxicidad se mantiene un stock de organismos en el laboratorio, bajo condiciones controladas. Las condiciones de cultivo se detallan en el Anexo I.

3.1. Área de estudio

En el marco del plan de saneamiento urbano IV (PSU IV) se realiza el “Programa de monitoreo de calidad de agua y biota del Río de la Plata”, por el cual la zona costera de Montevideo es monitoreada por la Intendencia Departamental en conjunto con la Sección Oceanografía y Ecología Marina de la Facultad de Ciencias, generando datos sobre calidad del agua y sedimentos, características físico-químicas, estado trófico, contenido en contaminantes y diversidad biológica desde el año 2008 (Centurión, 2011; Hutton, 2011; IMM, 2011a; b; Muniz et al., 2011; Venturini et al., 2012). La tendencia que se ha detectado es que la Bahía de Montevideo es un punto importante de entrada de contaminación, encontrándose un deterioro progresivo de la zona costera adyacente, sumado a que al este se encuentra el emisario subacuático de descarga de los desechos de la ciudad de Montevideo.

Hutton (2011) encontró que el conjunto de variables y atributos ecológicos más importantes como estructuradores del ambiente en la zona costera de Montevideo son los componentes de la materia orgánica (en particular los lípidos y proteínas), el índice ecológico AMBI y las concentraciones de metales: Pb, Cu, Cr y Zn.

Del análisis de la bibliografía existente sobre el estado ecológico de los sedimentos de la zona costera de Montevideo, se seleccionaron los puntos de muestreo (**Fig. 2**) para aplicar los ensayos comportamentales.

La Bahía de Montevideo recibe la descarga de los arroyos Pantanoso, Miguelete y Seco, y alberga el principal puerto del país, la refinería ANCAP y la central hidroeléctrica Batlle. En esta zona, los puntos de muestreo B1 y B2 (zona interna) se clasifican como eutróficos a hipereutróficos debido a la alta carga de proteínas y lípidos encontrada, con metales (plomo, cromo y zinc) por encima del valor PEL y mayores al TEL (cobre y cadmio), con el cobre siendo mayor al PEL en la estación B2 (Hutton, 2011). El alto contenido de lípidos evidencia contaminación por hidrocarburos derivados de petróleo.

Desde el punto de vista biológico, presentan elevado porcentaje de anomalías y descalcificación de caparazones de foraminíferos, predominando las especies tolerantes a altos niveles de contaminación como *Ammonia tepida* (Centurión, 2011). El macrobentos está dominado por la especie *Heleobia cf. australis*, aunque en algunos períodos presenta condiciones azoicas. La diversidad en esta zona presentó los valores más bajos de toda la zona costera metropolitana y la salud de la comunidad bentónica según el índice AMBI es contaminada, siendo su estado ecológico pobre (Hutton, 2011; Muniz et al., 2011; Venturini et al., 2012).

Desde el punto de vista de los índices bióticos, la zona este de la costa de Montevideo (incluyendo los puntos de muestreo PC y L9) fue clasificada como contaminada a moderadamente contaminada mientras que la zona oeste (incluyendo el punto de muestreo PY) como moderadamente contaminada (Hutton, 2011; Muniz et al., 2011; Venturini et al., 2012). En las muestras de PC se ha detectado un contenido de plomo y cobre por encima del TEL (IMM, 2011a; Hutton, 2011) y contaminación por derivados del petróleo (Muniz et al., 2002). El contenido de plomo y cromo determinado en los últimos dos años en las muestras L9 y PY estuvo por debajo del TEL (IMM, 2011a). El cobre detectado en PY supera el valor de TEL (Hutton, 2011).

Estudios previos (IMM, 2011a; b; Muniz et al., 2011) mostraron que el sedimento de la zona a 2000 m de Playa Pascual puede ser utilizado como sedimento de referencia en este trabajo, por su baja contaminación, su similitud en granulometría, contenido de materia orgánica y cercanía al sitio de las muestras problema. Dicha zona presenta niveles de contaminantes por debajo del umbral de efecto, como se muestra en la **Tabla 1**.

3.2. Colecta, preparación y caracterización del sedimento control

Los sedimentos finos se colectaron con draga van Veen en un punto de la zona costera de Montevideo (Playa Pascual), a 2000 m de la costa (**Tabla 1**, L8). En el laboratorio, se tamizó por vía húmeda reteniendo el sedimento menor a 63 μ m (limo-arcilla). Se evaporó el agua en estufa a temperatura menor a 40°C, obteniendo sedimento seco de tamaño de grano menor a 63 μ m.

La arena fue colectada en la playa La Calavera, en Cabo Polonio, Rocha. Luego de colectada, se tamizó por la serie de tamices 500 μ m, 250 μ m y 63 μ m, por vía húmeda.

Se seleccionó la fracción que pasa el tamiz de 250 μm y queda retenida en el tamiz de 63 μm (arena fina a muy fina). Posteriormente, esta fracción se lavó con agua destilada tres veces, para remover las sales que pudiera contener. A continuación se ubicó en bandejas para su secado a temperatura ambiente.

Tabla 1. Niveles de contaminantes analizados a febrero de 2011 en sedimentos de la zona a 2000 m de Playa Pascual (punto de muestreo: L8) (IMM, 2011a; b) y valores umbral.

Contaminante analizado	Concentración	Valor umbral/Referencia
Cromo (mg/kg)	<10	52,3 / CCME, 1999 37,2/ Hutton, 2011
Plomo (mg/kg)	<20	30,2 / CCME, 1999 22,3/ Hutton, 2011
HAT (Hidrocarburos alifáticos totales) ($\mu\text{g/g}$)	8,50	50 / NRC, 1985
UCM (mezcla compleja no resuelta) ($\mu\text{g/g}$)	6,20	
UCM/HAT	0,73	UCM/HAT<4/ Readman et al., 2002
HAP(Hidrocarburos aromáticos policíclicos) (ng/g)	384	1684 / CCME, 1999
Coprostanol ($\mu\text{g/g}$)	0,035	<0,10 / Writer et al., 1995
LABs (Alquilbencenos lineales) (ng/g)	32,9	<12800 / NOAA, 1999
AMBI (AZTI's Marine Biotic Index)	2	Corresponde a: Salud de la comunidad bentónica: desbalanceado Estado del sitio: apenas perturbado Estado ecológico: bueno (Borja et al., 2003)

El sedimento control utilizado en la puesta a punto del ensayo de turbidez se compuso mezclando diferentes proporciones de sedimento menor a 63 μm y sedimento mayor a 250 μm y mayor a 63 μm . Se pesaron las cantidades necesarias en balanza Sartorius de apreciación 0,01g de modo de obtener las siguientes composiciones granulométricas:

100% arena

75% arena + 25% limo-arcilla

50% arena + 50% limo-arcilla

25% arena + 75% limo-arcilla

100% limo-arcilla.

El contenido en limo y arcilla del sedimento menor a $63\mu\text{m}$ fue determinado por Análisis de pipeteado, según el método estándar de Suguio (1973). El contenido de materia orgánica del sedimento menor a $63\mu\text{m}$ fue determinado por incineración, siguiendo el método de Byers et al. (1978) 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. Dependiendo de su estructura laminar las arcillas tienen diferente número de sitios cargados negativamente en su superficie, compensando esas cargas con cationes externos. Ése mecanismo es referido como capacidad de intercambio catiónico (CIC). La materia orgánica presente en los sedimentos también contribuye a dicha capacidad. La CIC del sedimento de fracción limo-arcilla se determinó por el método establecido en Cocka & Birand (1993).

La sobrevivencia y el crecimiento (10 días) en sedimentos control (100% limo-arcilla y 100% arena) se probaron de acuerdo al método especificado en EPS 1/RM/33 (1997) y USEPA 600/R-99/064 (2000). Las condiciones de ensayo se detallan en el Anexo II.

3.3. Sedimentos problema

En agosto de 2011 se tomaron muestras de sedimento superficial con draga van Veen en cinco puntos de la costa de Montevideo (**Fig. 2**) (B1, B2, L9, PC y PY). Estos puntos de muestreo se seleccionaron en base a los estudios previos mencionados abarcando un gradiente de contaminación que incluye sitios muy afectados (Bahía de Montevideo, zona interna: B1 y B2) a sitios de moderada contaminación (desembocadura del Arroyo Carrasco: L9, descarga central del Emisario de Punta Carretas: PC, descarga central del proyectado Emisario de Punta Yeguas: PY). Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta la llegada al laboratorio donde se almacenaron a temperatura menor a 10°C hasta su análisis. La sobrevivencia y el crecimiento (10 días) en los sedimentos de la costa de Montevideo (B1, B2, L9, PC y PY) se analizaron de acuerdo al método especificado en EPS 1/RM/33 (1997) y USEPA 600/R-99/064 (2000). Las condiciones de ensayo se detallan en el Anexo II.

Los ensayos se realizaron según lo indicado para testear sustancias de referencia en EPS 1/RM/33 (1997) y USEPA 600/R-99/064 (2000), adaptado para el anfípodo *Hyalella curvispina*. Las condiciones generales de ensayo se detallan en el Anexo III.

Los tóxicos seleccionados para esta etapa de caracterización fueron: cobre (a partir de sulfato de cobre pentahidratado, ppa. Merck) y fenantreno (Merck, para síntesis). La tolerancia de *H. curvispina* a la salinidad fue analizada por exposición a 5 salinidades diferentes, preparando las soluciones a testear por dilución de sal marina comercial (Tropic Marine).

En la **Tabla 2** se describen el número de ensayos realizados, la edad de los organismos testeados y las concentraciones utilizadas en cada ensayo en particular. Asimismo se detallan los ensayos en que se analizó el crecimiento de los organismos al finalizar la exposición y aquellos en que se realizó el test de alimentación.

Tabla 2- Detalles de los ensayos de caracterización de la sensibilidad de *H. curvispina*, en fase acuosa.

N° Ensayo- Tóxico aplicado	Intervalo de concentraciones	Anfípodos		Tiempo de exposición	Crecimiento	Test de Alimentación
		Longitud inicial (mm)	Edad (días)			
1-Salinidad	Control=0,4-3,6- 10,3-17,2-24,7- 34,7.	3,7 (0,7)	6-24	96 h y 10 días	SI	NA
2-Salinidad	Control=0,4-3,6- 10,5-16,9-23,9- 34,2.	NA	2-9	96 h y 10 días	NA	NA
3-Salinidad	Control=0,4-3,6- 10,4-16,9-24,1- 33,8.	NA	7-14	96 h y 10 días	NA	NA
4-Cobre	Control-60-120- 240-480-960µg/l	NA	4-12	96 h	NA	NA
5-Cobre	Control-60-120- 240-480µg/l	NA	7-10	96 h	NA	NA
6-Cobre	Control-60-120- 240-480-960µg/l	NA	1-10	96 h	NA	NA
7-Cobre	Control-30-60- 120-240µg/l	NA	16-27	96 h y 10 días	NA	NA
8- Fenantreno	Control-50-100- 200µg/l	3,6(0,6)	11-24	96 h y 10 días	SI	SI

NA = no analizado. Valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar de las medidas.

3.5. Ensayos de toxicidad en matriz mixta: sedimento-agua

3.5.1. Efecto de la granulometría y la densidad de organismos en la generación de turbidez

La turbidez se midió mediante un instrumento basado en un prisma rectangular sin base construido en madera, forrado de papel negro, el cual tiene dos orificios en lados opuestos, donde se montó una lámpara (Radium RJLS 2012 SP, 12V, 20W, 10 °, temperatura de color 3000 K), y un fotoresistor (CdS Photoconductive cells GL5549). El fotoresistor se conectó a una placa AVR (AVR Butterfly board- Atmel Corporation) que midió la cantidad de luz resultante (como mV) luego de pasar por la muestra. Para determinar el desempeño del equipo se analizaron 2 curvas de calibración con el estándar de turbidez Formacina en los siguientes rangos: 0-40 FAU y 0-200 FAU (por sus siglas en inglés, Unidades de Atenuación de la Formacina). Detalles del diseño del instrumento y sus características se encuentran en el Anexo IV.

En la **Figura 3** se puede ver el diseño experimental aplicado en la puesta a punto del ensayo de turbidez. Se utilizaron frascos de vidrio de 300 ml de capacidad. Se colocó el sedimento a analizar más 270 ml de medio de cultivo. Se dejó decantar la mezcla a temperatura ambiente 24 horas. A continuación se colocaron en baño a temperatura controlada (20°C +/-2) y se inició la aireación. El día siguiente se registró la turbidez de cada frasco (tiempo=0) mediante el turbidímetro (ver detalles en el Anexo I) y a continuación se colocaron 0, 10, 15 o 20 organismos por frasco, por quintuplicado, dando inicio al test. Se utilizaron juveniles de *Hyalella curvispina* de edad entre 15 y 30 días, ya que en experimentos previos se determinó que esta edad era la mínima posible para obtener una respuesta de generación de turbidez por parte de los organismos. Se registró la turbidez generada en cada frasco a las 3, 8, 24, 32 y 48 horas de haber agregado los organismos.

Luego de la lectura a las 48 horas de ensayo, se determinaron los Sólidos Suspendedos Totales (SST) de cada frasco para chequear su relación con la turbidez. Para esto se tomó una alícuota de 50 ml del agua sobrenadante y se filtró mediante papel de filtro Whatmann de 0,45 mm pesado previamente. Se secó cada filtro con los sólidos retenidos en estufa a 100 °C y se registró el peso luego de 24 horas de secado.

Se registró la cantidad de organismos vivos en cada frasco.

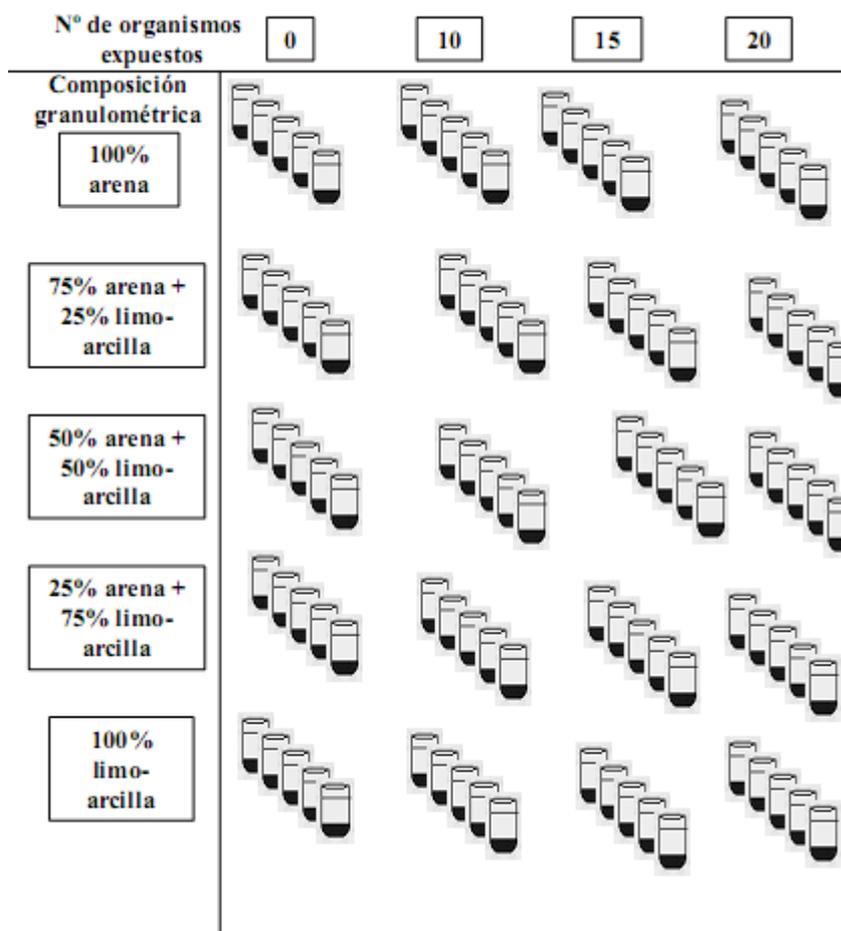


Figura 3- Diseño experimental aplicado para evaluar el efecto de la granulometría y la densidad de los organismos en la generación de turbidez.

Para cada composición granulométrica se expusieron 10, 15 y 20 organismos/ frasco (n=5). El control fue sedimento y medio de cultivo, sin organismos.

3.5.2. Efectos del cobre y fenantreno en la generación de turbidez

En esta etapa se utilizó sedimento control compuesto por 100% limo-arcilla, y 20 organismos/frasco. La respuesta de turbidez generada por 20 organismos en sedimento 100% limo-arcilla fue la mayor obtenida en la etapa previa de puesta a punto del ensayo (3.5.1). Los contaminantes agregados fueron: cobre (sulfato de cobre pentahidratado, ppa., Merck) y fenantreno (Merck, para síntesis). El procedimiento de agregado de contaminantes se realizó según los lineamientos establecidos en la norma ASTM E 1391-03. Para todas las exposiciones se realizaron entre 3 y 5 réplicas por tratamiento. Para el cobre se agregó la cantidad necesaria de solución de modo de obtener las siguientes concentraciones nominales en el sedimento: 50, 100 y 500 $\mu\text{g Cu/g}$

sedimento seco (ensayos 1 y 2 – Cu) y 500, 1000 y 1500 µg Cu/g sedimento seco (ensayo 3- Cu) (ver **Tabla 2**).

Para el fenantreno, se preparó una solución stock disolviendo los gramos necesarios del reactivo en acetona ppa y a partir de ésta se prepararon las soluciones de las concentraciones deseadas diluyendo la solución stock con agua destilada. Las concentraciones de fenantreno ensayadas fueron: 0,04, 0,08 y 1 µg fenantreno/g sedimento seco (ensayo 1- fenantreno) y 0,515, 1,03 y 1,545 µg fenantreno/g sedimento seco (ensayo 2- fenantreno). Como control adicional, además del sedimento control con medio de cultivo, se preparó un set de frascos de sedimento control con agregado de igual volumen de acetona + medio de cultivo, pero sin fenantreno (ver **Tabla 3**). Los frascos conteniendo la mezcla de sedimento y solución de contaminante o medio de cultivo (en los frascos control), luego de ser homogenizados, fueron tapados y colocados en heladera a temperatura menor a 10°C, durante un período de estabilización de 27-30 días para el adición de sulfato de cobre y 50 días para el fenantreno. Cumplido este período, se realizó igual procedimiento al descrito en 3.5.1, agregando 20 organismos/frasco, registrando la turbidez a los tiempos determinados y la sobrevivencia de los organismos luego de 48 horas de exposición.

Tabla 3- Ensayos realizados con adición de contaminantes cobre y fenantreno, concentraciones analizadas y valores de referencia TEL (Threshold effect level) y PEL (Probable effect level).

Contaminante- N° de ensayo	Concentraciones analizadas	TEL(*)	PEL(*)
Cobre			
Ensayo 1-Cu	50-100-500µg/g	18,7µg/g	108µg/g
Ensayo 2-Cu	50-100-500µg/g		
Ensayo 3-Cu	500-1000-1500µg/g		
Fenantreno			
Ensayo 1- fenantreno	0,04-0,08-1 µg/g	0,0867 µg/g	0,544 µg/g
Ensayo 2- fenantreno	0,515-1,0-1,545 µg/g		

* valores establecidos según CCME (1999).

3.5.2.1. Análisis químico de los sedimentos adicionados con cobre y fenantreno

Para probar la eficiencia de la metodología utilizada para el adición de fenantreno, se analizó el contenido de éste hidrocarburo en una réplica de cada concentración ensayada, al finalizar el ensayo n°2 con fenantreno. Los análisis se realizaron en el Centro de Estudios do Mar, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Sur, Paraná, Brasil. El sedimento se conservó congelado (-15°C) en contenedores de aluminio hasta su análisis. Luego de secado a 50°C hasta peso constante las muestras de sedimento fueron extraídas con Soxhlet durante 8 horas con una mezcla de n-hexano y diclorometano, según UNEP (1991). Los extractos fueron concentrados mediante rotavapor, desulfurados con cobre activado y fraccionados por cromatografía de gel de sílice-aluminio en hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Los hidrocarburos aromáticos fueron determinados por inyección del extracto concentrado en un equipo FISIONS Trio 1000 GC/MS, con el detector operado bajo el modo SIM (selected ion monitoring). La cuantificación fue realizada usando estándares internos y el protocolo analítico de aseguramiento de la calidad fue llevado a cabo bajo condiciones ambientales controladas, analizando material de referencia, blancos y participando de ejercicios de intercalibración internacionales.

Los análisis de cobre en sedimento fueron realizados en el Laboratorio de Suelos y Aguas de la Unidad de Ciencias de Epigénesis, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias (UDELAR).

Se preparó sedimento de 100% limo-arcilla al cual se agregó la cantidad necesaria de solución de sulfato de cobre a modo de obtener sedimento cuya concentración de cobre sea de 1500 µg/g. Se siguió el mismo procedimiento de homogeneizado y estabilización detallado en la sección anterior y una vez cumplido el período de estabilización se colectó el agua sobrenadante y el sedimento, los cuales fueron analizados para Cu por separado. El método de cuantificación del cobre es una modificación del método 352 EPA. El sedimento se secó a 80°C y luego se homogenizó con mortero. Para evitar la interferencia de la materia orgánica y llevar al cobre a su forma libre, se agregó ácido nítrico, en plancha caliente, en cantidad suficiente hasta dejar de evidenciar reacción. La cuantificación de cobre en el agua sobrenadante y en el sedimento se realizó mediante AAS (Perkin Elmer 3110). El control de calidad analítico incluyó el análisis de muestras de referencia y blancos de procedimiento.

3.5.3. Efectos del cobre y fenantreno en la actividad de alimentación

La actividad de alimentación se analizó cuantificando el alimento consumido (lechuga- *Lactuca sativa*). Luego de finalizada la exposición a la solución o sedimento problema, se retiraron los organismos, registrando el número de vivos. Los organismos que sobrevivieron se colocaron en frascos limpios conteniendo 250 ml de medio de cultivo y un disco de lechuga de aproximadamente 1 cm de diámetro/frasco. Cada disco de lechuga fue fotografiado al inicio y al finalizar (24 hs) el test de alimentación. Las imágenes fueron analizadas mediante el programa UTHSCSA Image Tool y se calculó el área de alimento consumido por organismo y por tratamiento, en píxeles.

3.5.4. Efectos del sedimento de la costa de Montevideo en la generación de turbidez y la alimentación

La granulometría del sedimento control utilizado para cada ensayo fue preparada de acuerdo a la estimada en cada punto de muestreo, basándose en datos previos. El procedimiento de ensayo fue el mismo descrito para los ensayos de turbidez con sedimento control (3.5.2). El número de réplicas fue 4 o 5. Se realizó el test de alimentación luego de la exposición a las muestras problema, según lo descrito en la sección anterior (3.5.3).

3.5.5. Ensayos de evasión

En los ensayos de evasión, se proporciona a los organismos la posibilidad de seleccionar donde ubicarse, entre sedimento control o un sedimento contaminado (sedimento problema).

El protocolo adoptado para este ensayo es una modificación de la metodología de Kravitz et al. (1999) y Oakden (1984). Las unidades experimentales fueron peceras de vidrio de 20 cm de largo y 10 cm de ancho por 20 cm de altura, las cuales tienen una división de 10 cm de altura que separa en dos lados la base. El día anterior al inicio del ensayo se colocaron 20 gramos (peso húmedo) aproximadamente de sedimento control (100% limo-arcilla) del lado derecho de la pecera e igual cantidad de sedimento problema del lado izquierdo de la pecera. A continuación se agregaron 250 ml de medio de cultivo de cada lado de la pecera, y se dispusieron en baño de temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta el día siguiente. El volumen de medio de cultivo agregado no supera el nivel de la división por lo que ambos sedimentos y el agua sobrenadante de cada lado de

la pecera permanecen separados. Luego de 24 h de decantación, se agregaron 500 ml de medio de cultivo, previamente oxigenado, minimizando la resuspensión del sedimento. Las peceras así preparadas contienen un volumen de medio de cultivo que permite el pasaje de los organismos de un lado al otro de la división. Se colocaron 10 juveniles de *H. curvispina* de edad entre 18 y 25 días, ubicándolos del lado de la pecera en que está el sedimento problema. Con este número de organismos/pecera, la densidad de anfípodos representa aproximadamente 1000 animales/m². Existen reportes de abundancias de *H. curvispina* en ambientes naturales del norte Argentino mayores a 6000 individuos/ m² (Galassi et al., 2005), por lo tanto la densidad no afectó la sobrevivencia o la preferencia de los organismos en estos ensayos. El test se realizó sin aireación y la duración fue de 72 h. Luego de pasado este período de tiempo, se registró el número de organismos vivos en cada lado de la pecera. Las exposiciones al cobre realizadas mediante este ensayo fueron; 50, 100 y 500 µg Cu/g sedimento seco. Se ensayaron 5 réplicas de cada unidad experimental. Para el fenantreno se ensayaron las siguientes concentraciones: 0,5 y 1,0 µg fenantreno /g sedimento seco, realizando 5 y 10 réplicas, respectivamente. Se probó este ensayo en exposición a sedimento de la Bahía de Montevideo.

3.6. Análisis de datos

La linealidad de la respuesta del turbidímetro fue analizada por regresión, determinando los parámetros de la recta de mejor ajuste.

Las posibles diferencias entre tiempos de la turbidez se analizaron mediante análisis de la covarianza (ANCOVA) con los valores de largo (mm) y sobrevivencia (%) como covariables, con comparación *a posteriori* mediante test de Dunnett. La homogeneidad de varianzas para cada tiempo analizado fue chequeada mediante el test de Levene y en cuanto a la normalidad con el test Shapiro-Wilk. En los casos en que no se cumplieron los supuestos de homocedasticidad de varianzas y/o normalidad, se transformaron los datos. Además, la distribución de los datos de turbidez de todos los tratamientos a lo largo del tiempo fue comparada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Los resultados del test de alimentación se analizaron mediante ANCOVA, con el largo y la sobrevivencia como covariables, siempre que se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, en caso contrario se transformaron los datos.

La respuesta de evasión a sedimentos contaminados fue analizada mediante test X^2 , comparando las frecuencias de ocurrencia obtenidas en cada lado de la pecera contra las obtenidas cuando los organismos se exponen a sedimento control en ambos lados de la pecera. El nivel de significancia en todos los casos fue establecido en 0,05.

4. Resultados

4.1. Caracterización del sedimento control

El sedimento de tamaño de grano menor a 63 μ m (limo-arcilla) está compuesto por 49 % de limo (tamaños de partículas entre 63 y 8 μ m) y 51 % de arcilla (tamaño de las partículas menor a 8 μ m) y contiene 2% de materia orgánica. La CIC obtenida para este sedimento fue de 28,6 meq/100 g arcilla.

4.1.1. Ensayos de sobrevivencia y crecimiento con sedimento control y sedimento de la costa de Montevideo.

La sobrevivencia (10 días de exposición) en los sedimentos control fue mayor al 80% en ambos casos (**Fig. 4** A: 100% limo-arcilla; B: 100% arena), y no difirió significativamente del control (medio de cultivo) ($X^2=0,11$, $p=0,99$; $X^2=0,49$, $p=0,97$ respectivamente).

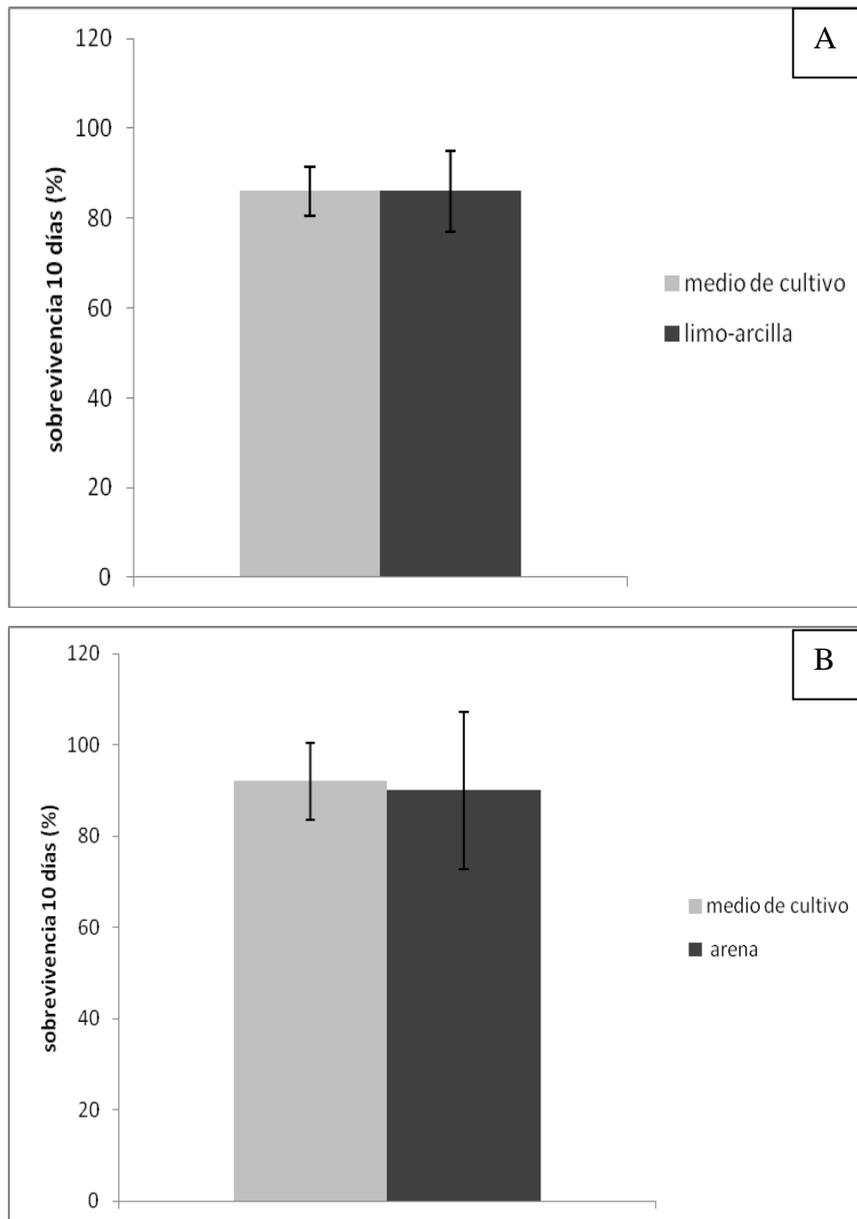


Figura 4- Sobrevivencia (%) de *H. curvispina* obtenida en la exposición de 10 días al sedimento control. (n=5)

A- 100% limo-arcilla. B- 100% arena.

La **Tabla 4** detalla los resultados obtenidos respecto a la exposición a sedimentos de la costa de Montevideo (PC, PY y L9 , B1 y B2). En la exposición de 10 días, la sobrevivencia no difirió respecto al control excepto para el sedimento de PY. No se detectaron diferencias en el crecimiento en los tratamientos respecto al control (ANCOVA, $F=0,87$; $p=0,48$).

La sobrevivencia en el sedimento de la Bahía de Montevideo (B1 y B2) fue significativamente menor que la obtenida en el control en exposición de 48 horas.

Tabla 4- Sobrevivencia y nivel de significancia p obtenidos en la exposición de *H.curvispina* a sedimentos de la costa de Montevideo.

(B1 y B2- Bahía, PC-Punta Carretas, PY-Punta Yeguas, L9-Desembocadura del Arroyo Carrasco)

Muestra	Tiempo de exposición	Porcentaje promedio de sobrevivencia	p
B1	48 horas	86	<0,01
B2	48 horas	80	<0,01
Sedimento control	48 horas	95	
PC	10 días	74	0,63
PY	10 días	58	0,03
L9	10 días	68	0,25
Sedimento control	10 días	80	

4.2. Caracterización de la sensibilidad de los organismos

4.2.1. Ensayos de toxicidad en matriz acuosa

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en esta etapa se presentan en la siguiente **Tabla 5**.

La LC50 96h obtenida para el cobre fue de 184 $\mu\text{g Cu/l}$, mientras que la LC50 10 días fue de 68 $\mu\text{g Cu/l}$.

En cuanto a la salinidad, las LC50 estimadas fueron: LC50 96h = 13, LC50 10 días = 11. El crecimiento fue evaluado en el ensayo 1, encontrándose una inhibición significativa del 18% respecto al control en los organismos expuestos a 17,2 de salinidad (ANCOVA, $F=3,31$, $p=0,049$).

Para el fenantreno no fue posible calcular la concentración letal por no obtenerse respuesta letal significativa en ninguno de los tratamientos. La sobrevivencia promedio en todos los tratamientos fue mayor al 80%. El crecimiento de los organismos no mostró diferencias entre tratamientos salvo para el tratamiento con 100 $\mu\text{g fenantreno/l}$, que alcanzó una inhibición significativa del 58% respecto al control (ANCOVA, $F=1,62$, $p=0,228$; Dunnett, $p=0,02$). La alimentación luego de la exposición fue de una gran variabilidad y similar en todos los tratamientos (ANCOVA, $F=0,68$, $p=0,57$).

Tabla 5- Resultados obtenidos en los ensayos de fase acuosa

N° Ensayo-Tóxico aplicado	Tiempo: LC50 (intervalo de confianza 95%)	Crecimiento	Test alimentación
1-Salinidad	96h: 12,1 (9,7-15) 10días: 8,5 (7,0-10,2)	18% inhibición para salinidad=17	NA
2-Salinidad	96h: 11,6 (10,5-11,8) 10días: 10,0 (8,2-12,1)	NA	NA
3-Salinidad	96h: 15,6 (14,4-17,0). 10días: 13,9 (12,4-15,5)	NA	NA
4-Cobre	96h:213,0 µg Cu /l (152,7-292,1)	NA	NA
5-Cobre	96h:220,8 µgCu/l (157,6-342,8)	NA	NA
6-Cobre	96h:193,3 µgCu/l (95,9-334,2)	NA	NA
7-Cobre	96h: 108,6 µgCu/l (94,2-125,1) 10días: 68 µgCu/l (59,7-76,6)	NA	NA
8-Fenantreno	NC- Supervivencia mayor al 80% en todas las concentraciones testeadas	58% inhibición para 100 µg/l fenantreno	NS (ANOVA, F=2,27; p=0,89)

NA: no analizado. NC: no calculado. NS: no significativo

4.3. Ensayos de toxicidad en matriz mixta: sedimento-agua

4.3.1. Efecto de la granulometría y la densidad de organismos en la generación de turbidez

Para la puesta a punto del turbidímetro, se realizaron curvas de calibración con el estándar formacina. Se obtuvo una correlación lineal (r) significativa de 0,93 para el rango de 0 a 40 FAU ($p < 0,01$) y 0,99 para el rango de 0 a 200 FAU ($p < 0,01$). La señal basal y repetitividad del equipo se determinaron mediante lecturas repetidas de agua destilada ($n=32$), obteniéndose una turbidez media de 132 mV, mientras que el desvío

estándar de estas medidas fue menor al 5%. El Anexo VI muestra los detalles de la puesta a punto del equipo.

La presencia de organismos en los frascos generó aumento de la turbidez en el agua sobrenadante respecto al control sin organismos, en cuatro de los cinco sedimentos ensayados. El aumento de la turbidez en el ensayo con sedimento 100% arena no difirió estadísticamente de los valores de turbidez registrados en los frascos sin organismos, por lo que este test no sería aplicable a sedimentos que contengan porcentajes de arena mayores al 75%. La sobrevivencia de los organismos en los cinco sedimentos ensayados fue mayor al 80% luego de 48 horas de exposición. La respuesta de generación de turbidez mayor y menos variable se obtuvo al exponer 20 organismos a los sedimentos compuestos por 75 y 100% limo-arcilla, por lo que fue seleccionado este número de organismos como el más adecuado para siguientes test. Dado que la respuesta de mayor turbidez se obtuvo con sedimentos de alto contenido de limo-arcilla, se continuó trabajando con este sedimento en los ensayos con agregado de cobre y fenantreno. Detalles de los valores de turbidez obtenidos con diferente número de organismos y composiciones granulométricas del sedimento se encuentran en el Anexo IV.

4.3.2. Efecto del cobre y fenantreno en la generación de turbidez

En los resultados de los ensayos 1 y 2 con cobre, se observó una alta variabilidad. La turbidez aumentó en todos los tratamientos hasta el tiempo 24 h, a partir del cual la turbidez disminuyó.

La comparación entre la distribución de los datos de turbidez a lo largo del tiempo (test de Kolmogorov-Smirnov), mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos con 50 $\mu\text{g Cu/g}$ y 100 $\mu\text{g Cu/g}$ ($p < 0,05$) y no significativas para el tratamiento con 500 $\mu\text{g Cu/g}$ ($p > 0,05$) (**Fig. 5**). La sobrevivencia en el control y en los tratamientos luego de las 48 horas de exposición fue no significativa y mayor al 80% en ambos experimentos (Fisher exact $p > 0,05$).

En el ensayo 3 con adición de cobre, la sobrevivencia promedio obtenida luego de la exposición de 48 h fue mayor al 80% en todos los tratamientos encontrándose diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 1000 y 1500 $\mu\text{g Cu/g}$ (Fisher exact $p = 0,0009$ y $0,0003$ respectivamente) (**Fig. 6**).

La comparación de las distribuciones de datos obtenidas a lo largo del tiempo para cada tratamiento respecto del control, detectó diferencias significativas entre el control y el tratamiento con 1000 $\mu\text{g Cu/g}$ (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$) (Fig. 7).

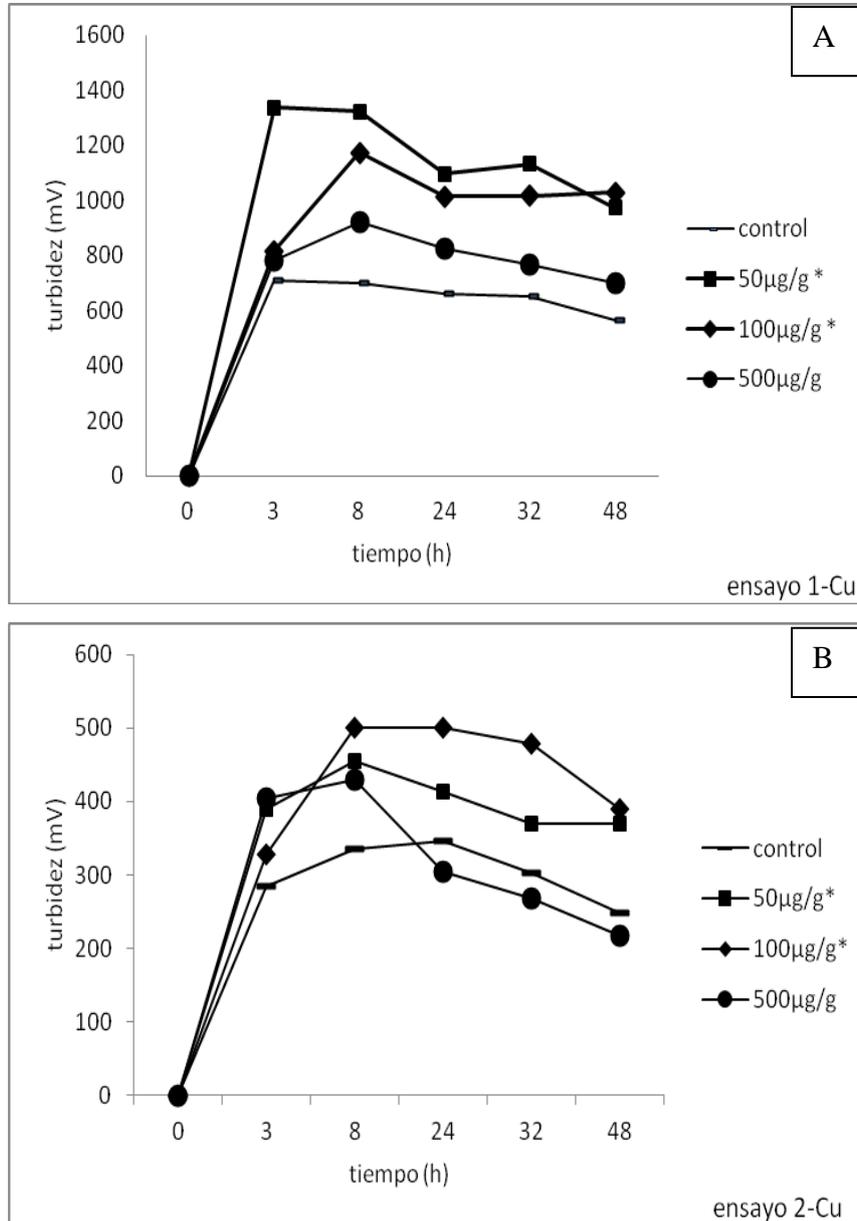


Figura 5- Turbidez a lo largo del tiempo para los ensayos de sedimentos con agregado de 50,100 y 500 $\mu\text{g Cu/g}$ sedimento. A-ensayo 1. B-ensayo 2. * diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

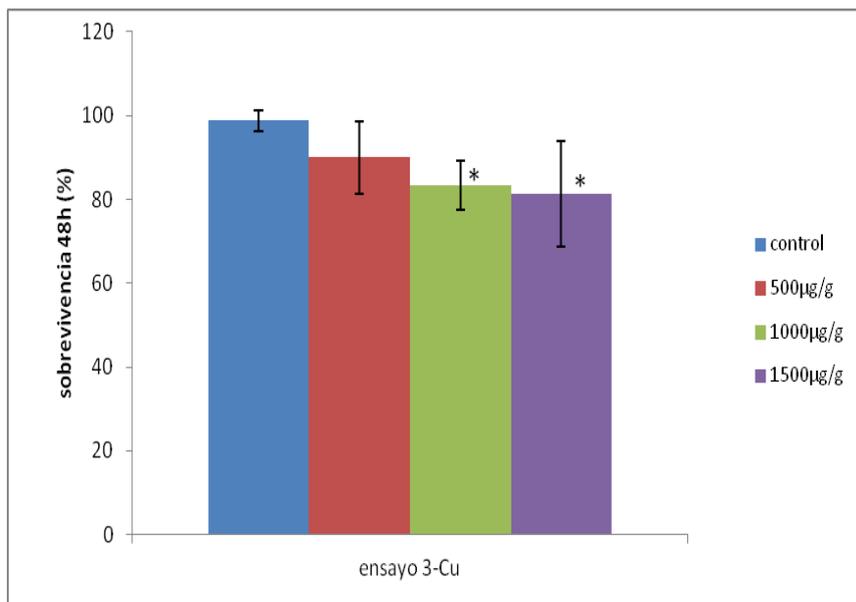


Figura 6- Supervivencia (%) de *H. curvispina* obtenida en la exposici3n de 48 horas a sedimento con 500, 1000 y 1500 µgCu/g sedimento.

* diferencias significativas respecto al control (p<0,05).

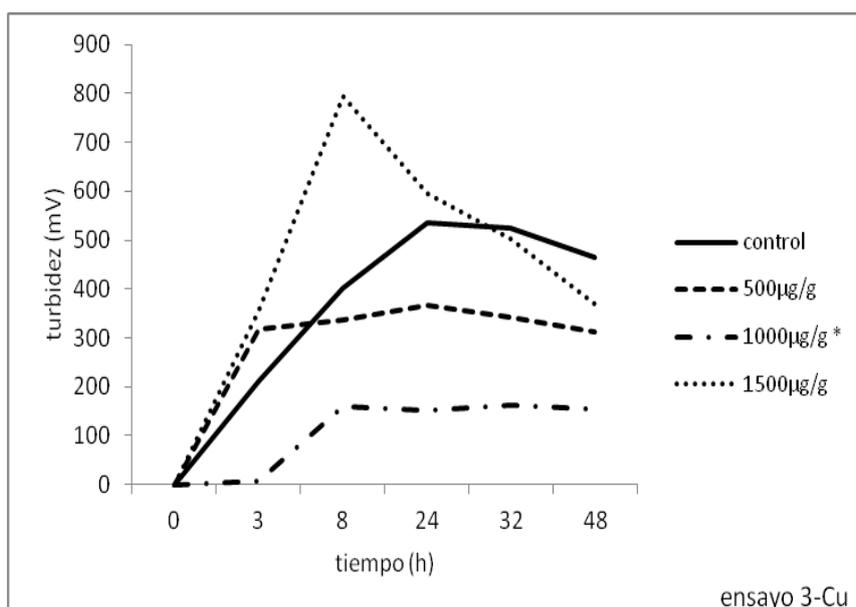


Figura 7- Turbidez a lo largo del tiempo (ensayo 3) para sedimentos con agregado de 500, 1000 y 1500 µgCu/g sedimento .

* diferencias significativas respecto al control (p<0,05).

En la **Figura 8** se muestra la relaci3n de la turbidez respecto a los tratamientos aplicados (48 horas). Esta forma de la curva de tipo bifásica, se observ3 para los

ensayos de turbidez en todos los tiempos medidos (3, 8, 24, 32 y 48 horas) y en todos los resultados de consumo de alimento luego de la exposición al cobre.

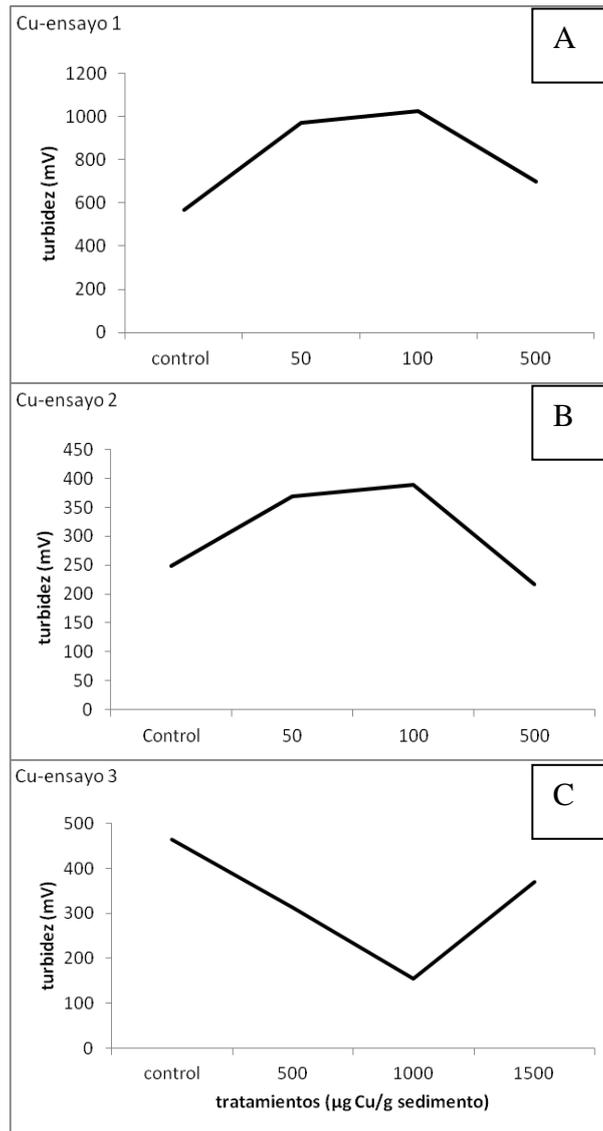


Figura 8- Turbidez registrada en el tiempo=48 horas (sedimentos adicionados con cobre).
A- 50, 100 y 500 µgCu/g sedimento (ensayo 1). B- 50, 100 y 500 µgCu/g sedimento (ensayo 2).
C- 500, 1000 y 1500 µgCu/g sedimento (ensayo 3).

La concentración de cobre determinada en el sedimento al adicionar 1,5 mg Cu/g sedimento fue de 1,3 mg Cu/g sedimento, lo cual representa un 86 % del contenido de cobre agregado. La concentración de cobre determinada en el agua sobrenadante fue de 0,1 mg/l Cu.

En los ensayos con adición de fenantreno la variabilidad de los datos fue elevada y la turbidez generada por los organismos en los tratamientos no difirió significativamente de la turbidez en el control, en ninguno de los tiempos analizados.

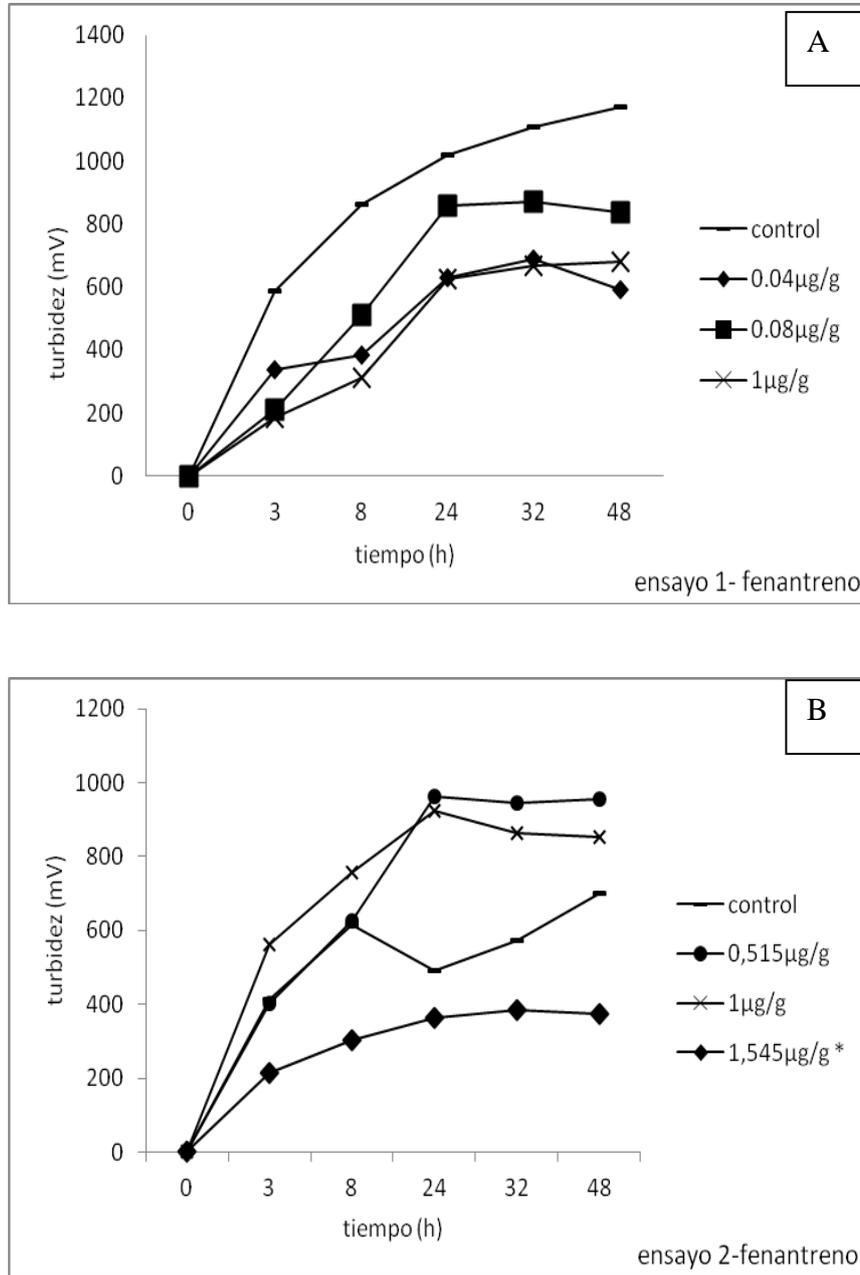


Figura 9- Turbidez a lo largo del tiempo en sedimentos adicionados con fenantreno. A- sedimento con 0,04, 0,08 y 1 µg fenantreno/g sedimento (ensayo 1-fenantreno). B-sedimento con 0,515, 1 y 1,545 µg fenantreno/g sedimento (ensayo 2-fenantreno). * diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

La distribución de los datos de turbidez a lo largo del tiempo para los tratamientos con 0,04, 0,08 y 1 $\mu\text{g/g}$ (ensayo 1) no mostró diferencias significativas respecto a la distribución de datos del control (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$ en ambos casos) (**Fig. 9-A**).

En el ensayo 2 con fenantreno la distribución de los datos de turbidez generada en los tratamientos con 1,545 μg fenantreno/g difirió significativamente de la obtenida en el control (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$) (**Fig. 9-B**).

En ambos ensayos con fenantreno, la sobrevivencia a las 48 h de exposición fue mayor al 80% en todos los casos, y no se detectaron diferencias significativas entre la sobrevivencia obtenida en el control con medio de cultivo respecto al control con acetona, ni en los tratamientos con fenantreno (Fisher exact $p > 0,05$ en todos los casos). La concentración de fenantreno en el sedimento del ensayo 2 fue determinada obteniéndose los siguientes resultados para las concentraciones nominales de 0,515, 1,03, 1,545 g fenantreno/g de sedimento seco; la concentración medida fue de 0,530, 0,680 y 1,510 g fenantreno/g de sedimento seco, mientras que en el sedimento control se obtuvo una concentración de fenantreno de 0,130 $\mu\text{g/g}$. La eficiencia del adición de fenantreno estuvo entre 66 y 102%.

4.3.3. Efecto del cobre y fenantreno en la alimentación

En el ensayo 1, el test de alimentación mostró que los organismos inicialmente expuestos a 50 $\mu\text{g Cu/g}$ presentaron un consumo mayor y significativo (ANCOVA, $F=10,5$; $p=0,008$), mientras que en los organismos expuestos a 500 $\mu\text{g Cu/g}$ se observó el menor consumo de alimento. En el test de alimentación correspondiente al experimento 2 no se detectaron diferencias significativas en el consumo de alimento entre los tratamientos aplicados y el control, aunque se mantuvo la tendencia de mayor consumo de alimento en el caso del tratamiento de 50 $\mu\text{g Cu/g}$ y menor consumo de alimento en los organismos que estuvieron expuestos a 500 $\mu\text{g Cu /g}$ (ANCOVA, $F=1,2$; $p=0,35$) (**Fig. 10**).

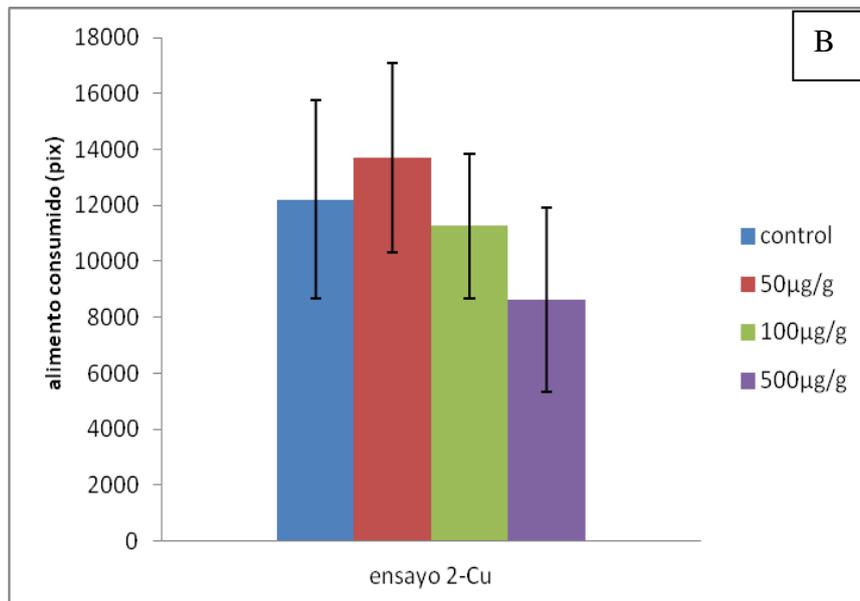
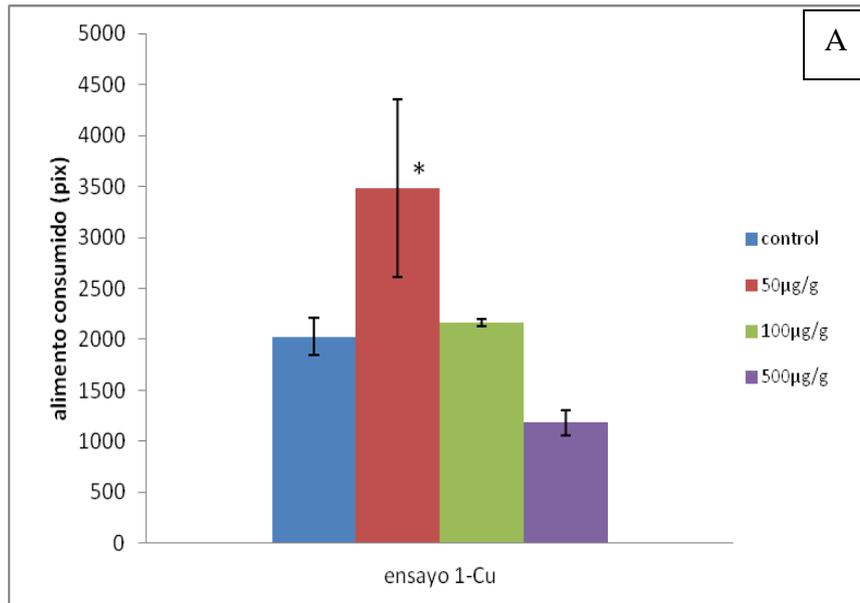


Figura 10- Consumo de alimento (píxeles) luego de la exposición a 50,100 y 500 µgCu/g sedimento.

A-ensayo 1. B- ensayo 2. * diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

En el test alimentación correspondiente al ensayo 3 con cobre, se detectaron diferencias significativas entre el consumo de alimento de los organismos control y los expuestos a 1500 µg Cu/g (ANCOVA, $F=4,58$, $p=0,038$) (**Fig. 11**).

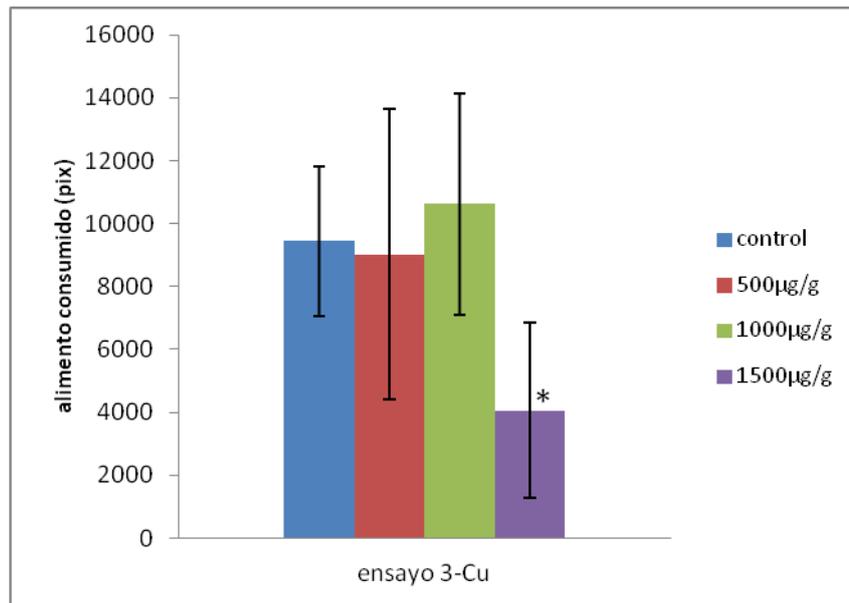


Figura 11- Consumo de alimento (píxeles) luego de la exposición a 500, 1000 y 1500µgCu/g sedimento.

* indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

En el ensayo 1 con fenantreno el alimento consumido por organismo en 24 horas en el control no difirió significativamente del consumido en los tratamientos aplicados (ANCOVA, $F=0,76$, $p=0,5$). Mientras que en el ensayo 2 tampoco se detectaron diferencias significativas en el consumo de alimento/organismo entre el control y los tratamientos aplicados (ANCOVA, $F=2,1$, $p=0,14$) (**Fig. 12**).

En la **Figura 13** se muestra la relación de la turbidez respecto a los tratamientos aplicados (48 horas). Esta forma de la curva de turbidez de tipo bifásica, se observó en todos los tiempos medidos (3, 8, 24, 32 y 48 horas) y en los resultados del ensayo 1 de consumo de alimento luego de la exposición.

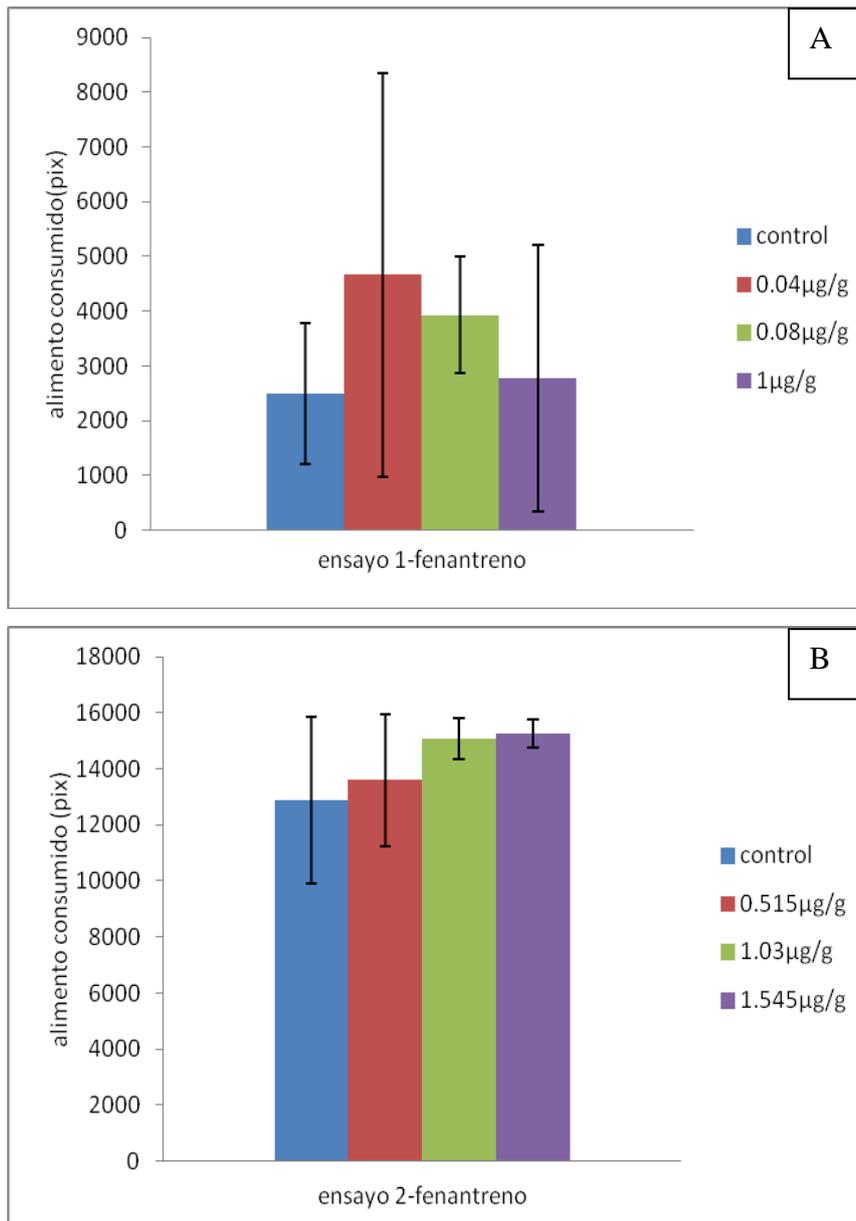


Figura 12- Consumo de alimento (píxeles) luego de la exposición a sedimentos con agregado de fenantreno.

A- ensayo 1- 0,04, 0,08 y 1 µg fenantreno/g sedimento. B- ensayo 2- 0,515, 1 y 1,545 µg fenantreno/g sedimento.

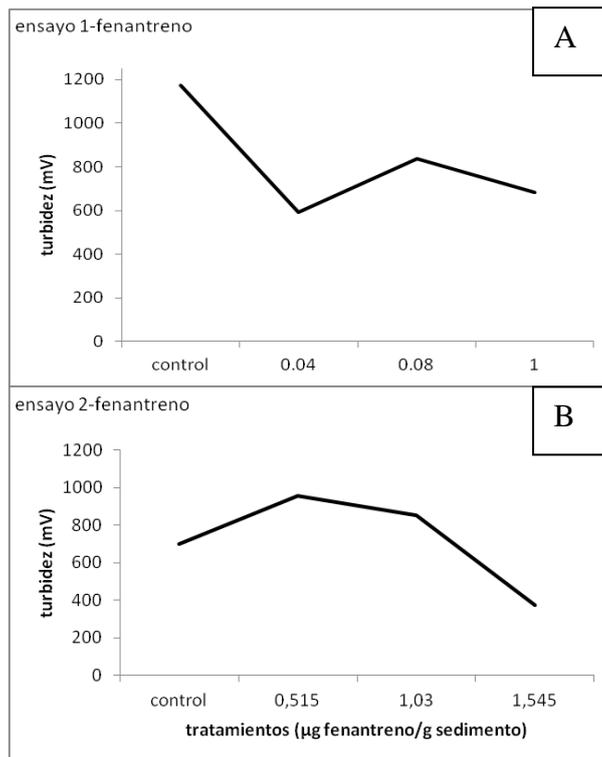


Figura 13- Turbidez registrada en el tiempo=48 horas.
 A-Ensayo 1 sedimentos con agregado de 0,04, 0,08 y 1 µg fenantreno/g sedimento B-Ensayo 2 sedimentos con agregado de 0,515, 1 y 1,545 µg fenantreno/g sedimento (ensayo 2).

4.3.4. Efecto del sedimento de la costa de Montevideo en la generación de turbidez y la alimentación

La turbidez generada por los organismos en los sedimentos provenientes de B1 y B2 fue significativamente menor a la generada en el sedimento control a partir del tiempo 8 horas en adelante (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). La diferencia en la distribución de los datos de ambas muestras respecto del control también fue significativa (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$ en ambos casos) (**Fig. 14**). La sobrevivencia promedio en B1 fue de 86%, en B2 fue de 80%, mientras que en el control la sobrevivencia promedio fue 95%. Se detectaron diferencias significativas en la sobrevivencia promedio de B1 y B2 respecto al control (Fisher exact test, $p = 0,05$ para B1 y $p = 0,002$ para B2) (**Fig. 15**). El consumo de alimento por organismo luego de 48 h de exposición al sedimento B1 fue significativamente menor que el de los organismos expuestos al sedimento control (ANCOVA, $F = 4,3$; $p = 0,04$) (**Fig. 16**).

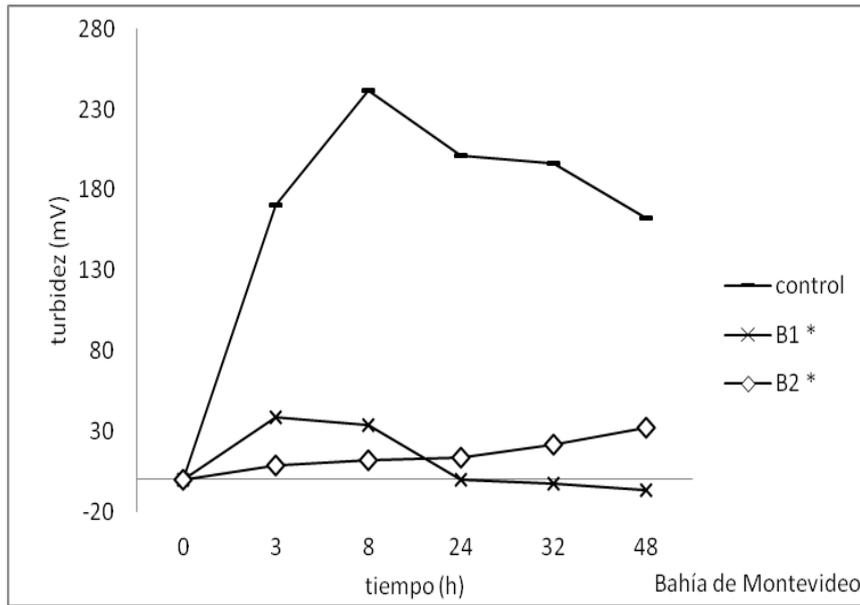


Figura 14- Turbidez a lo largo del tiempo, para la exposición a sedimentos provenientes de la Bahía de Montevideo.

* diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

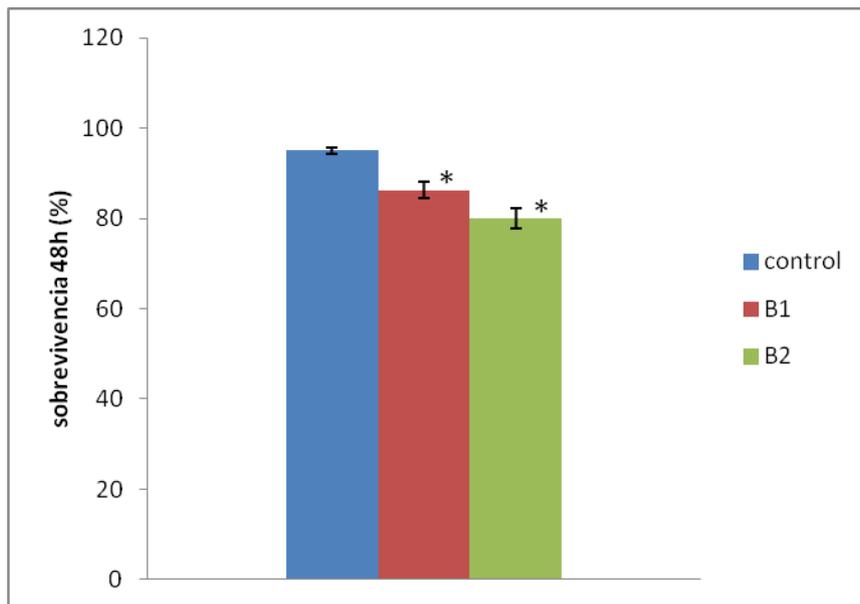


Figura 15- Sobrevivencia (%) de *H. curvispina* obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento proveniente de la Bahía de Montevideo.

* diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

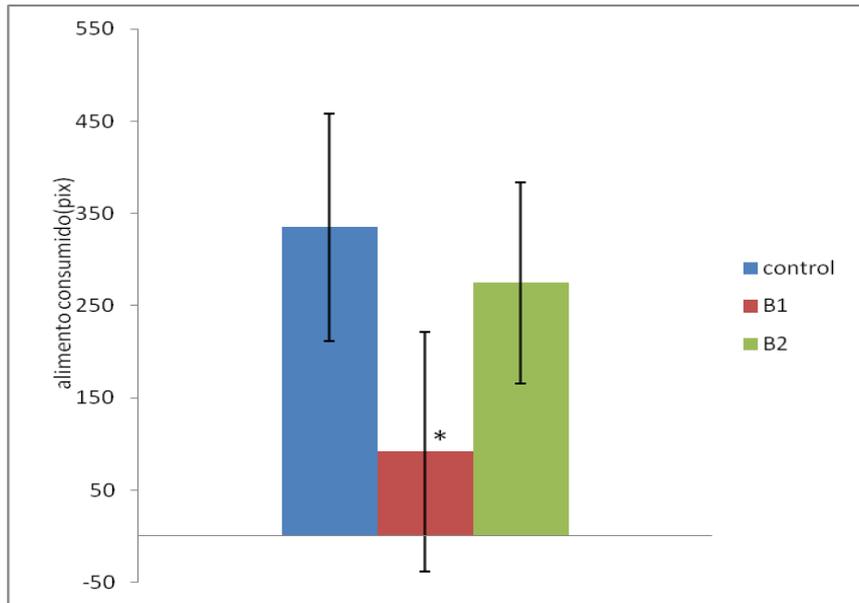


Figura 16- Consumo de alimento (pixeles) luego de la exposición al sedimento de la Bahía.
* diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

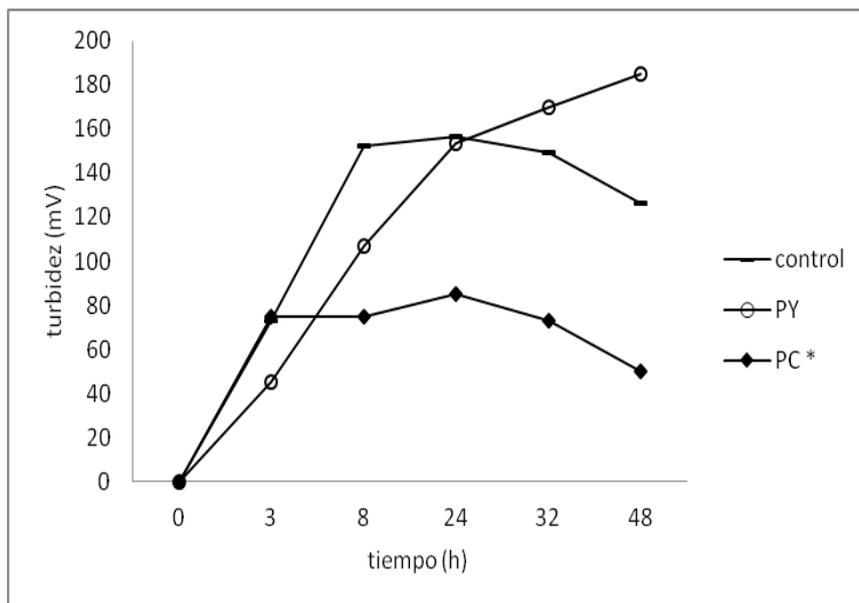


Figura 17- Turbidez a lo largo del tiempo para la exposición a sedimentos provenientes de PY y PC.
* diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

La distribución de los datos de turbidez obtenida por la exposición al sedimento de PC difirió de la obtenida en el control (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$) (**Fig. 17**). No se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia entre los tratamientos respecto al control (Fisher exact test, $p = 0,36$ y 1 para PY y PC respectivamente) (**Fig. 18**).

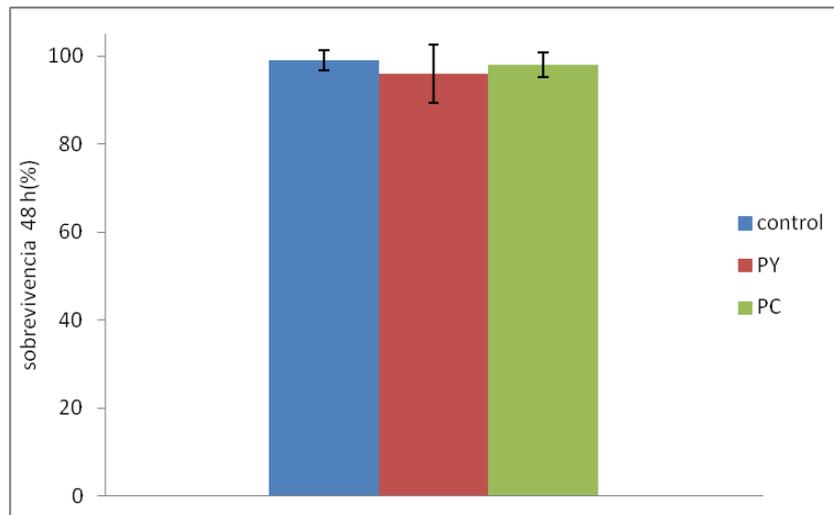


Figura 18- Sobrevivencia (%) de *H. curvispina* obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento proveniente de PY y PC.

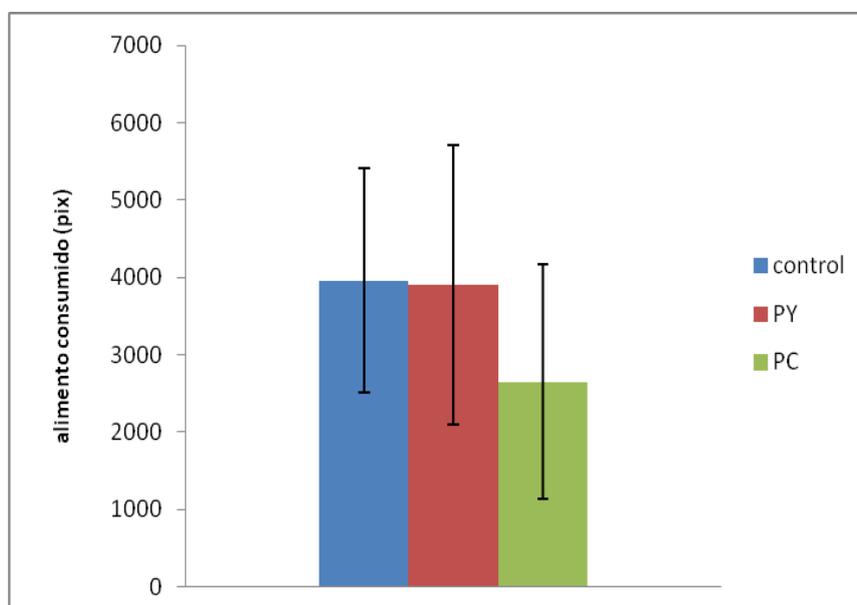


Figura 19- Consumo de alimento (píxeles) obtenido luego de la exposición a sedimentos provenientes de PY y PC.

La alimentación de los organismos expuestos a ambas muestras no difirió de la de los organismos en el control (ANCOVA, $F=1,06$, $p=0,37$) (**Fig. 19**).

Para el sedimento proveniente de L9, la distribución de los datos de turbidez a lo largo del tiempo fue significativa respecto a la distribución de los datos control (Kolmogorov-Smirnov, $p<0,05$) (**Fig. 20**). La sobrevivencia luego de 48 h de exposición tanto en el control como en la muestra L9 fue mayor al 80% y no significativa (Fisher exact test,

$p=0,31$) (**Fig. 21**). El promedio de consumo de alimento de los organismos expuestos a L9 difirió respecto al control (ANCOVA, $F=17,3$, $p=0,04$) (**Fig. 22**).

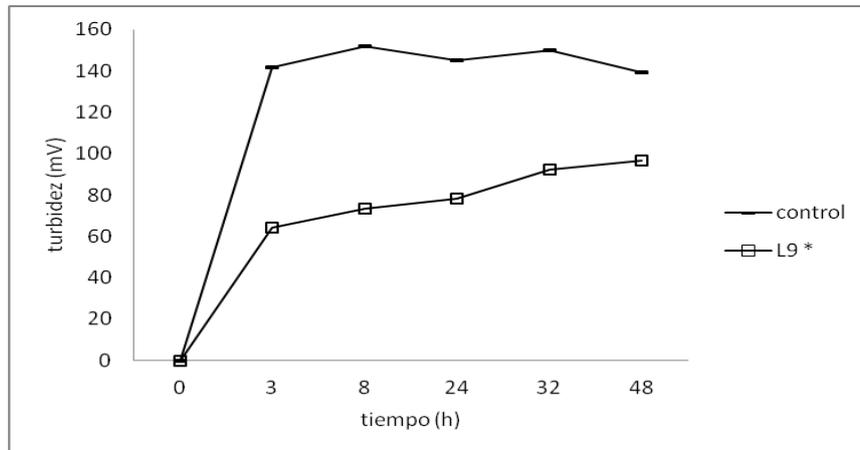


Figura 20- Turbidez a lo largo del tiempo, para la exposición a sedimentos provenientes de L9. * diferencias significativas respecto al control ($p<0,05$).

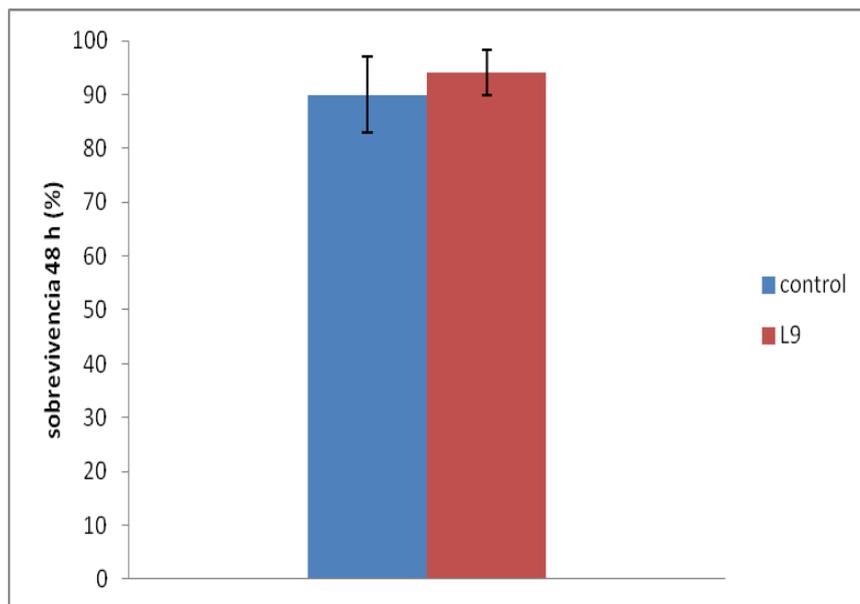


Figura 21- Sobrevivencia promedio (%) de *H. curvispina* obtenida en la exposición de 48 horas a sedimento proveniente de L9.

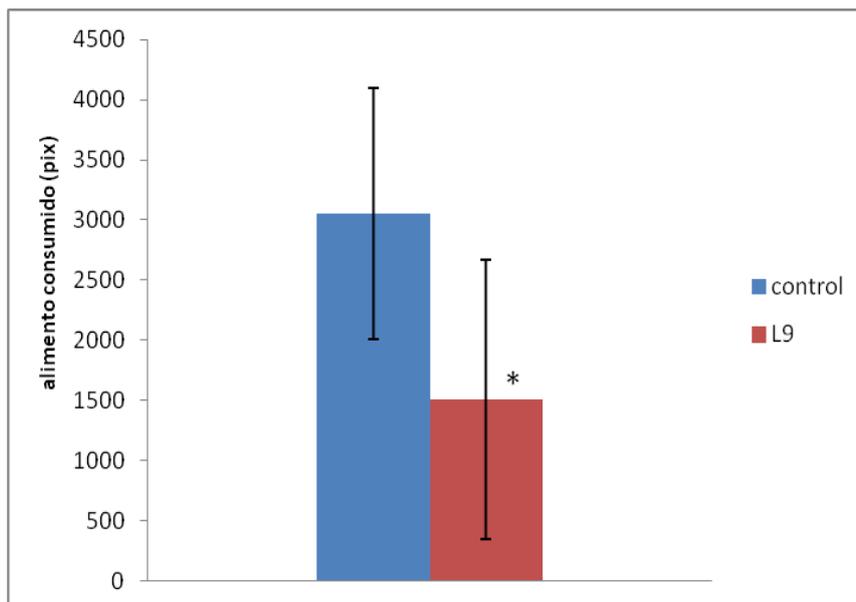


Figura 22- Consumo de alimento (píxeles) luego de la exposición a sedimento proveniente de L9.

* diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

4.3.5. Ensayos de evasión

La distribución de los organismos en las peceras luego de la exposición a 50, 100 y 500 μg Cu/g sedimento seco se muestra en la **Fig. 23**.

Se detectaron diferencias significativas en la distribución de los organismos en los tres tratamientos, respecto al control ($X^2 = 21,5, 15,6$ y $10,4$ respectivamente y $p < 0,01$ en los tres casos).

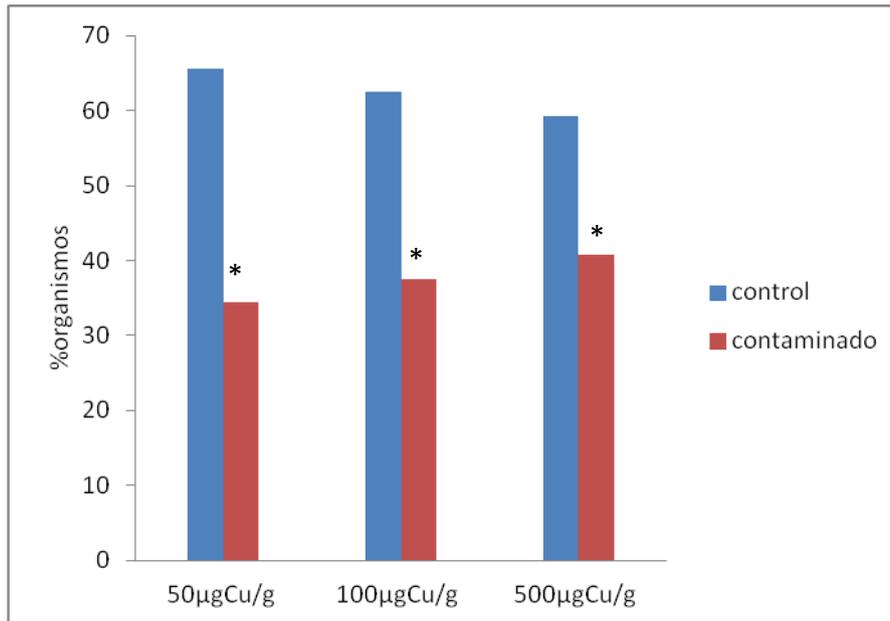


Figura 23- Distribución de los organismos (%) a ambos lados de la pecera, para exposiciones a 50, 100 y 500 µgCu/g sedimento.
 * diferencias significativas respecto al control (p<0,05).

En la **Fig. 24** se muestra la distribución de los organismos en las peceras, luego de la exposición a 0,5 y 1,0 µg/g de fenantreno, la cual fue significativa respecto al control ($X^2 = 68,5$ y $10,4$ respectivamente, $p < 0,01$ en ambos tratamientos).

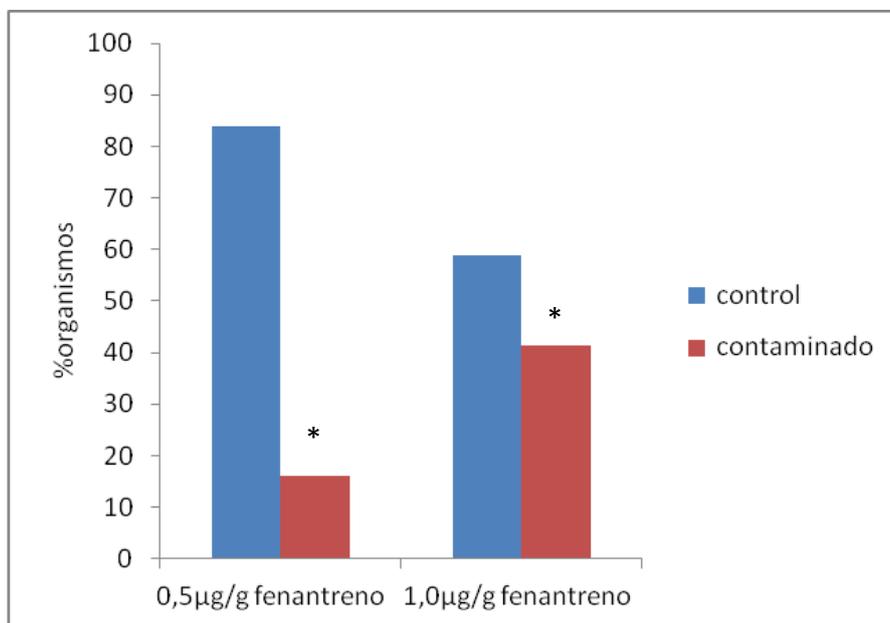


Figura 24- Distribución de los organismos (%) a ambos lados de la pecera, para exposiciones a 0,5 y 1 µg fenantreno/g sedimento.
 * diferencias significativas respecto al control (p<0,05).

En el ensayo de evasión aplicado a sedimento de la Bahía de Montevideo (B1) se detectaron diferencias significativas en la distribución de los organismos respecto al control ($X^2=44,4$, $p<0,01$) (Fig. 25).

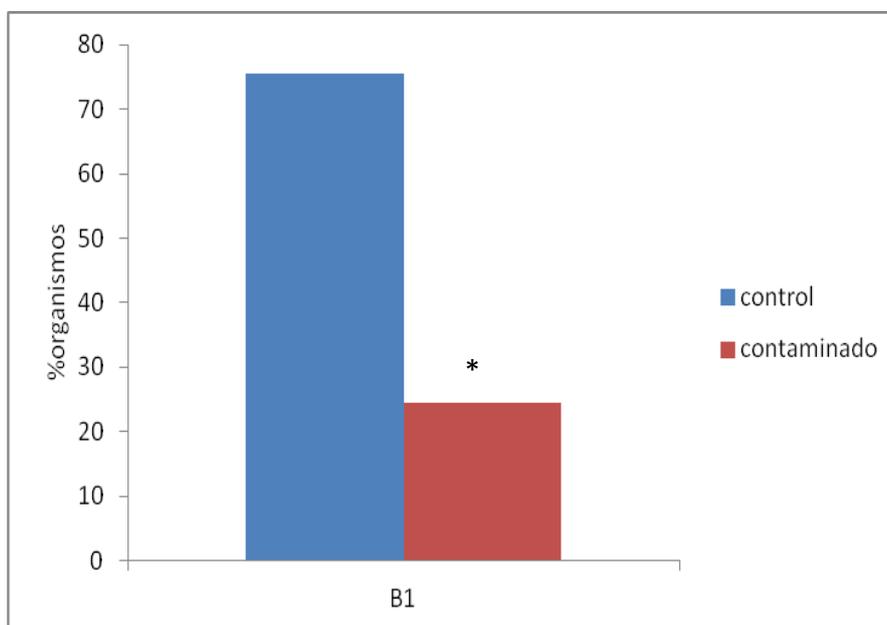


Figura 25- Distribución de los organismos (%) a ambos lados de la pecera, para la exposición a sedimento proveniente de la Bahía de Montevideo (B1).

* diferencias significativas respecto al control ($p<0,05$).

5. Discusión

Los resultados obtenidos representan el primer reporte de efectos comportamentales de *H. curvispina* en respuesta a la contaminación. Los ensayos puestos a punto son de fácil implementación y bajo costo. Además, al ser no destructivos, no requieren la muerte de los organismos en experimentación, brindando señales de alerta temprana sobre el efecto de los contaminantes en la biota. Se comprobó para *H. curvispina* que los puntos finales de tipo comportamentales son más sensibles que la sobrevivencia y el crecimiento. Este trabajo constituye el primer acercamiento al conocimiento de la sensibilidad de *H. curvispina* frente a la salinidad y al fenantreno.

5.1. Caracterización de la sensibilidad de los organismos en cultivo

La LC50 96h promedio obtenida para el cobre ($184 \mu\text{g Cu/l}$) está en concordancia con valores reportados para este género (Tabla 6). El coeficiente de variación (CV) tomando los 4 ensayos realizados fue de 28%, valores similares de CV se encuentran en trabajos reportados con la misma especie (Pelusso, 2011). La sensibilidad al cobre

(LC50 exposición 10 días) fue de 68 µg Cu/l (95% de conf.: 59,7-76,6) siendo este el primer reporte para este tiempo de exposición para la especie. Este valor contrasta con los reportados para el anfípodo *Hyalella azteca* de 31-35 µg Cu/l (West et al., 1993; Phipps et al., 1995) pero las diferencias en la dureza del agua sobrenadante podrían explicar la menor sensibilidad al cobre obtenida con *H. curvispina*. En dichos trabajos se utilizó agua de dilución de entre 40-47 mg/l CaCO₃, mientras que en este trabajo la dureza del agua de dilución estuvo en el entorno de 90 mg CaCO₃/l. Pelusso (2011) comprobó que una disminución de aproximadamente 60% en la dureza del agua sobrenadante genera un aumento de 3 veces en la sensibilidad al cobre de juveniles de *H. curvispina*. Otros trabajos han demostrado que el aumento de la dureza del medio ejerce un efecto protector frente a la toxicidad por metales (USEPA, 1980; Deaver & Rodgers, 1996).

Tabla 6- Valores reportados de LC50 Cu para el género *Hyalella*.

Organismo	LC50 (mg Cu/l)	Duración	Referencia
<i>H. curvispina</i>	0,184 0,0679	96 h 10 días	<i>Este trabajo</i>
<i>H. curvispina</i>	0,11	96 h	Peluso 2011
<i>H. pseudoazteca</i>	0,17	96 h	Giusto & Ferrari 2008
<i>H. azteca</i>	0,031	10 días	West et al. 1993
<i>H. azteca</i>	0,035	10 días	Phipps et al. 1995
<i>H. azteca</i>	0,0656 0,0526 0,0672	96 h 7 días 10 días	Suedel et al. 1996
<i>H. azteca</i>	0,056	7 días	Borgmann et al. 2005

En cuanto a la salinidad, los valores de LC50 promedio obtenidos de 13 (96 h) y 11 (10 días) son menores que los reportados por Nebeker & Miller (1988), para *H. azteca* (LC50 96h=22,6-24; LC50 10 días= 18,7-22) utilizando organismos adultos (de aproximadamente 2 meses de edad). La tolerancia a la salinidad de los organismos adultos de *H. curvispina* no fue analizada en este trabajo, así como tampoco el efecto de la aclimatación a la salinidad. La exposición realizada en este trabajo fue con organismos juveniles, de tipo aguda, sin aclimatación previa, lo cual implica las mayores condiciones de stress frente a la salinidad. Otros investigadores (Lee & Petersen, 2003; Delgado et al., 2011) han reportado la influencia de la aclimatación a la

salinidad durante el desarrollo de los organismos en relación a su tolerancia a la vida en ambientes de variadas salinidades. La salinidad del agua sobrenadante al sedimento en ambientes estuarinos presenta una gran variabilidad, haciendo difícil la aproximación a las condiciones naturales en los test de laboratorio. A los efectos del uso de *H. curvispina* en test de toxicidad de sedimentos estuarinos, la tolerancia a la salinidad encontrada muestra que es posible su uso, cuando el agua sobrenadante al sedimento es agua dulce. En caso de que la salinidad en esas condiciones excediera lo tolerable por estos organismos, sería recomendable realizar el test en modo de renovación del agua sobrenadante, en lugar de utilizar condiciones estáticas. De esta manera se mantendrían las condiciones de salinidad por debajo de la LC50 determinada. Esto es lo establecido en los protocolos de ensayos para anfípodos del mismo género (EPS 1/RM/33, 1997; USEPA, 2000). Teniendo en cuenta esto y que la toxicidad de los contaminantes puede variar en función de la salinidad en la que se encuentren, resulta razonable el sistema de ensayo, limitando el número de factores que afectan la toxicidad de los contaminantes en el sedimento (Nebeker & Miller, 1988).

La sobrevivencia en el sedimento control (100% limo-arcilla) estuvo siempre por encima del 80% lo que indica que este sedimento proporciona un adecuado sustrato para los organismos en los ensayos. Asimismo, los resultados obtenidos en los sedimentos de diferente composición granulométrica analizados en este trabajo mostraron que *H. curvispina* posee una alta tolerancia a sedimentos de variadas granulometrías. Se pudo corroborar la predicción de que *H. curvispina* es un organismo bioturbador del sedimento.

El equipo construido para realizar las medidas evidenció una linealidad aceptable para el rango de medidas de turbidez entre 0-40 y 0-200 FAU ($r=0,9277$ y $0,9889$ respectivamente) con un mejor desempeño en el rango de valores mayores a 40 FAU. Este instrumento de simple fabricación y muy bajo costo, mostró una suficiencia adecuada para los fines propuestos. Los resultados obtenidos (Anexo I) en los ensayos de turbidez con sedimento control de diferentes granulometrías, mostraron que este ensayo no es aplicable a sedimentos cuya granulometría es 100% arena. Por su tamaño de partícula, la arena no fue factible de ser resuspendida por los organismos, entonces, pese a que la sobrevivencia en esta categoría de sedimento fue mayor al 80 %, la

respuesta de turbidez mostró no ser útil en este tipo de sedimento. La zona costera de Montevideo se caracteriza por la presencia de sedimentos de tipo limosos, con contribuciones menores de arcilla y arena (Muniz et al., 2004) por lo que las limitaciones detectadas para este ensayo no afectarían su aplicabilidad en dicha zona.

5.3. Efecto del cobre y el fenantreno en la generación de turbidez y la alimentación

Ciertas características geoquímicas del sedimento control (e.g. composición granulométrica, capacidad de intercambio catiónica, contenido de materia orgánica) pueden incidir en la biodisponibilidad de los contaminantes agregados al sedimento en este trabajo. Babich & Stotzky (1977, 1979) demostraron que la toxicidad de sedimentos adicionados con metales pesados (cadmio y el plomo) disminuye cuanto mayor es la capacidad de intercambio catiónica de los minerales arcillosos que los componen. La CIC está determinada por la cantidad y composición de la materia orgánica y los minerales de arcilla del sedimento, reportándose por ejemplo, valores de 97,7 meq/100g para el mineral de arcilla montmorillonita que conlleva un mayor efecto protector frente a la toxicidad por metales; y de 5,8 meq/100g para el mineral de arcilla kaolinita cuyo efecto protector es menor (Babich & Stotzky 1977; 1979). El contenido de materia orgánica determinado en el sedimento control en este trabajo fue del 2%, lo cual permite estimar un contenido de Carbono Orgánico Total (COT) aproximado de 1,2%. Bay et al. (1989) reportaron que valores similares de COT disminuyen la biodisponibilidad del fenantreno para el anfípodo *Grandidierella japónica*. Sin embargo se ha demostrado que este factor ni otros no considerados en este estudio, como ser el contenido de sulfuros ácidos volátiles (AVS) son suficientes para predecir la toxicidad de sedimentos, sugiriendo que se debe tener en cuenta otras fases de unión de los contaminantes, como ser el agua intersticial y el agua sobrenadante (Correia & Costa, 2000), y factores inherentes a la biología de los organismos expuestos, como ser el comportamiento alimentario (Luoma, 1989; De Jonge et al., 2010). En este trabajo, la exposición debida al contacto con la fase acuosa del sistema debió ser mínima, ya que los contaminantes adicionados al sedimento se repartieron principalmente en la fase sólida (retención de más del 66% de la concentración de fenantreno y el 85% de la concentración de cobre). Los animales depositívoros/detrítívoros están expuestos a los metales tanto en solución como a través de la ingestión de partículas con metales asociados. La incorporación de metales a través de ingestión de partículas es ineficiente,

pero importante por los elevados niveles de concentraciones que se pueden dar en los sedimentos (Luoma, 1989). Este sería el caso de *H. curvispina*, ya que en estudios recientes se han analizado sus preferencias alimentarias reportándose un consumo importante de materia orgánica particulada fina y clasificándose esta especie como colector-recolector y triturador facultativo (Saigo et al., 2009). Por ello, la ruta de exposición más probable en los ensayos de fase mixta adicionados con contaminantes pudo haber sido la ingestión de partículas.

Los sedimentos adicionados en este trabajo tuvieron un período de estabilización alto, de alrededor de 30 días para el cobre y 50 días para el fenantreno, lo cual podría explicar, en conjunto con las características fisicoquímicas del sedimento control y la dureza del agua sobrenadante los altos niveles de sobrevivencia obtenidos en la exposición a estos sedimentos. El método de adición de contaminantes y la duración del periodo de estabilización afecta el pH y por lo tanto el particionamiento de los contaminantes en las diferentes fases, ya sea el sedimento, el agua de poro o el agua sobrenadante (ASTM, 2008; Hutchins et al., 2008). Los sedimentos adicionados con metales que no han cumplido un período de estabilización suficiente generalmente contienen altas concentraciones de metales en el agua de poro y es probable que la respuesta tóxica de los organismos expuestos sea mayor a la que ocurriría en condiciones *in situ* para sedimentos contaminados con similares concentraciones y características (Hutchins et al., 2008).

Los resultados obtenidos en los ensayos de turbidez y de alimentación mostraron una alta variabilidad por lo que más repeticiones podrían haber sido necesarias para aumentar el poder estadístico en los experimentos.

5.3.1 Cobre

De acuerdo a lo postulado, el patrón de respuestas de turbidez y alimentación mostró una estimulación de las respuestas en las concentraciones de cobre más bajas, y una tendencia a la inhibición en las concentraciones más altas. Si bien las diferencias entre los tratamientos no siempre fueron significativas, se evidenció un patrón similar en todos los ensayos realizados al analizar la serie temporal de datos (desde 3h a 48 h de ensayo) (**Fig. 8**). Respuestas similares han sido reportadas en organismos de diferentes taxa, desde bacterias hasta mamíferos, frente a una amplia gama de agentes químicos

(Stebbing, 1982; Calabrese & Baldwin 1998). Este mecanismo denominado hormesis, se define como un fenómeno de dosis-respuesta de tipo bifásico en forma de U o de U invertida y se caracteriza por una estimulación inicial a bajas dosis y una inhibición a dosis altas (Calabrese & Baldwin, 1998; 2002). Se describe como una respuesta de leve sobrecompensación a continuación de una disrupción de la homeostasis, sobrecompensación que se produce para lograr la reparación de los sistemas biológicos frente al daño (Stebbing, 1982, 2003; Calabrese, 2008). Evidencias de hormesis en anfípodos frente a la exposición crónica a sedimentos adicionados con cobre (1 a 6 mg/kg) han sido reportadas en respuestas subletales como el crecimiento y la producción de crías. Este estímulo en el crecimiento y la producción de crías fue asociado al incremento detectado en la producción de metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína y captadoras de metales, que juegan un rol esencial en la detoxificación de metales en la mayoría de los tejidos animales (Correia et al., 2001).

Calabrese & Baldwin (2002) detallaron características cualitativas y cuantitativas de la respuesta hormética, algunas de las cuales se evidenciaron en este trabajo, como se describe a continuación. La exposición a 50 µgCu/g de sedimento (la dosis más baja de cobre utilizada en este trabajo) generó un aumento en la turbidez significativo a lo largo del tiempo respecto al control. Este aumento promedio fue del 78% en el ensayo 1 y 32% en el ensayo 2. Para la exposición de 100 µgCu/g el aumento significativo en la turbidez estuvo entre 55% en el ensayo 1 y 45 % en el ensayo 2. Estos valores están dentro del rango de estímulo de hasta 2 veces el valor del control definido por Calabrese & Baldwin (2002). La respuesta en la turbidez para el tratamiento con 1000 µgCu/g fue de inhibición significativa en el ensayo 3. Por lo tanto, para el cobre, se detectaron efectos de estímulo e inhibición en la respuesta de turbidez. Asimismo, en el ensayo de alimentación, la exposición de *H. curvispina* a una concentración de 50 µgCu/g provocó un aumento significativo de su consumo de alimento respecto al del control (ensayo 1) y se observó una inhibición significativa del consumo de alimento en los organismos expuestos a la concentración de cobre más alta testeada (1500 µg/g, ensayo 3).

Estudios previos con la especie *H. pseudoazteca* expuesta 10 días a sedimentos (47% arena, 53% arcilla) reportaron un efecto significativo en la sobrevivencia y el crecimiento en organismos expuestos a 100 µg Cu/g (Giusto & Ferrari, 2008). Sin embargo, Pyle & Mirza (2007) demostraron que concentraciones de cobre entre 5 y 20

$\mu\text{g/l}$ interfieren en la habilidad para percibir importante información química del ambiente de organismos de tres niveles tróficos de sistemas acuáticos (hirudíneos, cladóceros y peces). El reconocimiento, discriminación y procesamiento de señales olfatorias está mediado por mecanismos similares en animales filogenéticamente diversos (Krieger & Breer, 1999), por lo que es de esperar que los anfípodos utilizados en este trabajo también se vean afectados a este nivel. La afectación de la quimio sensación debida a la contaminación por cobre encontrada por Pyle & Mirza (2007) incluye procesos de importantes consecuencias a nivel poblacional y de comunidades tales como la defensa contra la predación, la capacidad de encontrar comida y la percepción de señales sexuales. Además, estudios a nivel molecular han reportado que una concentración de $10 \mu\text{g/l}$ de cobre inhibe la actividad de la ATPasa de sodio/potasio en branquias del anfípodo *Gammarus pulex*, llevando a una caída en el contenido de sodio en la hemolinfa y comprometiendo su capacidad de osmoregulación (Brooks & Mills, 2003).

La distribución de los datos de turbidez se ajustó en todos los casos a una función cuadrática, con un máximo de turbidez ubicado a las 24 horas de exposición, luego del cual la turbidez disminuyó. Una forma similar de distribución de los datos fue comprobada en ensayo de turbidez con el anfípodo *Corophium volutator* por Briggs et al. (2003).

El valor máximo de turbidez obtenido con *H. curvispina* en el sedimento control fue de 707 mV, lo cual podría indicar que esta especie tiene mayor potencial como bioturbador del sedimento que *C. volutator*, cuyo valor máximo de turbidez en el sedimento control fue un orden de magnitud menor.

El ensayo de turbidez mostró sensibilidad para detectar sedimentos cuyas concentraciones estuvieron entre 50 (por encima del TEL) y $100 \mu\text{gCu/g}$ (levemente por debajo del PEL). La exposición de *H. curvispina* a estas concentraciones generó un aumento de la turbidez significativo respecto al generado en el control, probablemente provocado por un incremento en la actividad de los organismos en respuesta a la presencia de cobre. En las exposiciones de 5 veces el PEL ($500 \mu\text{gCu/g}$) y por encima (hasta 10 veces el PEL), el descenso en la turbidez muestra una disminución en la actividad de los organismos, sumado a una mortalidad significativa para el tratamiento

con 1000 y 1500 $\mu\text{gCu/g}$. En el tratamiento con 500 $\mu\text{gCu/g}$ la sobrevivencia fue siempre menor (aunque no significativa) que la del control en todos los ensayos realizados. El valor pico de 794 mV observado a las 8 horas de exposición a 1500 $\mu\text{gCu/g}$ podría deberse a la actividad de organismos cuya sobrevivencia está siendo afectada ya que a esa concentración la sobrevivencia fue significativamente menor que la del control. El test de alimentación, mostró una capacidad de detección de la afectación en el consumo de alimento a concentraciones subletales (50 $\mu\text{gCu/g}$ de sedimento) y una inhibición del consumo de alimento en concentraciones en que la sobrevivencia estuvo afectada (1500 $\mu\text{gCu/g}$ de sedimento).

5.3.2. Fenantreno

Los ensayos de turbidez con exposición a fenantreno no mostraron un patrón de respuestas hormético. El consumo de alimento no difirió del consumo del control en todos los tratamientos realizados con fenantreno, por lo que, la respuesta de tipo hormética en la alimentación luego de la exposición a fenantreno tampoco puede ser postulada.

La alta variabilidad de los valores de toxicidad reportados para el fenantreno hace difícil la comparación con los resultados obtenidos. Interpretar estos resultados es complejo dada la gran cantidad de factores que afectan la biodisponibilidad y por lo tanto la toxicidad de los contaminantes en los sedimentos. Verrhiest et al. (2001) determinaron la LC50 14 días del fenantreno para *H. azteca*. El valor obtenido fue de 20,54 mg/kg. Por otro lado, concentraciones de fenantreno de 50 a 82 $\mu\text{g/kg}$ fueron significativamente tóxicas para *H. azteca* (CCME, 1999). Lotufo & Fleeger (1997) y Lotufo (1997) estudiaron la toxicidad del fenantreno en dos especies de copépodos meiobentónicos estuarinos (*Schizopera knabeni* y *Nitocra lacustris*), así como los efectos en la reproducción, la alimentación y el comportamiento. Los valores reportados superan los valores de TEL y PEL establecidos en las guías de calidad de sedimentos, siendo la LC50 96 h para *S. knabeni* de 473 $\mu\text{g fenantreno/g}$, y observándose una disminución del 50 % de su tasa de alimentación al exponer los organismos a concentraciones de fenantreno entre 48 y 94 $\mu\text{g/g}$. Los test de toxicidad en laboratorio con sedimentos adicionados con hidrocarburos aromáticos policíclicos, a menudo reportan valores de LC50 de organismos bentónicos que están muy por encima de los valores de efecto

observados en campo (CCME, 1999). Pese a que las concentraciones de fenantreno adicionadas fueron bajas, el test de turbidez detectó inhibición de la turbidez significativa para los sedimentos adicionados con 1,5µg fenantreno/g de sedimento. El ensayo de alimentación, tal como ha sido planteado, analiza la respuesta de recuperación de los organismos luego de la exposición. Teniendo en cuenta que la exposición a los contaminantes es breve (48 horas), y que el n utilizado fue bajo (n=3-5), se puede afirmar que el ensayo de alimentación, como ha sido diseñado en este trabajo, no resultó una herramienta sensible para detectar la contaminación por fenantreno. El método de cuantificación utilizado tuvo un máximo coeficiente de variación del 20 % lo cual está dentro de lo tolerable para un método rápido y simple.

5.4. Efecto del sedimento de la costa de Montevideo en la generación de turbidez y la alimentación

El ensayo de turbidez mostró ser una herramienta adecuada para detectar la toxicidad de muestras de elevada contaminación. El hecho de que la turbidez obtenida a partir de las 8 horas de exposición a sedimentos de la Bahía de Montevideo fue significativamente menor que la obtenida en el control apoya esta afirmación. Asimismo la distribución de los datos generados a lo largo del tiempo también fue significativa respecto a la del control. A pesar de que la sobrevivencia de los organismos a las 48 horas de exposición en ambas muestras se vio afectada, el test de alimentación detectó diferencias significativas en el consumo de alimento solamente para los organismos expuestos a la muestra B1, consumo que fue menor que el del control. No ocurrió lo mismo para B2, que también es una muestra altamente contaminada. Por lo tanto, el test de alimentación con estas muestras de alta contaminación y el diseño experimental aplicado, no resultó un ensayo sensible. En general, este trabajo concuerda con lo ya reportado para esta zona (IMM, 2011b), por ejemplo el AMBI de la estación B1 indica una zona azoica extremadamente perturbada y un estado ecológico malo. Mientras tanto para la estación B2, el índice AMBI indica que el estado de salud de la comunidad bentónica es muy contaminado, correspondiente a un sitio muy perturbado y un estado ecológico malo (IMM, 2011b). Por lo tanto, para detectar la toxicidad de muestras de sedimento de alta contaminación, el test de turbidez mostró ser una herramienta más sensible que el test de alimentación.

Las diferencias significativas en la distribución de los datos de turbidez respecto al control obtenidas para la exposición a la muestra proveniente de PC podrían deberse a la contaminación fecal evidenciada por el contenido de coprostanol (IMM, 2011b) y a los valores de plomo por encima del TEL reportados en este punto de muestreo (IMM, 2011a). Dicha muestra representa una comunidad bentónica de transición a contaminada, que se puede encontrar en sitios moderadamente contaminados y de estado ecológico moderado (IMM, 2011b), fue diferenciada mediante el test de turbidez, pudiéndose detectar su toxicidad respecto al control. Ensayos de toxicidad con *H. curvispina* previamente reportados caracterizaron al sedimento de este sitio de muestreo como tóxico (IMM, 2011a), sin embargo, en el ensayo de toxicidad de 10 días de exposición realizado en este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia de esta muestra respecto al control. Esta diferencia en los resultados de sobrevivencia podría deberse a que los ensayos no fueron realizados en idénticas condiciones, por ejemplo en cuanto a la edad de los organismos, utilizándose juveniles de entre 7 y 14 días en los estudios reportados en IMM (2011a), mientras que en el ensayo realizado en este trabajo se utilizaron organismos de entre 20 y 26 días de edad, cuya sensibilidad probablemente sea menor. El uso de organismos de esta edad en los ensayos de sobrevivencia se justifica por ser la edad seleccionada para realizar los ensayos de turbidez. Peluso (2011) reportó que la sensibilidad de los juveniles de *H. curvispina* de hasta 15 días de edad a sedimentos adicionados con mercurio es dos veces menor que la de los organismos de entre 16 y 26 días de edad.

La zona oeste de Montevideo (PY) no cuenta con saneamiento actualmente y la descarga sin control de sus efluentes domésticos ha llevado a un progresivo deterioro de la calidad ambiental de dicha zona (Muniz et al., 2011). El contenido de cromo y plomo de la muestra de PY está por debajo del valor umbral de efecto, por lo cual no era esperable observar una diferencia en la generación de turbidez respecto al control. Este punto de muestreo se ha caracterizado como no tóxico en los estudios de toxicidad con *H. curvispina* previamente reportados, encontrándose toxicidad en el 50 % de los ensayos realizados (IMM, 2011a). Se ha reportado un valor de índice AMBI de 2,7 para la estación PY el cual corresponde a una comunidad bentónica desbalanceada, caracterizando al sitio como apenas perturbado y con un estado ecológico bueno (IMM, 2011b). El test de alimentación, como se venía observando en los resultados anteriores,

no detectó diferencias significativas en el consumo de alimento de los organismos expuestos a estas muestras, lo cual es esperable ya que para las muestras de alta contaminación mostró sensibilidad solamente en 1 de 2 muestras analizadas.

El test de turbidez detectó diferencias significativas en la distribución de los datos de L9 respecto al control. Los ensayos de toxicidad previamente reportados han clasificado al sedimento de este punto de muestreo como tóxico (IMM, 2011a), lo cual apoya la tendencia detectada tanto con el test de turbidez como con el test de alimentación. Este punto de muestreo según los estudios previos reportados, se clasifica como moderadamente perturbado según el índice AMBI y contiene valores de cromo y plomo por debajo de los valores umbral establecidos en las guías de calidad de sedimento referidas (IMM, 2011a, 2011b). No obstante, es limitado el conocimiento con que se cuenta a la fecha sobre los aportes de otros contaminantes que es esperable encontrar en esta zona, ya que recibe la descarga del arroyo Carrasco, el cual se caracteriza por tener una alta carga de residuos domésticos e industriales (IMM, 2011c). El significativo menor consumo de alimento de los organismos expuestos a sedimento de L9 respecto al consumo de los organismos control refuerza la hipótesis de que otros contaminantes no reportados estarían afectando a los organismos expuestos a la muestra problema.

5.5. Ensayos de evasión

Las respuestas de evasión a sedimentos contaminados fueron las de menor variabilidad y mayor sensibilidad de los 3 ensayos comportamentales analizados.

En las tres concentraciones de cobre analizadas se observó una respuesta de evasión al sedimento contaminado de entre el 59 y el 66 % de los organismos expuestos, a las 72 horas de exposición. Los resultados obtenidos concuerdan con los de los ensayos de turbidez, en que se observó un aumento de la turbidez en las exposiciones a 50 y 100 $\mu\text{g/g}$ de cobre. La exposición a 500 $\mu\text{g/g}$ de cobre no mostró un patrón de generación de turbidez significativamente diferente respecto al del control en 2 de tres ensayos, pero sí se observó una marcada respuesta de evasión a este sedimento. El hecho de que los organismos evadan el sedimento contaminado con 50 $\mu\text{gCu/g}$ evidencia que existe a esa concentración un grado de afectación que podría llevar a que en condiciones ambientales desaparezca esta especie en la zona contaminada. La respuesta de evasión al sedimento moderadamente contaminado se postula como una señal temprana de

potencial mortalidad ante la exposición a este sedimento (Kravitz et al., 1999). En el ambiente, la respuesta de evasión podría provocar, entre otros efectos, la desaparición de poblaciones en el largo plazo (Kravitz et al., 1999; Hellou et al., 2008; 2011). Hutton (2011) estableció un umbral de efecto del cobre para la zona costera de Montevideo de 38 $\mu\text{gCu/g}$, valor determinado del análisis de las comunidades bentónicas de la zona costera de Montevideo en relación a variables ambientales. Por lo tanto, el ensayo de evasión muestra para el cobre una interesante capacidad de detección de sedimentos que sin producir efectos letales, estarían afectando la salud de la biota a nivel subletal.

La evasión de *H. curvispina* observada al exponer estos organismos a una concentración de 0,5 $\mu\text{g fenantreno/g}$ de sedimento fue mayor al 80%. Esto es coincidente con estudios realizados por otros autores, en que más del 58 % de anfípodos expuestos a sedimentos contaminados con concentraciones similares de fenantreno prefirieron el sedimento control (Hellou et al., 2005). La exposición a sedimentos conteniendo una concentración 1 $\mu\text{g fenantreno/g}$ de sedimento (2 veces la concentración PEL) provocó una respuesta de evasión también significativa, pero del 59 %. Esta menor respuesta podría deberse a que los organismos expuestos han sufrido un daño que les impide reconocer el ambiente adverso o su actividad locomotora se ha visto dañada impidiendo la reacción de escape.

La muestra ensayada, B1, proveniente de la zona interna de la Bahía de Montevideo se caracteriza por una alta contaminación debida a metales e hidrocarburos. El hecho de que el 76% de los organismos expuestos evada el sedimento contaminado indica una concordancia buena con lo anteriormente reportado. Aunque la exposición de 72 horas al sedimento contaminado no produjo una mortalidad significativa en los anfípodos, en ensayos de sobrevivencia de 10 días de exposición previamente reportados en este punto de muestreo se obtuvo un 100 % de mortalidad (IMM, 2011a), lo cual estaría apoyando la predicción formulada de que el ensayo de evasión es un indicador temprano de toxicidad de sedimentos.

6. Conclusiones

1. Los protocolos de los nuevos ensayos de turbidez, alimentación y evasión con *H. curvispina* fueron ajustados para su uso en el laboratorio.

2. *H. curvispina* es un organismo que produce bioturbación en el sedimento y la respuesta de cambio en la turbidez a lo largo del tiempo refleja la presencia de cobre en concentraciones por encima del umbral de efecto.
3. El test de turbidez puede ser una herramienta sensible para la detección de toxicidad de sedimentos, resultando más sensible a la contaminación por cobre que por fenantreno.
4. En los sedimentos adicionados con fenantreno no se pudo detectar efectos ni con el test de turbidez ni con el test de alimentación.
5. La aplicación de estos ensayos en sedimentos de la costa de Montevideo conciden con las concentraciones de contaminantes previamente reportadas para el área y apoyan la caracterización previa de los mismos con *proxies* a escala comunitaria (por ejemplo, el índice AMBI).
6. El número de réplicas utilizado en los ensayos de turbidez y de alimentación fue bajo, y la variabilidad en las respuestas fue muy alta, por lo cual la potencia de estos ensayos fue concomitantemente baja en general. Sin embargo, se detectaron tendencias que permitirán poner en marcha una batería de ensayos comportamentales con capacidad de detección de señales de alerta temprana de toxicidad de sedimentos.
7. El ensayo de evasión demostró ser una herramienta útil y fácilmente aplicable para el monitoreo de sedimentos. La baja infraestructura requerida, la alta sensibilidad obtenida y la practicidad de su implementación lo postulan como un ensayo a tener en cuenta en futuras evaluaciones de toxicidad de sedimentos.

Como perspectivas de este trabajo de tesis se plantea probar el desempeño de los ensayos con sedimentos adicionados con otros contaminantes de relevancia ambiental, en un rango de concentraciones más amplio y en sedimentos naturales provenientes de otras zonas de moderado impacto antrópico. Asimismo, para establecer con claridad la

conexión entre las concentraciones de contaminantes en los organismos y las respuestas biológicas adversas, estas respuestas comportamentales analizadas deberían ser combinadas con el análisis de los residuos corporales de los contaminantes en los organismos (McCarty & Mackay, 1993). Determinar las concentraciones de contaminantes en los organismos expuestos permitirá evitar los problemas relacionados con la biodisponibilidad y la capacidad de captación de contaminantes de las matrices testeadas. Las limitaciones de este enfoque tales como la ruptura y/o activación metabólica de los contaminantes, diferencias en el contenido lipídico de los organismos, formación de complejos con metalotioneínas, entre otros, podrían subsanarse combinando con estos análisis la determinación de marcadores moleculares de exposición.

7-Bibliografía

Adger, W.N., Hughes, T.P., Folke, C., Carpenter, S.R. & Rockström, J. 2005. Social-ecological resilience to coastal disasters. *Science* 309: 1036-1039.

Allen, Y.T., S.J. Kirby, J. Reed & J.E. Thain 2006. Development and application of chronic and sublethal sediment bioassays. Disponible en : <http://www.cefas.co.uk/>

Alonso, A., De Lange, H.J. & Peeters, E.T.H.M. 2009. Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor. *Chemosphere* 75: 341-346.

Amiard-Triquet, C. 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Human and Ecological Risk Assessment* 15: 87-110.

Amorim, M.J., Novais, S., Römbke, J. & Soares, A. 2008. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in standardized avoidance test? Effects of different chemical substances. *Environment International* 34: 363-371.

Anderson, G.L, Cole, R.D. & Williams, P.L. 2004. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol. 23:5: 1235-1240.

ASTM (American Society for Testing and Materials) E 1391-03. Reapproved 2008. Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates.

Babich, H & Stotzky, G. 1977. Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 33:3: 696-705.

- Babich, H & Stotzky, G. 1979. Abiotic factors affecting the toxicity of lead to Fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 38:3: 506-513.
- Ball, D. F. 1964. Loss-on-ignition as an estimate of organic matter and organic carbon in non-calcareous soils. *Journal of Soil Science* 15: 84-92.
- Barnes R.D., 1989. *Zoología de los Invertebrados*. 5ta ed. 567 pp.
- Bartsch, M.L., Cope, W.G. & Rada, R.G. 1999. Effect of cadmium-spiked sediment on cadmium accumulation and bioturbation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia bilineata*. *Water, Air and Soil Pollution* 109: 277-292.
- Bay, S.M. & D.J. Greenstein. 1989. Influence of sediment type on phenanthrene toxicity. pp. 62-65 *in*: P.M. Konrad (ed.), *Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1988-1989*. Long Beach, CA.
- Bitton, G., Rhodes, K. & Koopman, B. 1996. Ceriofast: an acute toxicity test based on *Ceriodaphnia dubia* feeding activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15:2: 123-125.
- Borgmann, U., Couillard, Y., Doyle, P. & Dixon, D.G. 2005. Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyaella azteca* at two levels of water hardness. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 3: 641-652.
- Borja, A; Muxika, I & Franco, F. 2003. The application of a marine Biotic Index to different impact sources affecting soft-bottom benthic communities along European coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 835-845.
- Bouvier, M.E., Pérez, A. & Muniz, P. enviado. A simple home-made-turbidimeter (HMT) for turbidity measurements in sub-lethal test for the assessment of environmental quality in coastal waters.
- Briggs A.D., Greenwood N. & Grant A. 2003. Can turbidity caused by *Corophium volutator* (Pallas) activity be used to assess sediment toxicity rapidly?. *Marine Environmental Research* 55: 181-192.
- Brooks, S.J. & Mills, C.L. 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135: 527-537.
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Seitz, F., Newman, M.C. & Schulz, R. 2011. Mercury-contaminated sediments affect amphipod feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60:437-443.
- Burton G.A., Baudo R., Beltrami M. & Rowland C. 2001. Assessing sediment contamination using six toxicity assays. *Journal of Limnology* 60: 263-267.
- Byers, S.C., Mills, E.L. & Stewart, P.L., 1978. A comparison of methods determining organic carbon in marine sediments, with suggestions for a standard method. *Hydrobiologia* 58: 43-47.
- Calabrese, E.J. & Baldwin, L. 1998. Hormesis as a Biological Hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 106: 1: 357-362.

Calabrese, E.J. & Baldwin, L. 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology* 21: 91-97.

Calabrese, E.J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 7: 1451-1474.

Casset M.A., Momo F.R., & 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.

Castillo Morales, G (Ed). 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Disponible en: <http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/26391/106/120928.pdf>.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), 1999. Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life, Environmental Quality Guidelines. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. Disponible en <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/>.

Centurión, V. 2011. Influencia de agentes naturales y antropogénicos en la Bahía de Montevideo y su zona costera adyacente en base a asociaciones y tafonomía de foraminíferos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Udelar, 117p.

Chapman P.M. & Wang F. 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol.20: 3-22.

Chapman P.M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 44: 7-15.

Cho E. 2005. Bioturbation as a novel method to characterize the toxicity of aquatic sediment. PhD. Thesis. Disponible en: <http://www.lib.ncsu.edu/theses/available/etd-02282005-111535/unrestricted/etd.pdf>.

Cocka, E. & Birand, A. 1993. Determination of Cation Exchange Capacity of clayey soils by the Methylene Blue Test. *Geotechnical Testing Journal* 16: 4: 518-524.

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*. *The Science of the Total Environment* 247: 99-106.

Correia, A.D., Costa, F.O., Neuparth, T., Diniz, M.E. & Costa, M.H. 2001. Sub-lethal effects of copper-spiked sediments on the marine amphipod *Gammarus locusta*: evidence of hormesis? *Ecotoxicology and Environmental Restoration* 4:2: 32-38.

Damelin, L.H., Vokes, S., Whitcutt, J.M. & Damelin, S.B., Alexander, J.J. 2009. Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. *Human & Experimental Toxicology* 19: 420-430.

Danulat E., Muniz P., García-Alonso J. & Yannicelli B. 2002. First assessment of the highly contaminated harbour of Montevideo, Uruguay. *Marine Pollution Bulletin* 44: 551-576.

- Davoren, M., Shúilleabháin S.N., Halloran J.O., Hartl M.G.J., Sheehan D., O'Brien N.M., Van Pelt F. & Mothersill C. 2005 A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, 14: 741-755.
- Deaver, E. & Rodgers, J.H. 1996. Measuring bioavailable copper using anodic stripping voltammetry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 11: 1925-1930.
- Delgado, L., Guerao, G. & Ribera, C. 2011. Effects of different salinities on juvenile growth of *Gammarus aequicauda* (Malacostraca: Amphipoda). *International Journal of Zoology* Vol 2011 Article ID 248790, 6p.
- De Jonge, M., Blust, R. & Bervoets, L. 2010. The relation between Acid Volatile Sulfides (AVS) and metal accumulation in aquatic invertebrates: Implications of feeding behavior and ecology. *Environmental Pollution* 158: 5: 1381-1391.
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M.E., Alberdi, J.L. & Tortorelli, M.C. 1999. Assessment of the toxicity of stabilized sludges using *Hyalella curvispina* (Amphipod) bioassays. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63: 654-659.
- Di Marzio, W. & Saenz, M. E. (2006), QSARs for aromatic hydrocarbons at several trophic levels. *Environmental Toxicology*, 21: 118–124.
- Di Marzio, W.D., Saenz, M. E, Alberdi, J.L., Fortunato, N., Capello, V., Montivero, C. & Ambrini, G. 2010. Environmental impact of insecticides applied on biotech soybean crops in relation to the distance from aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29:9: 1907–1917.
- Dornfeld, C.B., Moreira-Santos, M., Espíndola, E. & Ribeiro, R. 2009. Do larvae and ovipositing *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) females avoid copper-contaminated environments?. *Human and Ecological Risk Assessment* 15: 63-75.
- Eggleton, J. & Thomas, K. 2004. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* 30: 973-980.
- EPS 1/RM/33, 1997. Environmental Protection Series. Biological Test Method: Test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Environment Canada.
- Eriksson, A.K., Borjesson T. & Wiklund S.J. 2006. Avoidance response of sediment living amphipods to zinc pyrithione as a measure of sediment toxicity. *Marine Pollution Bulletin* 52: 96-99.
- FREPLATA, 2004. Proyecto “Protección Ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo: Prevención y Control de la contaminación y restauración de Hábitats”. Informe Final.
- FREPLATA, 2001. Catálogo ilustrado de los organismos zoobentónicos colectados en la campaña de prospección ambiental del Río de la Plata.
- Galassi, M.E., Franceschini, M.C. & Neiff, A.P. 2005. Population estimates of *Hyalella curvispina* Shoemaker (Amphipoda) in aquatic vegetation of northeastern argentinian ponds. *Acta Limnol. Bras.*, 18: 1 : 101-108.

García, M.E., Rodríguez-Capítulo, A. & Ferrari, L. 2010. Age-related differential sensitivity to cadmium in *Hyaella curvispina* (Amphipoda) and implications in ecotoxicity studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 771–778.

García-Rodríguez, F., Hutton, M., Brugnoli, E., Venturini, N., Del Puerto, L., Inda, H., Bracco, R., Burone, L. & Muniz, P. 2010. Assessing the effect of natural variability and human impacts on the environmental quality of a coastal metropolitan area (Montevideo Bay, Uruguay). *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 5: 1: 91-100.

Gerhardt, A. 2007. Aquatic behavioral ecotoxicology- prospects and limitations. *Human and Ecological Risk Assessment* 13: 3, 481- 491.

Giorgi A. & Tiraboschi B. 1999. Evaluación experimental del efecto de dos grupos de macroinvertebrados (anfípodos y gasterópodos) sobre algas epífitas. *Ecología Austral* 9: 35-44.

Giusto, A. & Ferrari, L. 2008. Copper toxicity on juveniles of *Hyaella pseudoazteca* (González and Watling, 2003). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 81: 169-173.

Giusto, A., Somma, L.A. & Ferrari, L. 2012. Cadmium toxicity assessment in juveniles of the Austral South America amphipod *Hyaella curvispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79: 163-169.

González E. 2003. The freshwater amphipods *Hyaella* Smith, 1874 in Chile (Crustacea:Amphipoda). *Revista Chilena de Historia Natural* 76: 623-637.

García, M.E., Rodríguez Capítulo, A. & Ferrari, L. 2012. Age differential response of *Hyaella curvispina* to a cadmium pulse: Influence of sediment particle size. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 314-320.

Graça M., Rodríguez-Capítulo A., Ocón C. & Gómez N. 2002. In situ tests for water quality assessment: a case study in Pampean rivers. *Water Research* 36: 4033-4040.

Hellou, J., Cheeseman, K., Jouvenelle, M.L. & Robertson, S. 2005. Behavioral response of *Corophium volutator* relative to experimental conditions, physical and chemical disturbances. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 12: 3061-3068.

Hellou, J., Cheeseman, K., Desnoyers, E., Johnston, D., Jouvenelle, M.L., Leonard, J., Robertson, S. & Walker, P. 2008. A non-lethal chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. *Science of the Total Environment* 389: 178-187.

Hellou, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 1-11.

Hamilton, M.A., Russo, R.C. & Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology* 11: 714-719.

Hansen, J.A., Marr, J.C.A., Lipton, J., Cacula, D. & Bergmann H.L. 1999. Differences in neurobehavioral responses of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper and cobalt: behavioral avoidance. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 9: 1972-1978.

Hutchins, C.M., Teasdale, P.R., Lee, S.H. & Simpson, S.L. 2008. The influence of small-scale circum-neutral pH change on Cu-bioavailability and toxicity to an estuarine bivalve (*Austriella cf. plicifera*) in whole-sediment toxicity tests. *Science of the total environment* 405: 87-95.

Hutton, M. Evaluación del estado de calidad ambiental en la costa de Montevideo. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Udelar, 79p.

IMM (Intendencia Municipal de Montevideo), 2011a. Estudio de la calidad de agua, sedimento y biota del Río de la Plata. Evaluación de línea de base. Disponible en: <http://www.montevideo.gub.uy/ciudadania/desarrolloambiental/documentos>

IMM (Intendencia Municipal de Montevideo), 2011b. Monitoreo de biota y sedimento de la zona costera de Montevideo. Informe final de primera etapa. Sección Oceanografía y Ecología Marina. UdelaR. Datos no publicados.

IMM (Intendencia Municipal de Montevideo), 2011c. Programa de monitoreo de cursos de agua de Montevideo. Informe anual 2011. Disponible en: <http://www.montevideo.gub.uy/ciudadania/desarrolloambiental/documentos>

Ingersoll, C.G., 1995. Sediment toxicity tests. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G.M. (Ed.) 2nd ed. Taylor and Francis, Washington, DC: 231-256.

Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C. & Schulz R. 2004. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59: 133-141.

Kaschl, A. & Carballeira, A., 1999. Behavioural responses of *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) and *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) to copper spiked marine sediments. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 15: 383-394.

Kravitz, M.J., Lamberson, J.O., Ferraro, S.P., Swartz, R.C., Boese, B.L. & Specht, D.T. 1999. Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* to polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated, field-collected sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 6: 1232-1235.

Krieger, J. & Breer, H. 1999. Olfactory reception in invertebrates. *Science* 286: 5440: 720-723.

Lee, C.M. & Petersen, C.H. 2003. Effects of developmental acclimation on adult salinity tolerance in the freshwater-invading copepod *Eurytemora affinis*. *Physiological and Biochemical Zoology* 76: 3: 296-301.

Levinton, J.S. 1982. *Marine Ecology*. Prentice Hall, Englewood. 526 pp.

Libes, S.M. 1992. *An introduction to marine biogeochemistry*. Wiley J (ed). 734 pp.

Lotufo, G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research* 44: 2: 149-166.

Lotufo, G.R. & Fleeger, J.W. 1997. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Marine Ecology Progress Series* 151: 91-102.

- Luoma, S.N. 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements ? *Hydrobiologia* 176/177 : 379-396.
- Luoma, S.N. & Ho, K.T., 1993. Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In: *Handbook of Ecotoxicology*, Vol.1. Calow, P. (Ed.) 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 193-226.
- McCarty, L.S., & D. Mackay. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environ. Sci. Tech.* 27:1719-1728.
- Miguez, D., Seoane, I., Carrara, M.V., Carnikian, A., Keel, K., Aizpún, A., **Bouvier, M.E.** & Cartmell, E. 2010. Evaluación ecotoxicológica de sedimentos en una zona del Río Uruguay, con puntos finales indicadores de toxicidad aguda, subletal, crónica, reproductiva y teratogénica. *Innotec* 5: 3-9
- Míguez, D.M., Huertas, R., Carrara, M.V., Carnikián, A., **Bouvier, M.E.**, Martínez, M.J., Keel, K., Pioda, C., Darré, E., Pérez, R., Viera, S., & Massa, E.. Bioavailability, ecotoxicity and geological characteristics of trace lead in sediments from two sites on Negro River, Uruguay, South America. 2011. *Environmental Geochemistry and Health* 34: 2: 199-205.
- Moresco, H. & Dol, I. 1996. Metales en sedimentos de la Bahía de Montevideo. *Revista Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* 27: 1-5.
- Morillo-Velarde, P.S., Lloret, J., Marín, A. & Sánchez-Vázquez, F.J. Effects of Cadmium on locomotor activity rhythms of the amphipod *Gammarus aequicauda*. 2011. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 444-451.
- Moyano, M., Moresco, H., Blanco, J., Rosadilla, M. & Caballero, A., 1993. Baseline studies of coastal pollution by heavy metals, oil and PAHs in Montevideo. *Marine Pollution Bulletin* 26: 461-464
- Muniz, P., Gómez, M., Lacerot, G., Martínez, A., Rodríguez, M. & Venturini, N. 2000. Contaminación en la zona costera del departamento de Montevideo a través del estudio de las poblaciones planctónicas y bentónicas: su relación con los parámetros físico-químicos y sedimentológicos de la región. Final report. (unpublished). Sección Oceanografía, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
- Muniz P., Venturini N. & Martínez A. 2002. Physico-chemical characteristics and pollutants of the benthic environment in the Montevideo coastal zone, Uruguay. *Marine Pollution Bulletin* 44: 956-976.
- Muniz P., Danulat E., Yannicelli B., García-Alonso J., Medina G. & Bicego M. 2004. Assessment of contamination by heavy metals and petroleum hydrocarbons in sediments of Montevideo Harbour (Uruguay). *Environment International* 29: 1019-1028.
- Muniz, P., Venturini, N. & Burone, L., 2006. Contaminación en la Bahía de Montevideo y zona costera adyacente y su relación con los organismos bentónicos. In: Menafrá, R.,
- Rodríguez, L., Scarabino, F. & Conde, D. (Eds.), *Bases para la conservación y manejo de la costa uruguaya*. Vida Silvestre, Montevideo, pp. 467-476.

Muniz, P., Venturini, N., Hutton, M., Kandratavicius, N., Pita, A., Brugnoli, E., Burone, L. & García-Rodríguez, F. 2011. Ecosystem health of Montevideo coastal zone: A multi approach using some different benthic indicators to improve a ten-year-ago assessment. *Journal of Sea Research* 65: 38-50.

Nebeker, A.L. & Miller, C.E. 1988. Use of the amphipod crustacean *Hyaella azteca* in freshwater and estuarine sediment toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 7: 12: 1027-1033.

NOAA. 1999. Screening Quick Reference Tables. Hazmat Report 99-1. Washington, NOAA, 12p.

Norum, U., Frederiksen, M. & Bjerregaard, P. 2011. Locomotory behaviour in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to the pyrethroid cypermethrin. *Chemistry and Ecology* 1-9.

NRC (National Research Council). 1985. Oil in the sea, inputs, fates and effects. Washington. D.C., National Academy Press. 602p.

Oakden, J.M., Oliver, J.S. & Flegal, A.R. 1984. Behavioral responses of phoxocephalid amphipod to organic enrichment and trace metals in sediment. *Marine Ecology-Progress Series* 14: 253-257.

Odum, E.P. 1971. Fundamentals of ecology, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia, PA, USA 547pp.

Organización de las Naciones para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 2007. Disponible en: <http://www.fao.org/FOCUS/S/fisheries/icam.htm>

Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A.E., Jüttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R.R., Crossland, N.O., Mitchell, G.C., Pearson, N., Tattersfield, L., Play, J.P., Peither, A., Neumeier, B. & A.R. Velletti. 2000. The development of toxicity test for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Research* 33: 8: 2323-2329.

Peluso, M.L. 2011. Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata. 178p.

Peluso, L., Giusto, A., Bulus Rosini, G.D., Ferrari, L., Salibián, A. & Ronco, A.E., 2011. *Hyaella curvispina* (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Environmental Bulletin* 20: 2: 372-376.

Phelps, H.L., Hardy, J.T., Pearson, W.H. & Apts, C.W. 1983. Clam burrowing behavior: Inhibition by copper- enriched sediment. *Marine Pollution Bulletin* 14:12: 452-455.

Phipps, G.L, Mattson, V.R. & Ankley, G.T. 1995. Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28: 281-286.

- Poi de Neff A. & Carignan R. 1997. Macroinvertebrates on *Eichhornia crassipes* roots in two lakes of the Paraná river floodplain. *Hydrobiología* 345: 185-196.
- Poretti T. I., Casset M.A., & Momo F. 2003. Composición y dinámica poblacional de *Hyaella curvispina* en el arroyo Las Flores (Cuenca del río Luján). *Biología Acuática*: 20.
- Pyle, G.G. & Mirza, R.S., 2007. Copper-Impaired chemosensory function and behavior in aquatic animals. *Human and Ecological Risk Assessment* 13: 492-505.
- Rand, G.M., Wells, P.G. & Mc Carthy, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 2nd ed. Taylor and Francis, Washington, DC: 3-67.
- Readman, J. W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve J.-P., Catinni C. & Mee L. D. 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea . *Marine Pollution Bulletin* 44:48-62.
- Reynoldson, T.B. & Day, K.E., 1993. Freshwater sediments. In: Calow, P. (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*, Vol.1, 1st ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford: 83-100.
- Saigo, M., Marchese, M. & Montalto, L. 2009. Hábitos alimentarios de *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 (Amphipoda: Gammaridea) en ambientes lénticos de la llanura aluvial del Río Paraná medio. *Natura Neotropicalis* 40: 1y2: 43-59.
- Sardo, A.M. & Soares, A.M.V.M. 2010. Assessments of the effects of the pesticide Imidacloprid on the behavior of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58:648-656.
- Somma, A.; Giusto, A. & Ferrari, L. 2011. Manual de producción de *Hyaella curvispina* en laboratorio. 1a ed. - Ushuaia : Utopías, 2011.25p.
- Stebbing, A.R.D.1982. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment* 22: 213-234.
- Stebbing, A.R.D.2003. Adaptive responses account for the β curve –hormesis is linked to acquired tolerance. *Non linearity in Biology, Toxicology and Medicine.* 1: 493-511.
- Suedel, B.C., Deaver, E. & Rodgers, J.H. 1996. Experimental factors that may affect toxicity of aqueous and sediment-bound copper to freshwater organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 30: 40-46.
- Sugio, K. 1973. *Introdução à sedimentologia*. São Paulo, Edgard Blucher/ EDUSP. 317 p.
- UNEP (United Environment Programme), 1991. Determinations of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference methods for marine pollution studies.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1980. Ambient water quality criteria for copper. EPA/440/5-84-031 NTIS, Springfield, VA. 170p.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1994. Methods for the assessing of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/R-94/025. Office of Water, Office of Science and Technology. 140p.

USEPA (United States Environmental Protection Agency), 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 2nd edition EPA/600/R-99/064. Office of Water, Office of Science and Technology. 192p.

UTHSCSA Image Tool. desarrollado por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas. Disponible en <ftp://maxrad6.uthscsa.edu>.

Venturini N., Muniz P. & Rodríguez M. 2004. Macrobenthic subtidal communities in relation to sediment pollution: the phylum-level meta-analysis approach in a south-eastern coastal region of South America. *Marine Biology* 144: 119-126.

Venturini, N., Pita, A.L., Brugnoli, E., García-Rodríguez, F., Burone, L., Kandratavicius, N., Hutton, M. & Muniz, P. 2012. Benthic trophic status of sediments in a metropolitan area (Río de la Plata estuary): Linkages with natural and human pressures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 112: 139-152.

Venturino, A., Montagna, C.M. & Pechen de D'Àngelo, A.M. 2007. Risk assessment of Magnacide -H herbicide at Río Colorado irrigation channels (Argentina). Tier 3: studies on native species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1: 177-182.

Verrhiest, G., Clement, B. & Blake, G. 2001. Single and combined toxicity of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology* 10: 363-372.

West, C.W., Mattson, V.R., Leonard, E.N., Phipps, G.L. & Ankley, G.T. 1993. Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiologia* 262:57-63.

Writer, J. H., Leenheer, J. A., Barber, L. B., Amy, G. L. & Chapra, S. C. 1995. Sewage contamination in the upper Mississippi River as measured by fecal sterol, coprostanol. *Water Research* 29:1427-1436.

Yan, Z.S, Hu, Y. & Jiang, H.L. 2011. Toxicity of phenanthrene in freshwater sediments to the rooted submersed macrophyte, *Vallisneria spiralis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87: 129-133.

Zala, S & Penn, D. 2004. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. *Animal behavior* 68: 649-664.

ANEXOS

Anexo I: Condiciones de cultivo

El sistema de cultivo se realizó de acuerdo a lo establecido en Somma et al. (2011). El crecimiento de los organismos testeados se determinó mediante la medida de su longitud, definida como el largo desde la base de la primera antena hasta la base del urópodo 1. Las medidas se realizaron digitalmente con el programa UTHSCSA Image Tool.

Temperatura	21±2 °C
Fotoperíodo	16: 8 h luz:oscuridad
Iluminación	400-1000 lux
Agua de cultivo	Agua mineral diluida con agua destilada hasta alcanzar conductividad de 400-500 µS/cm, salinidad=0,2, dureza=90-100 mgCaCO ₃ /l, alcalinidad=110-120 mgCaCO ₃ /l, pH 7-8.
Alimentación	Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>), suspensión de levadura (<i>Saccharomices cerevisiae</i>) (5g/l) y alimento para peces, ad libitum.

Anexo II: Ensayos de sobrevivencia y crecimiento en sedimentos- Condiciones de ensayo

Se controló que el oxígeno disuelto en el agua sobrenadante esté por encima del 80 % de saturación (oxímetro YSI modelo 58) y que el pH se mantuviera entre 7-8 (multiparámetro YSI, modelo 63).

Tiempo de exposición	10 días
Punto final	Sobrevivencia y crecimiento (como longitud)
Aceptabilidad	80 % de sobrevivencia en controles negativos
Tipo de exposición	Estática, con aireación
Tipo y volumen de los vasos utilizados para el test	Vasos de polipropileno de primer uso, de 400ml
Volumen de sedimento por vaso	100 ml
Volumen de agua sobrenadante	175 ml
Características del agua sobrenadante	Agua mineral diluida con agua destilada hasta alcanzar conductividad de 400-420 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (medio de cultivo)
Número de organismos por vaso	10
Número de réplicas por muestra analizada	5
Edad de los organismos	9-25 días
Frecuencia, volumen y tipo de alimentación	Día 1 y Día 5, 500 μl /vaso de una mezcla de volúmenes iguales de suspensión de levadura (<i>Saccharomices cerevisiae</i>) (5g/l) + suspensión de microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> de 10^6 células por ml.
Iluminación	400 lux
Fotoperíodo	16h luz / 8h oscuridad
Temperatura	21 \pm 2°C

Anexo III: Ensayos de toxicidad en matriz acuosa- Condiciones de ensayo

Se controló que el oxígeno disuelto en el agua sobrenadante esté por encima del 80 % de saturación (oxímetro YSI modelo 58) y que el pH se mantuviera entre 7-8 (multiparámetro YSI modelo 63).

Tiempo de exposición	96 horas y 240 horas (10 días)
Punto final	Sobrevivencia
Tipo de exposición	Estática, sin aireación
Aceptabilidad	80 % de sobrevivencia en controles negativos
Tipo y volumen de los vasos utilizados para el test	Vasos de vidrio de 300 ml
Volumen de solución testeada	200 ml
Agua de dilución y Control	Agua mineral diluida con agua destilada hasta alcanzar conductividad de 400-420 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (medio de cultivo, salinidad=0,2, dureza aproximada= 90 mgCaCO_3/l)
Número de organismos por vaso	10
Número de réplicas por muestra analizada	4 o 5
Frecuencia, volumen y tipo de alimentación	Los días 2, 4 y 8, 500 μl /vaso de una mezcla de volúmenes iguales de suspensión de <i>Saccharomices cerevisiae</i> (5g/l) + suspensión de microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> de 10 ⁶ células por ml.
Iluminación	400 lux
Fotoperíodo	16h luz / 8h oscuridad
Temperatura	21 \pm 2°C

Anexo IV: Artículo enviado a la revista *Brazilian Journal of Oceanography* (se encuentra en revisión).

Title: A simple home-made-turbidimeter (HMT) for turbidity measurements in sub-lethal test for the assessment of environmental quality in coastal waters

Running title: Turbidimeter for ecotoxicological tests

Authors: María Elena Bouvier¹, Alberto Pérez² and Pablo Muniz^{1*}

1- Oceanografía y Ecología Marina, IECA, Facultad de Ciencias, UdelaR. Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

2- Servicio de Microscopia, Facultad de Ciencias, UdelaR

* - pmmaci@fcien.edu.uy

Turbidity is a measure of the clarity of water that has been used as indicator of the environmental health of water bodies (GIPPEL, 1989). This physical property of water is caused mainly by the presence of suspended solids, such as silt, clay, organic matter, plankton, microorganisms and colored substances that produce the incident light to be scattered and absorbed instead of transmitted through the water sample (SADAR, 1996; USEPA, 1999). It has been used as a surrogate measure of suspended solids in water analyses, in monitoring programs of water quality (LEWIS, 1996; SADAR, 1996; ORWIN; SMART, 2005). A detailed description of the principles of turbidity measurement and instrument designs could be found in SADAR (1996).

As ecological factor, its role is fundamental, affecting many aspects of the trophic webs at different levels: it affects the availability of light and the capability of been suspended in the water column for primary producers, the encounter rates between preys and predators, modifies behavioral responses of preys to control the risk of predation and induces changes in the diet of some piscivorous fishes (DAVIES-COLLEY; SMITH, 2001; ABRAHAMS; KATTENFELD, 2007; CARTER et al., 2010).

Bioturbation (activity of benthic organisms modifying the sediment structure) measured as turbidity generation has been postulated as a sensitive endpoint in studies of sub-lethal responses to assess the toxicity of aquatic sediments (BARSCH et al., 1999; BRIGGS et al., 2003; CHO, 2005). Tests that measure sub-lethal responses allow

detecting effects on biota at low concentrations of contaminants (RAND et al., 1995). These effects, without being lethal in the short term can lead to ecological changes that affect long-term capacity of organism's survival. They are useful in the analysis of areas with moderate to severe pollution (BRIGGS et al., 2003; ALLEN et al., 2006). When relatively uncontaminated sediments are spiked with a gradient of concentrations of cadmium, copper or PAHs, the turbidity generated by the activity of the organisms exposed to this spiked sediments responded in a concentration-dependent manner (BARSCH et al., 1999; BRIGGS et al., 2003; CHO, 2005). Then, organisms affected by the concentrations of contaminants added to the sediments respond modifying its activity pattern. In applying this type of tests, BRIGGS et al., 2003 using a turbidity measuring equipment of simple construction and inexpensive, with amphipods *Corophium volutator* (Pallas), detected quickly those sediments which will require further analysis to determine the cause of their potential toxicity.

Nevertheless, the use of turbidity as end point in toxicity test presents some difficulties, such as the grain size can be a confounding factor on its applicability (BRIGGS et al., 2003; CHO, 2005). Sand particles sink faster than smaller ones such as silt or clay, and this physical property of sediment can affect the generation of turbidity by the organisms and therefore the objective of the test, that is to detect sub-lethal toxicity in the target sediment. The development of this test also requires determining the number of organisms present per experimental unit, since different organism densities could imply different responses and consequently different turbidity results.

In the present work we present a simple device constructed to adjust this sub-lethal test to specimens of *Hyaella curvispina* (Shoemaker), an indigenous amphipod of Argentina, Brazil and Uruguay (GONZALEZ, 2003; JERGENTZ et al., 2004; GRAÇA et al., 2002). The main objective of this study is to present the Home Made Turbidimeter (HMT) and to test its suitability applied in a turbidity sub-lethal test and by analyzing a series of solutions of known turbidity with this instrument determine its performance.

The design of the HMT is illustrated and the principle of its functioning is presented. It was made of wood covered with black paper. It consists (Fig. 1) of a rectangular prism without a base, which has two holes in opposite sides where the lamp (Radium RJLS 2012 SP, 12V, 20W, 10 °, color temperature 3000 K) and the photoresistor (CdS Photoconductive cells GL5549) were mounted. The photoresistor was placed at 180° from the incident light, and connected to an AVR Butterfly board from Atmel Corporation that measured the amount of light absorbed by the samples.

To quantify the linearity and precision of the instrument, we analyzed a series of formazine solutions. The standard formazine and the calibration curve were prepared according to USEPA Method 180.1. We analyzed two calibration curves: 0-40 FAU (Formazine attenuation units) and 0-200 FAU. The background signal was determined by measuring a sample of distilled water.

Amphipods (*H. curvispina*) were cultured according to Method 100.1 of the Environmental Protection Agency United States (USEPA 600/R-99/064) adapted to the species *Hyaella curvispina*. The age of the organisms exposed was 20-25 days old because in previous experiments we determined that organisms of this age were the youngest that could bioturbate the sediment and produce a response that could be measured with the HMT.

Test sediments were collected from two areas from the coastal zone of Uruguay, South America: the silt-clay sediment from the center zone of the Río de la Plata estuary in Montevideo city coast and the sandy sediment from the Cabo Polonio beach. The sediment was separated in different size fractions by wet sieving. After separated, the size fractions were oven-dried at temperature < 40°C. We composed five sediments categories according their granulometric fractions on a dry weight basis. The sediments were: 100% fine sand (FS) (125 to 64 µm grain size), 100% silt and clay (SC) (grain size < 64 µm), 75% FS-25% SC, 50% FS-50% SC, 25% FS-75% SC .

Tests were conducted in glass beakers of 400 ml containing approximately 100 ml of sediment covered by 270 ml of culture water. After the addition of sediment and water,

beakers were maintained in test conditions for 48 hours prior to the animal additions. Test beakers were gently aerated by using air tubes after 24 hours of the addition of sediment and culture water. To test the effect of varying animal number on turbidity, for each type of sediment we stocked 0, 10, 15 and 20 organisms/test beaker, and we conducted five replicates for each density of organisms. Turbidity measurements were taken before and after the addition of animals at 3, 8, 24, 32 and 48 hours of exposition. The results were compared by ANOVA when the data met the assumptions of homoscedasticity and normality, otherwise were analyzed with non-parametric test Kruskal-Wallis.

At the end, immediately following turbidity measurements, a 50 ml of overlying water sample was collected from each of the beakers and filtered through a pre-weighed 0.45 mm filter paper (Whatman GF/C). The filter papers were then oven-dried at 105 °C and reweighed to estimate the amount of sediment suspended in the water. Suspended sediment values were compared to turbidity by simple linear regressions.

The 0-40 and 0-200 FAU calibration curves demonstrated a good linear correlation ($r=0.9277$ and 0.9889 , respectively) between the concentration of formazine and the turbidity measurements, as shown in figure 2. The results indicated that the instrument can be used to determine the turbidity, with better performance in the range of values above 40 FAU. Characterization of the instrument included the determination of the background signal that was made by the analysis of the turbidity of distilled water with the HMT, demonstrating a good repeatability, with the mean turbidity=151 mV, ($n=32$) and the standard deviation of the measures always less than 5%.

For all the sediments categories analyzed excepting the 100% FS, the mean turbidity in the control beakers without organisms was lower ($n=5$, ANOVA, $p<0.05$) than the turbidity measured in the beakers with 10, 15 and 20 organisms since 8 hours of exposition. The presence of the animals in the beakers generates a turbidity increment on the overlying water, then we can concluded that *H. curvispina* is a bioturbator of fine sediments. The grain size of the 100% FS sediment would be too big to be resuspended by these organisms. Furthermore, as stated by GIPPEL (1989), the visible light source

makes the turbidimeters more sensitive to scattering from fine particles. For these reasons, the turbidity in the beakers containing fine sand and 10, 15 and 20 organisms was minimal and not significantly different than those of the treatment without organisms. Therefore we can conclude that the test (as designed here) is not suitable for analyzing sediment of grain sizes 100% greater than or equal to fine sand.

The maximum turbidity value was determined in the treatment with 20 organisms and the 25% FS - 75 % SC sediment category (Fig. 3). Turbidity measured in this test did not differ significantly from that measured in the 100% SC sediment category. The number of organisms selected for standardize the test was 20 organisms/beaker, because this was the number of organisms that generated a response on turbidity that was: the biggest, less variable and capable of been statistically detected from initial measures. This is in concordance with the results of BRIGGS et al. (2003), who selected 20 organisms as the adequate number of animals/beaker for the turbidity test with *Corophium volutator*.

Significant relationships between turbidity measured at 48 h of exposure and the total suspended solids concentration (TSS) for the sediments 100%SC ($r=0.9484$, $p<0.01$), 75%FS-25%SC ($r=0.9842$, $p<0.01$), 50%FS-50%SC ($r=0.9432$, $p<0.01$) and 25%FS-75%SC ($r=0.9479$, $p<0.01$) were found (Fig. 4). A correlation coefficient between turbidity measurements and TSS of 0.9 or greater, indicates, according to SADAR (1996) a workable relationship. BRIGGS et al. (2003) presented their results as a percentage of obscuration; make it difficult to compare their data with those generated in the present study. In addition, the output of its photovoltaic cell is inversely related to turbidity, requiring the transformation of their readings to percent of obscuration. In our instrument (HMT), the output of the photoresistor is directly related to turbidity, which is intuitively more suitable, higher turbidity values corresponding to higher values in the device output.

Previous studies have been developed in order to calibrate customer-built turbidimeters applied to the monitoring of suspended sediment in streams. LEWIS (1996) and ORWIN; SMART, (2005) used a continuously recording turbidimeter with a infrared

light emitting diode (LED) as light source and obtained qualitatively similar sensitivity as with our HMT, and found more sensibility to clay and silt fractions than to sand fractions. The LED light source reduces the color interferences of samples (USEPA, 1999), but for the purpose of our test, the color is part of the turbidity, because we want to detect any substance that is resuspended by the organisms, no matter if they are solids or dissolved substances. Furthermore, in our test, any initial color of the sediment/overlying water was eliminated by the subtraction of the initial measure in each subsequent measure.

In conclusion, the instrument here described (HMT) is cheap and easy to construct, and produces reliable measures that can be easily applicable to evaluation studies and monitoring programmes of water quality. It can be accurately used for the determination of turbidity in exploratory sublethal tests of toxicity of sediments with percentages of sand particles lesser than 75%.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by ANII (National Agency for the Investigation and Innovation of Uruguay) through the MSc. fellowship to MEB. PM also acknowledge SNI-ANII. Marcos Montesano helps with the initial phases of the HMT construction. Special thanks to Felipe García and Ernesto Brugnoli for their kindly help with the sampling collection.

References

ABRAHAMSON, M.; KATTENFELD, M. The role of turbidity as a constraint on predator-prey interactions in aquatic environments. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 40, p.169 – 174, 1997.

ALLEN, Y.T.; KIRBY, S.J.; REED, J.; THAIN, J.E. Development and application of chronic and sublethal sediment bioassays. Available in: <http://www.cefas.co.uk/>, 2006.

BARTSCH, M.L.; COPE, W.G.; RADA, R.G. Effect of cadmium-spiked sediment on cadmium accumulation and bioturbation by nymphs of the burrowing mayfly *Hexagenia bilineata*. **Water, Air Soil Pollut.**, v.109, p.277-292, 1999.

BRIGGS, A.D.; GREENWOOD, N.; GRANT, A. Can turbidity caused by *Corophium volutator* (Pallas) activity be used to assess sediment toxicity rapidly? **Mar. Environ. Res.**, v.55, p.181-192, 2003.

CARTER, M.; SHOUP, D.; DETTMERS, J.; WAHL, D. Effects of turbidity and cover on prey selectivity of adult smallmouth bass. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v.139, p.353-361, 2010.

CHO, E. Bioturbation as a novel method to characterize the toxicity of aquatic sediment. PhD. Thesis. Available at: <http://www.lib.ncsu.edu/theses/available/etd-02282005-111535/unrestricted/etd.pdf>. 2005.

DAVIES-COLLEY, R.J.; SMITH, D.G. Turbidity, suspended sediment and water clarity: a review. **J. Am. Wat. Resour. Ass.**, v.37, n.5, p.1085-1101, 2001.

GIPPEL, C. The use of turbidimeters in suspended sediment research. **Hydrobiologia**, v.176/177, p.465-480, 1989.

GONZÁLEZ, E. The freshwater amphipods *Hyaella* Smith, 1874 in Chile (Crustacea: Amphipoda). **Rev. Chil. Hist. Nat.**, v.76, p.623-637, 2003.

GRAÇA, M.; RODRÍGUES-CAPÍTULO, A.; OCÓN, C.; GÓMEZ, N. In situ tests for water quality assessment: a case study in Pampean rivers. **Wat. Res.**, v.36, p.4033-4040, 2002.

JERGENTZ, S.; PESSACQ, P.; MUGNI, H.; BONETTO, C.; SCHULZ, R. Linking in situ bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural

contamination in streams of the Argentine pampa. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.59, p.133-141, 2004.

LEWIS, J. Turbidity controlled suspended sediment sampling for runoff-event load estimation. **Wat. Resour. Res.**, v.32, n.7, p.2299-2310, 1996.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MC CARTHY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, 2nd ed. Taylor and Francis, Washington, DC: 3-67, 1995.

SADAR, M.J. Understanding Turbidity Science. Hach Company Technical Information Series - Booklet No. 11, 1996.

ORWIN, J.; SMART, C. An inexpensive turbidimeter for monitoring suspended sediment. **Geomorphology**, v.68, p.3-15, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Determination of turbidity by nephelometry. Environmental monitoring systems laboratory. Method 180.1. Office of Research and Development. Cincinnati, Ohio, 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Guidance Manual for Compliance with the Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule. Turbidity Provisions. EPA 815-R-99-010. Office of Water, Washington, DC, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 2nd edition EPA/600/R-99/064. 192 pp, 2000.

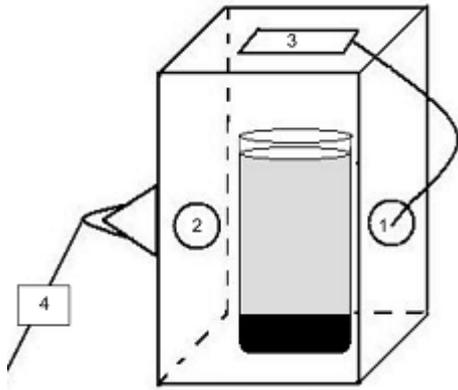


Figure 1. Schematic representation of the Home Made Turbidimeter (HMT) with test beaker containing sediment (in black) and water (in grey). The unit is 13 cm wide and 17 cm high. 1- Photoresistor; 2- Lamp; 3- AVR Butterfly board; 4- Voltage stabilizer.

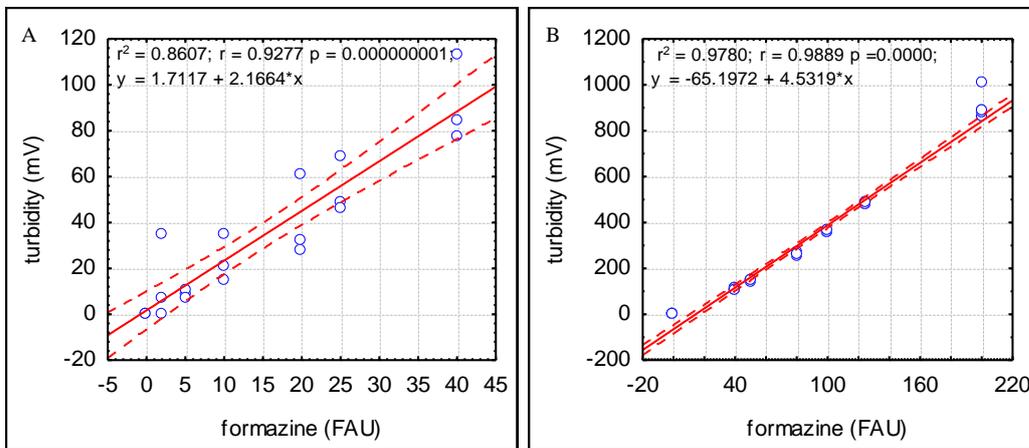
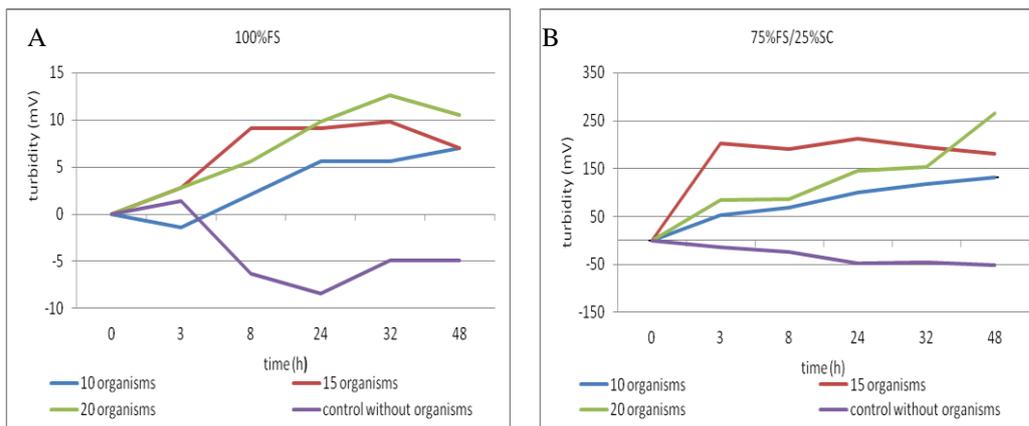


Figure 2. Calibration curves for the HMT. A) 0-40 FAU; B) 0-200 FAU. Best-fit equations are shown.



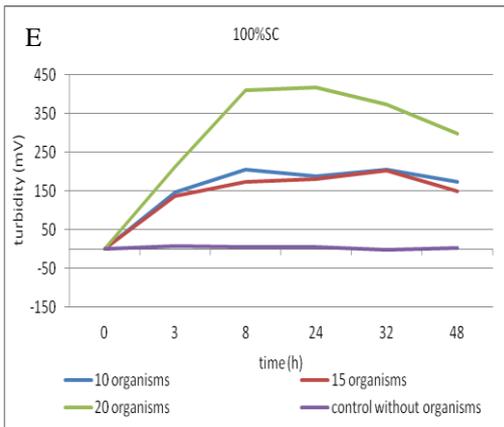
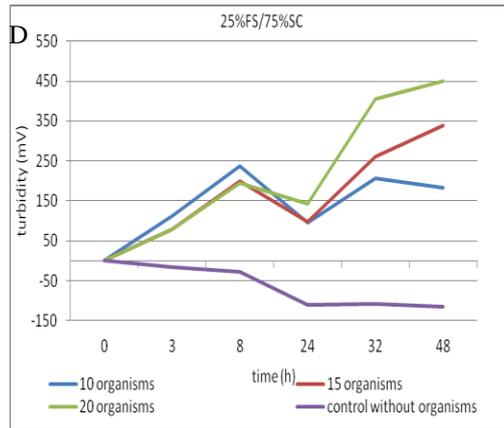
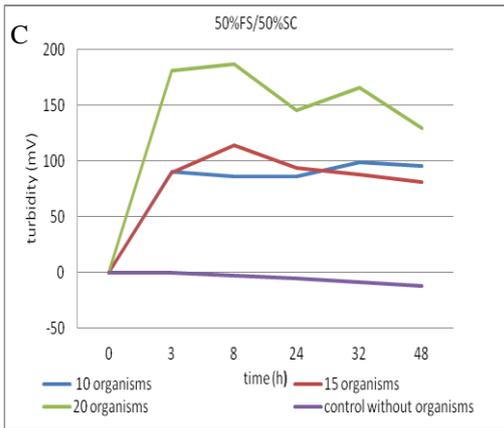
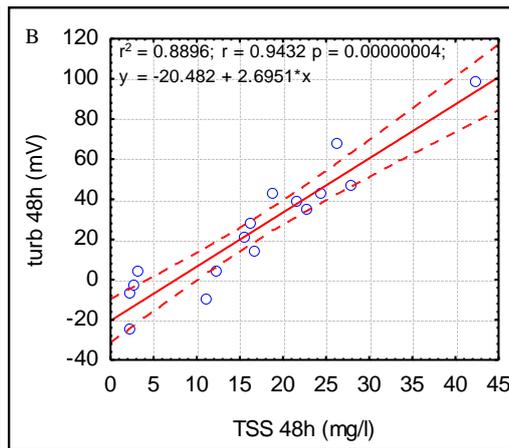
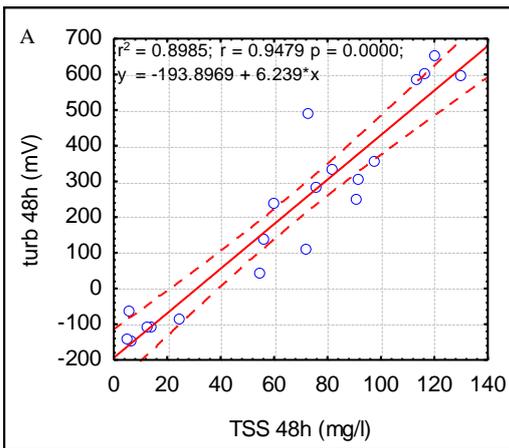


Figure.3. Effect of density of organisms on turbidity for the sediments of different grain sizes. A) sediment 100% FS; B) sediment 75% FS-25% SC; C) sediment 50% FS-50% SC; D) sediment 25% FS-75% SC; E) sediment 100% SC. Negative values correspond to decline of initial turbidity by settling, in the beakers without organisms.



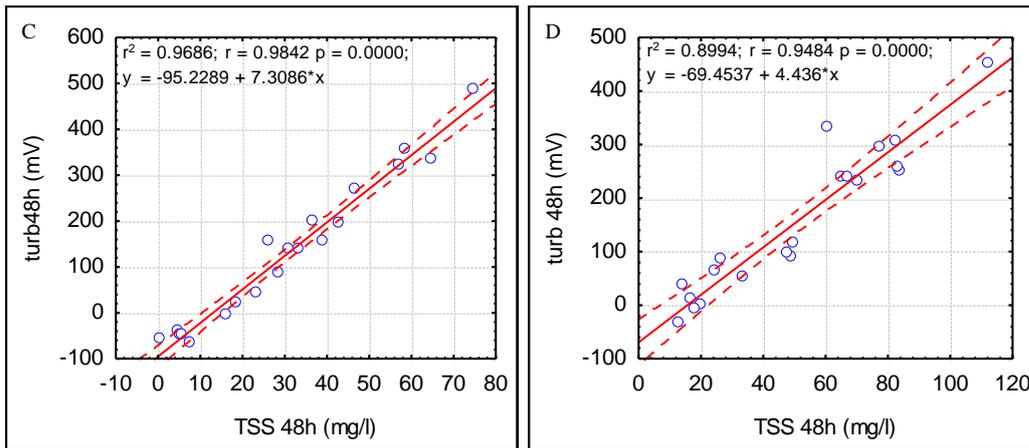


Figure 4. Relationships between mean turbidity measured after 48 hours of exposition and TSS (total suspended solids). A) sediment 25% FS-75% SC; B) sediment 50% FS-50% SC; C) sediment 75% FS-25% SC; D) sediment 100% SC. Best-fit equations are shown.