

ENSAYOS DE TOXICIDAD DE SEDIMENTOS CON *Hyaella pseudoazteca* CON COBRE COMO TÓXICO DE REFERENCIA

A. GIUSTO, A. SALIBIÁN Y L. FERRARI

Programa de Ecofisiología Aplicada, Dpto. Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján, Argentina
lferrari@mail.unlu.edu.ar

ABSTRACT. The suitability of *Hyaella pseudoazteca* as a test organism for sediment toxicity bioassays and the employment of the sediment from Las Flores stream as a solid control matrix were evaluated. The animals were collected from Las Flores stream and acclimated to the conditions of the laboratory. The toxicity of spiked sediments with two concentrations of Cu^{2+} (25 y 75 mg Cu^{2+} /Kg dry sediment) was tested. The samples used were physicochemically analyzed and their contaminants content determined. The assay was run with five replicates on each treatment at constant temperature and photoperiod ($23\pm 1^\circ\text{C}$; 16L/8D). The exposition time lasted ten days and for each replicate it was determined survival, biomass (dry weight) and length increase rates as end points. On the assay's initial and final time, hardness, pH, DO, NH_4^+ concentration, and conductivity were measured. The statistical significance relative to control was evaluated by means of ANOVA and Tukey's comparison test. No effect on survival was registered. There was a significant decrease of the biomass of the animals exposed to 75 mg Cu^{2+} /Kg. The length showed a tendency to decrease in both concentrations. From the obtained results it could be concluded that *Hyaella pseudoazteca* is a sensitive species for the assessment of spiked sediment toxicity assays with Cu^{2+} , being this toxic apt as reference in assays with this species. Las Flores stream's sediment proved to be adequate as negative control sediment because of its negligible level of chemical pollution and its granulometric composition.

Keywords: sediment toxicity bioassays, spiked sediment, amphipoda, *Hyaella pseudoazteca*, Copper.

Palabras clave: bioensayos de toxicidad de sedimentos, sedimentos adicionados, anfípodos, *Hyaella pseudoazteca*, Cobre.

INTRODUCCIÓN

Cuando los tóxicos son liberados a un cuerpo de agua superficial, se distribuyen entre la fase líquida y la particulada depositándose durante largos periodos de tiempo en los sedimentos del fondo. Un sedimento contaminado puede definirse como aquel que contiene sustancias químicas en exceso en relación a criterios geoquímicos y/o toxicológicos de calidad (Burton, 2002). A nivel regional la caracterización ecotoxicológica de los sedimentos se determina evaluando en ellos los niveles de los contaminantes considerados como prioritarios, sin tener en cuenta otros factores tales como posibles interacciones entre ellos, biodisponibilidad, resuspensión e impacto sobre la estructura y funcionamiento de las comunidades asociadas a ellos (Ronco *et al.*, 2000).

Los bioensayos son una herramienta útil para la evaluación de la toxicidad de

los sedimentos ya que los organismos de ensayo responden de manera integrada a los efectos adversos de las mezclas químicas con las que están en contacto, siendo sus resultados complementarios de los físico-químicos. Su incorporación en programas de monitoreo biológico de calidad toxicológica en Argentina requiere del desarrollo e instrumentación de diversos aspectos, tales como generación de metodologías adecuadas adaptadas a nuestras necesidades, aprovechando la experiencia existente en otros países tanto en lo metodológico como en la información en banco de datos, selección de ensayos según las especies a utilizar, efectos a evaluar, niveles de organización, objetivo de la evaluación, entre otros aspectos (Ronco *et al.*, 1995).

Los protocolos estandarizados para la realización de bioensayos con sedimentos utilizan como especie de ensayo al anfípodo *Hyaella azteca* (Ingersoll *et al.*, 1998).

No obstante es necesario adecuar los mismos a especies nativas. En este trabajo se utilizó como organismo prueba a *Hyalella pseudoazteca* (González y Watling, 2003), anfípodo representativo de las asociaciones zoobentónicas en ambientes de Sudamérica Austral. En el caso de ensayos de toxicidad con organismos bentónicos la técnica con sedimentos adicionados (*spiked sediment toxicity test*) es la más apropiada para caracterizar respuesta a sedimentos contaminados (EC, 1997).

El Cu^{2+} es un metal habitualmente hallado en sedimentos; sus niveles guía se encuentran entre 35 y 197 mg/Kg de sedimento seco (CEQG, 2002). El uso de este metal es atractivo como tóxico de referencia en bioensayos de monitoreo toxicológico de sedimentos ya que los riesgos sanitarios asociados a su manipulación son relativamente bajos (EC, 1995) y los organismos *test* son sensibles al mismo (Suedel *et al.*, 1996; Borgmann y Norwood, 1997; Vecchi *et al.*, 1999).

La bibliografía referida a bioensayos de toxicidad de sedimentos registra una amplia gama de matrices control, desde sedimentos tomados de ambientes naturales no contaminados (como en nuestro caso) hasta sedimentos sintéticos (EC, 1995; Borgmann *et al.*, 2001; McDonald y Haynes, 2001; Pasteris *et al.*, 2003).

En éste trabajo se evaluó la utilidad de *H. pseudoazteca* como organismo en bioensayos de toxicidad con sedimentos adicionados con Cu^{2+} ; también se estudió al sedimento del arroyo Las Flores (cuenca alta del río Luján), para su uso como matriz control sólida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un ensayo de sobrevivencia y crecimiento de 10 días de duración. Los animales fueron expuestos a sedimentos adicionados con dos cantidades de Cu^{2+} . Para el diseño experimental se utilizaron los protocolos de EC (1997) y US EPA (2000) con modificaciones.

Cultivo y mantenimiento de los animales

Los anfípodos utilizados fueron colectados del arroyo Las Flores, donde se los halla asociados a macrófitas *Egeria densa* y *Ceratophyllum demersum* (Casset *et al.*,

2001). En el laboratorio se realizó una separación inicial de las dos especies que co-habitan en dicho arroyo (*H. pseudoazteca* e *Hyalella curvispina*). Los ejemplares de *H. pseudoazteca* se mantuvieron hasta el inicio de los bioensayos en recipientes de plástico con agua potable, junto con algunas macrófitas del lugar. Se agregó alimento triturado para peces cada 3 días, semanalmente se renovó el 50% del volumen de agua y se removió el alimento residual.

El cultivo se mantuvo en laboratorio (durante 15 días) con temperatura y fotoperíodo constantes ($23 \pm 1^\circ\text{C}$ y 16L/8O) en agua no clorada de dureza moderada (80 - 90 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$). Diez días antes del inicio del ensayo se seleccionó un *pool* de individuos menores a 3 mm de longitud, que fue llevado a una cámara experimental (con igual régimen de temperatura y fotoperíodo) en agua reconstituida moderadamente dura (MHW) de la siguiente composición (mg/L): NaHCO_3 , 96; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60; MgSO_4 , 60; KCl, 4; pH, 7,4 - 7,8; dureza, 80 -100 mg $\text{CO}_3\text{Ca/L}$ (US EPA, 1993).

Colección y manipulación del sedimento

Los sedimentos fueron tomados del fondo del arroyo Las Flores ($59^\circ 07'\text{O}$ y $34^\circ 29'\text{S}$) mediante draga. Se tomaron aproximadamente 15 Kg de sedimento (hasta 15 cm de profundidad), en 3 sitios distanciados entre sí por aproximadamente 3 m. El total del sedimento colectado se homogeneizó manualmente y se conservó en refrigerador durante 24 h. Luego se extrajo la hojarasca y macrofauna, y se homogeneizó nuevamente. Se tomaron tres submuestras y se determinó la composición química, el contenido de poluentes, la relación peso seco/peso húmedo (PS/PH) (Pasteris *et al.*, 2003), humedad, contenido de materia orgánica y composición granulométrica mediante el método de la pipeta de Robinson (Lopretto y Tell, 1995).

Preparación de los sedimentos adicionados con Cu^{2+}

El agregado del tóxico al sedimento se realizó incorporando al mismo el volumen necesario de una solución stock de 10 g Cu^{2+}/L (como CuSO_4) en MHW. El control fue adicionado con MHW.

Las concentraciones de Cu^{2+} (nominales) alcanzadas fueron: 0 (control), 25 y

75 mg Cu²⁺/Kg sedimento seco. La adición del tóxico al sedimento se realizó en pasos sucesivos de acuerdo al procedimiento de Pasteris *et al.* (2003). La relación volumen de agua de dilución:volumen de sedimento fue 2:1,5.

Dieciocho días previos al inicio del ensayo (*día -18*) se mezclaron 700 ml de sedimento con 1 L de MHW y el volumen requerido de solución stock de Cu²⁺ en un recipiente de polipropileno de 4 L de capacidad. Para el sedimento control se procedió de igual forma reemplazando la solución stock por agua MHW.

Los recipientes se conservaron en heladera herméticamente cerrados durante 18 días. Cada 4 días se homogeneizaron manualmente por 5 minutos utilizando una cuchara de acero inoxidable.

Veinticuatro horas previas al comienzo del ensayo (*día -1*) se descartó el sobrenadante de cada recipiente, se homogeneizó y separó una alícuota para determinar la concentración inicial de Cu²⁺, luego el contenido de cada recipiente se fraccionó en 5 réplicas que se prepararon con 100 ml del sedimento y 190 ml de MHW.

Todas las réplicas fueron colocadas en la cámara de ensayo, cubiertas con placas de vidrio a fin de minimizar la evaporación, dejándolas equilibrar durante 24h.

Descripción del bioensayo

A tiempo inicial (*día 0*) en cada réplica de ambos tratamientos y en el control se colocaron 10 individuos de *H. pseudoazteca* tomados al azar del grupo que se encontraba en aclimatación. Se separó también un grupo de 20 animales para realizar mediciones de longitud y peso seco inicial.

Durante el tiempo de exposición los animales fueron alimentados periódicamente con alimento para peces triturado interrumpiéndose la alimentación 48 h antes de la finalización del ensayo.

A tiempo final de exposición (*día 10*) los puntos finales (*endpoints*) considerados fueron: sobrevivencia y crecimiento (biomasa y longitud) relativos al tiempo inicial.

Se contó el número de individuos vivos, se los fijó en formol al 2% y se midió longitud desde la base de la primera antena hasta el final del telson mediante calibre digital bajo lupa (precisión < 0,01 mm).

Se determinó la biomasa y se la expresó como peso seco/individuo sobreviviente por tratamiento. El peso seco se obtuvo colocando los grupos de animales pertenecientes a una misma réplica en estufa a 60°C durante un tiempo no menor a 24 h.

Algunas submuestras de sedimento control y tratadas fueron observadas bajo microscopio para evaluar presencia de organismos.

Caracterización fisicoquímica del medio de ensayo

El sedimento del arroyo Las Flores fue caracterizado por Ronco *et al.* (comunicación personal) para componentes mayoritarios, minoritarios y contaminantes.

A tiempo inicial y final de ensayo se determinaron oxígeno disuelto, pH y conductividad mediante sensores (oxímetro Hanna ($\pm 0,1$ mg/L); pHmetro Mettler ($\pm 0,01$), conductímetro Consort C532 ($\pm 0,1$ μ S/cm) respectivamente); además se determinó concentración de NH₄⁺ (*kit* de reactivos Merck Spectroquant, 1.14752) y dureza (método volumétrico, *kit* de reactivos Merck Aquamerck, 1.08039).

A tiempo final se tomaron muestras de sedimento y de agua de una de las 5 réplicas de cada tratamiento y control para la determinación de la concentración efectiva de Cu²⁺ por Espectrofotometría de Absorción Atómica con aspiración directa en llama aire-acetileno (Método 3111B, APHA, 1995).

Análisis estadístico

La normalidad de la distribución fue evaluada mediante el *test* de Shapiro Wilks, la homogeneidad de varianza por el *test* de Levene. La significatividad de las diferencias entre tratamientos para longitud y biomasa se analizó por ANOVA de un factor con comparaciones de Tukey y en el caso de la sobrevivencia se utilizó el *test* de Kruskal Wallis (Zar, 1999). Se usó el paquete estadístico Infostat. El nivel de significatividad fue del 95%.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se indican el contenido de materia orgánica, humedad, relación PS/PH y composición granulométrica del sedimento del arroyo Las Flores. La humedad se halla dentro del rango habitual

Materia orgánica*	Humedad (n= 9)	PS/PH (n= 9)	Porcentaje de componentes
5,3	48,3 ± 0,9	0,52 ± 0,01	Arena 47,0 Arcilla 36,4 Limo 17,4

Tabla 1. Proporción de materia orgánica (%), humedad (%; media ± DS), relación peso seco/peso húmedo (PS/PH; media ± DS) y granulometría del sedimento (%) del arroyo Las Flores. * Ronco et al. (com. pers.).

en este sitio con un nivel relativamente elevado de materia orgánica. La composición granulométrica indicó que se trata de un sedimento franco (MESL, 2001), con potencialidad en la retención de metales pesados.

La concentración efectiva de Cu^{2+} en el sedimento adicionado fue cercana a la nominal y permaneció estable durante el tiempo de ensayo confirmando que el nivel de exposición al tóxico fue prácticamente constante (Tabla 2).

[Cu^{2+}]		
Nominal	Efectiva inicial	Efectiva final
0	4	4
25	23	27
75	74	76

Tabla 2. Concentración de cobre nominal y efectiva (inicial y final) en sedimento. Valores en mg Cu^{2+} /Kg sedimento seco.

En la Tabla 3 se muestran los parámetros registrados en la matriz acuosa al inicio y al final de cada tratamiento. El aumento de OD fue significativo en controles y en el grupo de 25 mg Cu^{2+} /Kg, en tanto que la concentración de amonio disminuyó significativamente. Estos parámetros no registraron diferencias en el grupo de mayor concentración (75 mg Cu^{2+} /Kg).

Parámetros	Grupos Experimentales					
	control		25 mg Cu^{2+} /Kg sed.		75 mg Cu^{2+} /Kg sed.	
	T0	T10	T0	T10	T0	T10
pH	7,97 +0,21	9,26 +0,06*	7,88 +0,17	9,39 +0,23*	7,70 +0,12	8,40 +0,05*
OD	6,98 +0,46	9,56 +0,92*	6,80 +0,43	14,72 +2,52*	6,72 +0,26	7,50 +0,14
NH_4^+	1,76 +0,11	0,18 +0,08*	1,94 +0,30	0,12 +0,04*	1,42 +0,08	1,60 +0,66
Dureza	90,0 +0,4	144 +10*	90,0 +0,7	113 +10*	90 +0	144 +20*
Conductividad	433,4 +32,0	601,4 +32,6*	430,2 +34,8	545,6 +16,2*	407,6 +8,2	594,2 +6,5*

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de la matriz acuosa (OD (mg/L); NH_4^+ (mg/L); dureza (mg CO_3Ca /L); conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) a tiempo inicial (T0) y final (T10) de exposición. Valores medios ± DS (n=5).

* diferencia estadísticamente significativa entre T0 y T10 para cada grupo y parámetro evaluado ($p < 0,05$).

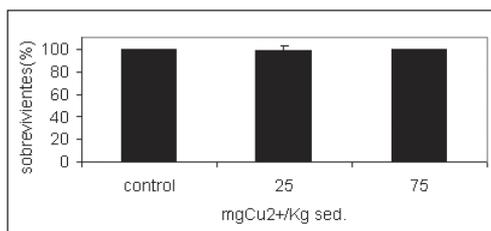


Figura 1. Porcentaje de anfípodos sobrevivientes a tiempo final en cada tratamiento. Valores expresados como media ± DS.

En todos los grupos hubo un aumento significativo de la conductividad, la dureza y el pH.

No se registraron efectos sobre la sobrevivencia por exposición a Cu^{2+} (Figura 1). Sin embargo el crecimiento disminuyó de manera significativa tanto en longitud como en peso (biomasa). El grupo control incrementó su longitud un 12% en relación al tiempo inicial, en cambio en los individuos expuestos a 25 y a 75 mg Cu^{2+} /Kg el incremento fue de aproximadamente un 6%, no diferenciándose del grupo

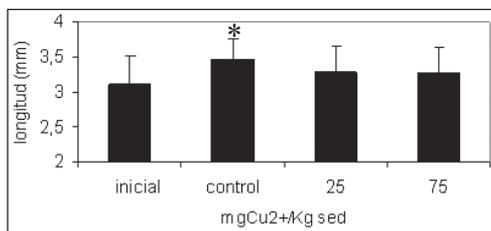


Figura 2. Longitud (mm) del grupo inicial y de cada condición experimental a tiempo final. Valores expresados como media ± DS. * indica diferencias significativas con respecto al grupo inicial según la prueba de comparaciones de Tukey ($p < 0,05$).

inicial (Figura 2).

En cuanto a la biomasa, en los tres

grupos se observó un aumento con respecto al inicial. Sin embargo, mientras que en el grupo control los individuos duplicaron su peso seco con respecto al tiempo inicial, en el grupo expuesto a 75 mg Cu²⁺/Kg solo lo hicieron en aproximadamente un 50%. El grupo expuesto a la concentración menor no mostró diferencias de peso en relación al control (Figura 3).

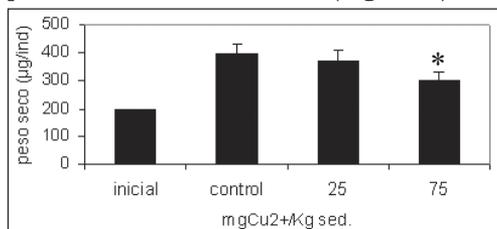


Figura 3. Biomasa expresada como peso seco (µg/individuo) del grupo inicial y de cada condición experimental a tiempo final. * indica diferencias significativas con respecto al grupo control según la prueba de comparaciones de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

De acuerdo a las recomendaciones de Environment Canada (EC, 1995) un sedimento control es esencialmente aquel en el que la especie de ensayo sobrevive en los controles experimentales. El mismo puede ser colectado en cualquier área no contaminada y debe satisfacer los requerimientos del tamaño de grano para la especie de ensayo. Sus propiedades físico-químicas y niveles basales de los elementos traza de interés deben ser determinados. En muchas ocasiones el sitio de recolección es el mismo en el que los organismos de ensayo son encontrados.

De acuerdo a la información química el contenido de metales del sedimento del arroyo Las Flores indicó el siguiente orden de abundancia: mayoritarios: Fe > Ca > K > Mg > Mn > Na. No se registró presencia de sulfitos, cianuros ni hidrocarburos. Las determinaciones de pesticidas organoclorados, organofosforados y piretroides alcanzaron valores menores a los límites de detección (2 µg/Kg) (Ronco *et al.*, manuscrito enviado para su publicación). Este sedimento puede caracterizarse como no poluido en relación a niveles guía de calidad de sedimentos (Mac Donald *et al.*, 2000). En particular el contenido de Cu²⁺ se encuentra dentro del rango esperado para materiales típicos de la corteza te-

rrestre (Frink, 1996), pudiendo utilizarse como sedimento control en protocolos de bioensayos de sedimentos adicionados con este metal como tóxico referente.

Además, dicho arroyo resulta muy ventajoso para la provisión de sedimento blanco o control debido a su composición granulométrica que provee un sustrato con capacidad para la adsorción de metales, minimizándose la resuspensión de los mismos en la columna de agua. Esta condición permite una estimación más realista del efecto tóxico en evaluaciones ecotoxicológicas de riesgo de la biota asociada a sedimentos de la región por contaminación con metales pesados (APHA, 1995).

Sin embargo el uso de sedimento fresco como matriz sólida control puede ofrecer la desventaja de incluir su comunidad asociada. En este caso en particular, la presencia de organismos fotosintetizadores en las muestras evaluadas podría explicar el aumento del OD en la fase acuosa y la disminución del nivel de amonio. La variabilidad causada por esta condición, no factible de cuantificar, agrega un posible factor de incertidumbre al ensayo. En experimentos realizados con sedimento seco y rehidratado del mismo arroyo no se registró este efecto (Giusto, comunicación personal).

En relación al incremento registrado de dureza, conductividad y pH de la matriz acuosa a tiempo final de ensayo, éste podría atribuirse a la resuspensión de sales y electrolitos contenidos inicialmente en el sedimento, ya que el efecto evaporativo puede considerarse despreciable debido a que los recipientes permanecieron tapados durante todo el ensayo.

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

Borgmann y Norwood (1997) reportaron para *H. azteca* expuesta durante 4 semanas a concentraciones de 74 a 300 mg Cu²⁺/Kg sedimento seco, y para ensayos con sedimentos adicionados con cobre entre 74 y 1868 mg/Kg de una sema-

na de duración, porcentajes de supervivencia mayores al 90%. Estos autores observaron efectos sobre el crecimiento a partir de una concentración de 363 mg/Kg en animales expuestos por cuatro semanas. Nuestros resultados en cuanto a sobrevivencia son comparables con los reportados para *H. azteca* con igual concentración. Para la misma especie Milani *et al.* (2003) en exposición crónica a cobre en un sistema de *spiked sediment* reportaron efectos sobre el crecimiento, como concentración inhibitoria 25%, a 76 mg Cu²⁺/Kg. Si bien las condiciones experimentales no son similares a las seguidas en este estudio, nuestros resultados indicaron un nivel de sensibilidad comparable entre *H. azteca* e *H. pseudoazteca*.

Esta es una primera contribución a la evaluación de toxicidad por metales con *H. pseudoazteca*. Bajo nuestras condiciones experimentales esta especie resultó sensible al Cu²⁺ adicionado al sedimento control. Es importante considerar que la concentración de efecto (75 mg Cu²⁺/Kg) se halla por debajo del nivel probable de efecto (PEL) para Cu²⁺ en sedimentos de agua dulce (MacDonald *et al.*, 2000; CEQG, 2002). Nuestros resultados sugieren que el Cu²⁺ puede ser utilizado como tóxico referente en bioensayos con *H. pseudoazteca*.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto financiado por la ANPCyT (PICT N° 14129/03) y la Universidad Nacional de Luján.

BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association (APHA)**. 1995. Standard methods for examination of water and wastewater. 19th ed. APHA-AWWA.WPCF. Washington D.C.
- Borgmann, U.** 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health Management*, 3: 277 - 289.
- Borgmann, U. y W.P. Norwood.** 1997. Toxicity and accumulation of zinc and copper in *Hyalella azteca* exposed to metal-spiked sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 1046 - 1054.
- Borgmann, U., R. Néron y W.P. Norwood.** 2001.

- Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyalella azteca*. *Environmental Pollution*, 111: 189-98.
- Burton, G. A. Jr.** 2002. Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*, 3: 65-75.
- Casset, M.A., F.R. Momo y A.D.N Giorgi.** 2001. Dinámica poblacional de dos especies de anfípodos y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del río Luján. *Ecología Austral*, 11: 79-85.
- CEQG (Canadian Environmental Quality Guidelines).** 2002. Summary of Existing Canadian Environmental Quality Guidelines. www.ccme.ca/assets/pdf/e1_06.pdf
- EC (Environment Canada).** 1995. Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a referent toxicant. Environmental Protection Service, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/30, 56p.
- EC (Environment Canada).** 1997. Biological test method: test for survival and growth in sediment using freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Environmental Protection Series, Report EPS 1/RM/33, 56p.
- Frink, C.R.** 1996. A perspective on metals in soils. *Journal of Soil Contamination*, 5: 329 - 359.
- González, E.R. y L. Watling.** 2003. A new species of *Hyalella* from Brazil (Crustacea: Amphipoda: Hyallellidae), with redescrptions of three other species in the genus. *Journal of Natural History*, London, 37: 2045-2076.
- Ingersoll, C.G., E.L. Brunson, F.J. Dwyer, D.K. Hardesty y N.E. Kembli.** 1998. Use of sublethal endpoints in sediment toxicity test with the amphipod *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 1508-1523.
- Lopretto, E.C. y G. Tell.** 1995. Ecosistemas de aguas continentales. Metodologías para su estudio, tomo I. Ediciones Sur.
- MacDonald, D.D., C.G. Ingersoll y T.A. Berger.** 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 20-31.
- McDonald, B.G. y P.A. Haynes.** 2001. Silica sand as an artificial control sediment in a 20 day *Neanthes arenaceodentata* toxicity test. *Environmental Toxicology*, 16: 172-176.
- MESL (MacDonald Environmental Sciences Ltd.).** 2001. *Hyalella azteca* sediment toxicity test, solid-phase microtox toxicity test, metals analyses of whole sediment and pore water, and physical characterization of sediments of the Calcasieu estuary, Louisiana. Report for CDM Federal Programs Corporation. 73 pp.
- Milani, D., T.B. Reynoldson, U. Borgmann y J. Kolasa.** 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 845-854.
- Pasteris, A., M. Vecchi, T.B. Reynolgsen y G. Bonomi.** 2003. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): a comparison of the 28-day re-

- productive bioassay a 6-month cohort experiment. *Aquatic Toxicology*, 65: 253-265.
- Ronco, A.E., M.C. Sobrero, P.R. Alzuet, G.D. Bulus Rossini y B. Dufka.** 1995. Screening for sediment toxicity in the Río Santiago basin: A base line study. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10: 35-39.
- Ronco, A. C. Camilión y M. Manassero.** 2000. Metales pesados en sedimentos de fondo de arroyos de la franja costera sur bonaerense. *Gerencia Ambiental*, 70: 856-862.
- Ronco, A.E., L. Peluso, M. Jurado, G. Bulus Rossini y A. Salibián.** Screening of sediment pollution in tributaries from the Southwestern coast of the Río de la Plata estuary. Enviado.
- Suedel, B.C., E. Deaver y J.H. Rodgers Jr.** 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.
- US EPA (Environmental Protection Agency).** 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. (4th Ed). Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. EPA, Cincinnati, Ohio. EPA /600/4-90/027F.
- US EPA (Environmental Protection Agency).** 2000. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Office of Science and Technology. Office of Water, Report, EPA 600/R-99/064.
- Vecchi, M., T.B. Reynoldson, A. Pasteris y G. Bonomi.** 1999. Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): comparison of the 28-day reproductive bioassay with an early-life-stage bioassay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 1173-1179.
- Zar, J.H.** 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New Jersey 661 pag.