



## SENSIBILIDAD DE *Hyalella curvispina* SHOEMAKER, 1942 (CRUSTACEA, AMPHIPODA) AL COBRE, FENANTRENO Y SALINIDAD

María Elena Bouvier\*  y Pablo Muniz .

Oceanografía y Ecología Marina, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay

\*Autor para correspondencia: mariaelenabouvier@gmail.com

Fecha de recepción: 10 de junio de 2021  
Fecha de aceptación: 27 de octubre de 2021

### RESUMEN

Los bioensayos constituyen una herramienta útil para la detección de posibles impactos de los contaminantes en la biota. *Hyalella curvispina* es un anfípodo epibentónico nativo de América del Sur utilizado para evaluar la toxicidad de muestras ambientales. Sin embargo, persisten vacíos de información respecto a su sensibilidad a ciertos contaminantes y a su tolerancia a la salinidad, por lo que esta investigación aporta nuevos datos para caracterizar su respuesta. En este trabajo se analizó la sensibilidad frente a cobre y fenantreno de *Hyalella curvispina*, así como su tolerancia a la salinidad. La LC50 96h obtenida para el cobre fue de 184 µg Cu/l, mientras que la LC50 10 días fue de 68 µg Cu/l. En cuanto a la salinidad, los resultados mostraron una LC50 96h = 13, la LC50 10 días = 11 y una inhibición significativa en el crecimiento del 18% respecto al control en los organismos expuestos a 17.2 de salinidad. Para el fenantreno no se obtuvo respuesta letal significativa en ninguno de los tratamientos aplicados, sugiriendo que *H. curvispina* tendría una mayor tolerancia al fenantreno que otros anfípodos, no obstante, estos resultados preliminares deberían verificarse abarcando mayores niveles de exposición.

**Palabras clave:** Test toxicidad, Contaminación, Ecotoxicología, Anfípodo, Uruguay.

### ABSTRACT

**Sensitivity of *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 (Crustacea, Amphipoda) to copper, phenanthrene and salinity.** Bioassays are a useful tool for detecting possible impacts of pollutants on biota. *Hyalella curvispina* is an epibenthic amphipod native to South America used to evaluate the toxicity of environmental samples. However, information gaps persist regarding their sensitivity to certain pollutants and their tolerance to salinity, so this

research provides new data to characterize their response. In this work, the sensitivity to copper and phenanthrene of *Hyalella curvispina* was analyzed, as well as its tolerance to salinity. The 96h LC50 obtained for copper was 184 µg Cu/l, while the 10-day LC50 was 68 µg Cu/l. Regarding salinity, the results showed an LC50 96h = 13, the LC50 10 days = 11 and a significant inhibition in growth of 18% compared to the control in organisms exposed to 17.2 salinity. For phenanthrene, no significant lethal response was obtained in any of the applied treatments, which suggests that *H. curvispina* would have a greater tolerance to phenanthrene than other amphipods, however, these preliminary results should be verified covering higher levels of exposure.

**Keywords:** Toxicity test, Contamination, Ecotoxicology, Amphipod, Uruguay

### INTRODUCCIÓN

Varias clases de contaminantes ingresan al ambiente como resultado de diferentes actividades humanas, incluidas las industriales, urbanas, de la agricultura, del turismo y del transporte, entre otras. Los ambientes acuáticos son en gran medida el destino final de la mayoría de los contaminantes antropogénicos (Amiard-Triquet, 2015). Dentro de estos ambientes, los sedimentos son muy importantes por ser a su vez fuente además de destino final de esos mismos contaminantes (Rand, Wells y Mc Carthy, 1995); llegando a comprometer su calidad y generando un problema relevante y complejo debido al rol biogeoquímico que cumplen. Una herramienta utilizada con éxito para la detección de posibles impactos de los contaminantes en la biota son los bioensayos de toxicidad (Ingersoll, 1995). 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 y Ho, 1993, Ingersoll, 1995).

Los bioensayos con anfípodos se han convertido en un referente en la caracterización de sedimentos marinos/estuarinos contaminados y material dragado (Casado-Martínez et al., 2006). Este enfoque se utiliza habitualmente para medir los efectos biológicos de las muestras de sedimentos, los procedimientos operativos estándar se encuentran mayormente protocolizados y son utilizados por agencias de protección ambiental en varios países (Environment Canada 1992; RIKZ 1999; USEPA 1994, 2000), quienes utilizan especies modelo (no necesariamente nativas) y/o especies nativas.

Para estandarizar y validar estas pruebas de toxicidad usando especies nativas es necesario caracterizar la sensibilidad de los organismos a ensayar frente a diferentes tóxicos de referencia (Rand et al., 1995).

El cobre y el fenantreno fueron seleccionados como tóxicos de referencia en este trabajo porque constituyen contaminantes ubicuos y es abundante la bibliografía acerca de su toxicidad en numerosas especies, lo que permite comparar los resultados obtenidos con otras investigaciones. El cobre puede tener origen natural o antropogénico, ingresando a los sistemas acuáticos por deposición aérea o escurrimiento superficial y acumulándose en los sedimentos por su afinidad por la materia orgánica. Es un micronutriente esencial para plantas y animales, sin embargo, puede ser tóxico para la biota acuática cuando se encuentra en concentraciones elevadas, afectando la sobrevivencia y el crecimiento de los organismos (USEPA, 2007). Estudios previos 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) (Pyle y Mirza, 2007). La afectación de la quimio sensación debida a la contaminación por cobre encontrada por Pyle y Mirza (2007) incluye procesos de importantes consecuencias a nivel poblacional y de comunidades, tales como la defensa contra la depredación, la capacidad de encontrar alimento 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* (Linnaeus, 1758), llevando a una caída en el contenido de sodio en la hemolinfa y comprometiendo su capacidad de osmorregulación (Brooks y Mills, 2003).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran entre los contaminantes más carcinogénicos, mutagénicos y tóxicos encontrados en los sistemas acuáticos. Se forman por la combustión incompleta de combustibles fósiles como carbón,

petróleo o madera, y se transportan al medio acuático por deposición atmosférica o por escurrimiento superficial. Por tratarse de compuestos hidrofóbicos, las concentraciones de HAP en los sistemas acuáticos generalmente son más altas en los sedimentos que en la columna de agua. (National Research Council, 1985; Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), 1999). El fenantreno es un HAP compuesto por 3 anillos bencénicos, cuyos efectos letales y subletales han sido estudiados en numerosas especies (Lotufo y Fleegger, 1997; Verrhiest, Clement y Blake, 2001; Wu et al., 2015; Gauthier, Norwood, Prepas y Pyle, 2016).

Además, para evaluar la contaminación mediante bioensayos en ambientes estuarinos se requiere conocer el efecto de la salinidad en la capacidad de sobrevivencia y crecimiento de los organismos de prueba, para poder discernir los efectos tóxicos de aquellos efectos debidos a una salinidad fuera de su rango de tolerancia.

*Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 (Crustacea: Amphipoda) es un anfípodo muy abundante en cuerpos de agua dulce de Uruguay, Argentina y Brasil (Graça, Rodrigues-Capítulo, Ocón y Gómez, 2002; González, 2003; Jergentz, Pessacq, Mugni, Bonetto y Schulz, 2004). Su distribución es sudamericana, desde Punta Arenas, Chile y las Islas Malvinas en el Sur, hasta Cangallo y Río de Janeiro en el Norte (Grosso y Peralta, 1999). Organismos de esta especie se pueden encontrar asociados a sustratos duros, vegetación vascular acuática y algas, así como formando parte del zoobentos de sustratos blandos de arroyos (Poi de Neiff y Carignan, 1997; Cassett., Momo y Giorgi, 2001; Poretti, Casset y Momo, 2003). Tienen gran importancia en la trama trófica de muchos ecosistemas acuáticos, siendo alimento para otros macroinvertebrados y peces (Giorgi y 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 y Tiraboschi, 1999; Saigo, Manchese y Montalto, 2009). Su capacidad de bioturbación medida como generación de turbidez fue analizada para el diseño de un turbidímetro casero (Bouvier, Pérez y Muniz, 2013). Recientemente se han realizado estudios sobre su dinámica poblacional y reproductiva en relación con factores físico-químicos, encontrando una correlación positiva de la abundancia absoluta con la conductividad del agua (Waller, Ramos y Verdi, 2020).

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 limnocorales ubicados en el fondo de arroyos, mostrando que es sensible a la polución (e.g. Graça et al., 2002; Jergentz et al., 2004; Giusto y Ferrari, 2008; Peluso et al., 2011;

Tabla 1. Condiciones de cultivo de *Hyalella curvispina* en el laboratorio.

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

Tabla 2. Detalles de los ensayos de caracterización de la sensibilidad de *H. curvispina*, en fase acuosa. NA = no analizado. Valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar de las medidas.

Nº Ensayo- Tratamiento aplicado	Intervalo de concentraciones	Anfipodos		Tiempo de exposición	Crecimiento
		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 en ensayo de 10 días
2-Salinidad	Control-0.4-3.6-10.5-16.9-23.9-34.2.	NA	2-9	96 h y 10 días	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
4-Cobre	Control-60-120-240-480-960µg/l	NA	4-12	96 h	NA
5-Cobre	Control-60-120-240-480µg/l	NA	7-10	96 h	NA
6-Cobre	Control-60-120-240-480-960µg/l	NA	1-10	96 h	NA
7-Cobre	Control-30-60-120-240µg/l	NA	16-27	96 h y 10 días	NA
8-Fenantreno	Control-50-100-200µg/l	3.6 (0.6)	11-24	96 h y 10 días	NA

Giusto, Somma y Ferrari, 2012; Mugni et al., 2016; Del Brio, Montagna, Lares, Parolo y Venturino, 2018; Solis, Paracampo y Bonetto, 2019). El cultivo de individuos de esta especie ha sido protocolizado (Somma, Giusto y Ferrari, 2011) y su uso actual como organismo de prueba ha mostrado que es una especie modelo adecuada para la evaluación de la calidad de sedimento y agua dulce.

En cuanto a su tolerancia y/o distribución en ambientes de diferente salinidad, la especie ha sido reportada en aguas del Río de la Plata medio y exterior, en zonas con valores de salinidad variando de 0.6 a 17 (FREPLATA, 2001). Sin embargo, el rango de tolerancia a la salinidad de *H. curvispina* en condiciones controladas de laboratorio no ha sido reportado a la fecha.

Otra especie congénere nativa de América Central y América del Norte, *Hyalella azteca* (Saussure, 1858), ha mostrado ser eurihalina, siendo exitosamente criada y utilizada en tests de toxicidad usando agua y sedimentos estuarinos, (Nebeker y Miller, 1988), existiendo protocolos internacionales donde se proporcionan pautas para su cría y realización de ensayos de toxicidad (Environment Canada, 1997 y USEPA, 2000).

Con el objetivo de aportar al conocimiento de la sensibilidad de *Hyalella curvispina*, en este trabajo se

evaluó el efecto letal del cobre, fenantreno y la salinidad, así como el efecto de la salinidad en el crecimiento, a los efectos de caracterizar su respuesta, comparando los resultados obtenidos con los reportados para otros organismos del mismo género.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de los ensayos de toxicidad se mantuvo un stock de organismos en el laboratorio, bajo condiciones controladas. Inicialmente los organismos fueron colectados en un charco ubicado en el predio de Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

El sistema de cultivo se realizó de acuerdo con lo establecido en Somma et al. (2011) según se detalla en la Tabla 1. Los ensayos se realizaron según lo indicado para testear sustancias de referencia en Environment Canada (1997) y USEPA (2000), adaptado en este trabajo para *Hyalella curvispina* (Tabla 3). Durante los ensayos se controló que el oxígeno disuelto en el agua sobrenadante superara el 80 % de saturación (oxímetro YSI modelo 58) y que el pH se mantuviera entre 7-8 (multiparámetro YSI modelo 63).

Los tóxicos utilizados fueron: cobre (a partir de sulfato de cobre pentahidratado, ppa. Merck) y fenantreno (Merck, para síntesis). La tolerancia de *H.*

Tabla 3. Condiciones generales de ensayo.

<b>Tiempo de exposición</b>	96 horas y 240 horas (10 días)
<b>Punto final</b>	Sobrevivencia
	En ensayo de salinidad de 10 días, adicionalmente se evaluó el efecto en el crecimiento
<b>Tipo de exposición</b>	Estática, sin aireación
<b>Aceptabilidad</b>	80 % de sobrevivencia en controles negativos
<b>Tipo y volumen de los vasos utilizados para el test</b>	De vidrio de 300 ml
<b>Volumen de solución testeada</b>	200 ml
<b>Agua de dilución y Control</b>	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 $\text{mgCaCO}_3/\text{l}$ )
<b>Número de organismos por vaso</b>	10
<b>Número de réplicas (vasos) por muestra analizada</b>	4 o 5
<b>Frecuencia, volumen y tipo de alimentación</b>	Los días 2, 4 y 8, 500 $\mu\text{l}/\text{vaso}$ de una mezcla de volúmenes iguales de suspensión de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5g/l) + suspensión de microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> de $10^6$ células por ml.
<b>Iluminación</b>	400 lux
<b>Fotoperíodo</b>	16h luz / 8h oscuridad
<b>Temperatura</b>	21 $\pm$ 2°C

*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®).

Además, se analizó el efecto de la salinidad (10 días) en el crecimiento de los organismos 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®. Las diferencias en el largo de los individuos en mm (variable respuesta) se analizaron mediante análisis de la covarianza (ANCOVA) de una vía, con la salinidad como factor, con cinco niveles, la sobrevivencia (%) como covariable, y comparación *a posteriori* mediante test de Dunnett. La homogeneidad de varianzas fue chequeada mediante el test de Levene y la normalidad con el test Shapiro-Wilk.

La concentración que mata al 50 % de la población luego del tiempo de exposición (denominada LC50), fue calculada mediante el programa ToxCalc®, aplicando el método probit siempre que los datos siguieron una distribución normal, o Spearman Karber en caso de no normalidad de los datos (Hamilton et al., 1977). En los casos en los que no se obtuvieron mortalidades parciales, y no fue posible calcular la LC50, se analizaron las diferencias en las sobrevivencias obtenidas mediante test  $X^2$ .

En la Tabla 2 se describe el número de ensayos realizados, la edad de los organismos testeados, la cantidad de réplicas y las concentraciones utilizadas en cada ensayo en particular.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los ensayos se presentan en la Tabla 4. La LC50 96h obtenida para el cobre fue de 184  $\mu\text{g Cu/l}$ , mientras que la LC50 10 días fue de 68  $\mu\text{g Cu/l}$ .

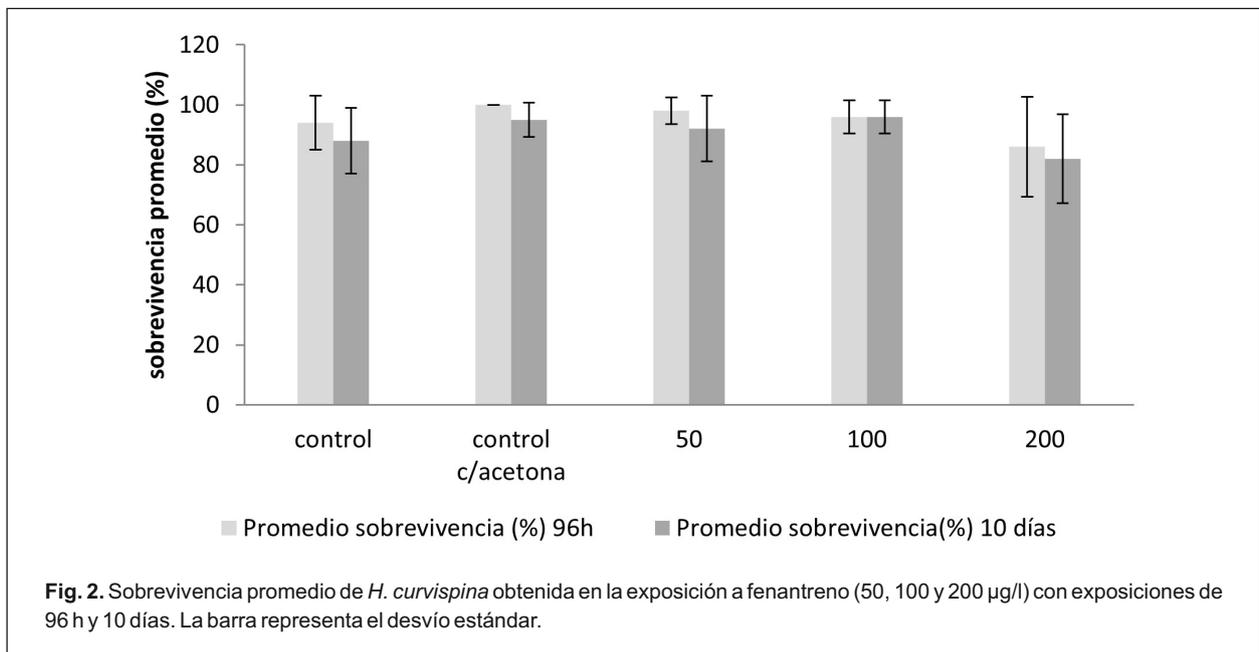
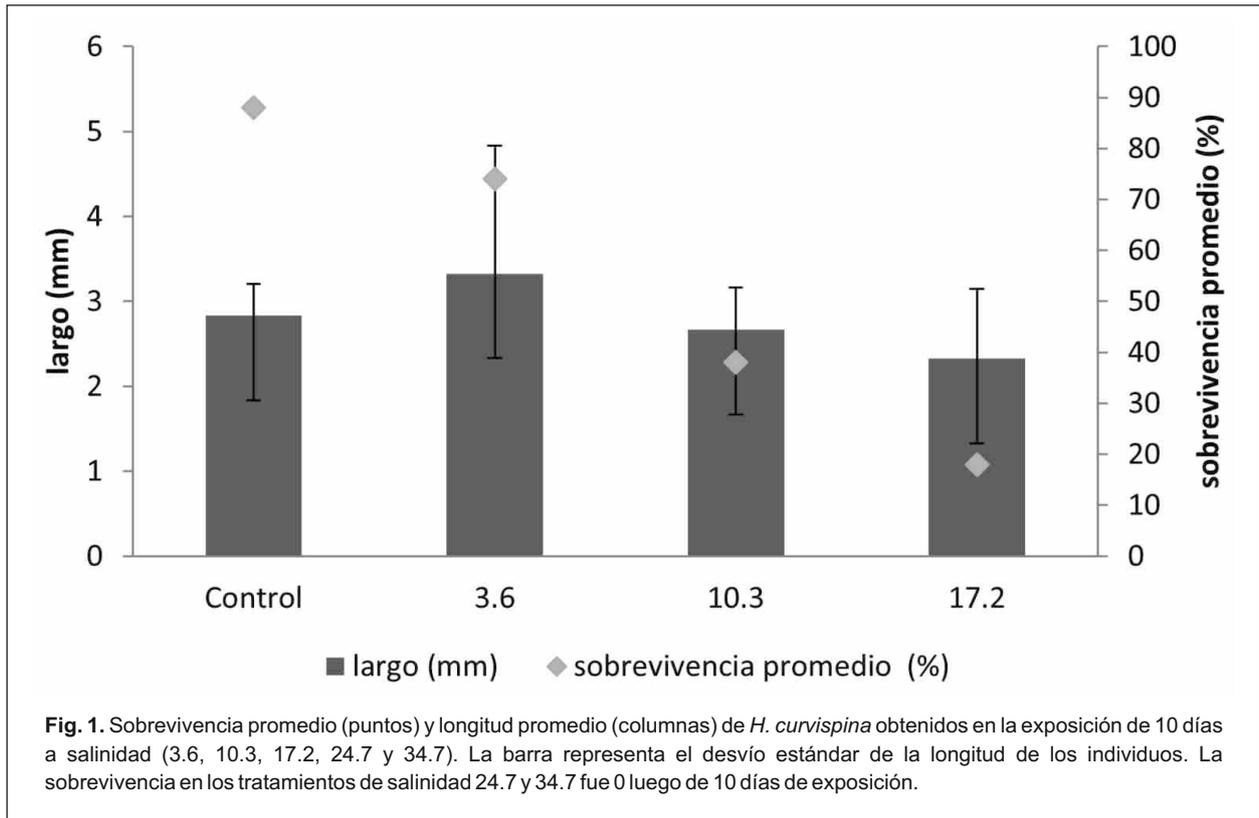
En cuanto a la salinidad, las LC50 estimadas fueron: LC50 96h = 13, LC50 10 días = 11. Para los tratamientos de mayor salinidad (aprox. 24- 35), el registro de sobrevivencia de organismos a las 96 horas fue cero, para los tres ensayos realizados.

Se encontró una inhibición del crecimiento significativa del 18% respecto al control en los organismos expuestos a 17.2 de salinidad (ANCOVA,  $F=3.31$ ,  $p=0.049$ ). La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de salinidad donde se realizó también la evaluación del crecimiento.

Para el fenantreno no fue posible calcular la concentración letal por no obtenerse respuesta letal significativa en ninguno de los tratamientos, para exposiciones de 96 horas y de 10 días. La sobrevivencia promedio en el control y en todos los tratamientos aplicados fue mayor al 80% (Fig. 2).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La LC50 96h promedio obtenida para el cobre (184  $\mu\text{g Cu/l}$ ) está en concordancia con los valores reportados para este género (Tabla 5). El coeficiente de variación (CV) considerando los cuatro 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

congenere *Hyalella azteca* de 31-35 µg Cu/l (West, Mattson, Leonard, Phipps y Ankley, 1993; Phipps, Mattson y Ankley, 1995), pero las diferencias en la dureza del agua sobrenadante podrían explicar la menor sensibilidad al cobre obtenida para *H. curvispina*. En dichos trabajos (West et al., 1993;

**Tabla 4.** Resultados obtenidos en los ensayos de caracterización de la sensibilidad de *H. curvispina*, en fase acuosa. NA: no analizado. NC: no calculado. Valores entre paréntesis corresponden al desvío estándar de las medidas.

Nº Ensayo- Tratamiento aplicado	Tiempo: LC50 (intervalo de confianza 95%)	Crecimiento
1-Salinidad	96 h: 12.1 (9.7-15) 10 días: 8.5 (7.0-10.2)	18% inhibición para salinidad=17, en ensayo de 10 días)
2-Salinidad	96 h: 11.6 (10.5-11.8) 10 días: 10.0 (8.2-12.1)	NA
3-Salinidad	96 h: 15.6 (14.4-17.0). 10 días: 13.9 (12.4-15.5)	NA
4-Cobre	96 h: 213.0 µg Cu/l (152.7-292.1)	NA
5-Cobre	96 h: 220.8 µg Cu/l (157.6-342.8)	NA
6-Cobre	96 h: 193.3 µg Cu/l (95.9-334.2)	NA
7-Cobre	96 h: 108.6 µg Cu/l (94.2-125.1) 10 días: 68 µg Cu/l (59.7-76.6)	NA
8-Fenantreno	NC- Supervivencia mayor al 80% en todas las concentraciones testeadas, en las exposiciones de 96 h y en 10 días	NA

Phipps et al., 1995) se utilizó agua de dilución de entre 40-47 mg/l CaCO<sub>3</sub>, mientras que en el presente trabajo la dureza del agua de dilución estuvo en el entorno de 90 mg CaCO<sub>3</sub>/l. Pelusso (2011) comprobó que una disminución de aproximadamente 60% en la dureza del agua sobrenadante genera un aumento de tres veces en la sensibilidad al cobre de juveniles de *H. curvispina*. Otros trabajos han demostrado también que el aumento de la dureza del medio ejerce un efecto protector frente a la toxicidad por metales (USEPA, 1984; Deaver y Rodgers, 1996).

En relación a la salinidad, los valores de LC50 promedio obtenidos de 13 (96 h) y 11 (10 días) son menores que los reportados por Nebeker y 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 mayores condiciones de stress frente a la salinidad. Otros investigadores (Lee y Petersen, 2003; Delgado, Guerao y Ribera, 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 este es un potencial factor de confusión, por lo que debe controlarse durante la realización de los ensayos. Entendemos que es posible su uso, siempre y cuando se utilice medio de cultivo (agua dulce) como agua sobrenadante al sedimento, siendo estas condiciones las establecidas en los protocolos de ensayos para anfipodos del mismo género (Environment Canada, 1997; USEPA, 2000). En caso de que en dichas condiciones la salinidad resultante en el agua sobrenadante excediera lo tolerable para *H. curvispina*, sería recomendable realizar el test en modo de renovación del agua sobrenadante, en lugar de utilizar condiciones estáticas.

Los tratamientos con fenantreno aplicados en el presente trabajo se definieron en base una revisión bibliográfica respecto a la sensibilidad de otros organismos a este HAP. Otros investigadores calcularon la LC50 para fenantreno en ensayos de fase acuosa en anfipodos resultando entre 150 y 200 µg/l (*Gammarus locusta* (Linnaeus, 1758) y *Gammarus aequicauda* (Martinov, 1931), respectivamente) (Sanz-Lázaro, Marin y Borredat, 2008) y 180 µg/l (con un intervalo de confianza entre 160 - 230) para *H. azteca* (Tani et al., 2021). Por otro lado, Wu et al. (2015) analizaron la toxicidad del fenantreno en ocho especies acuáticas abarcando peces, crustáceos, anélidos e insectos. En dicha investigación encontraron un amplio rango de respuestas, siendo *Daphnia magna* (Straus, 1820) la especie más sensible al fenantreno con una LC50 96h de 275 µg/l.

**Tabla 5.** Valores de LC50 cobre reportados en la literatura para otras especies del género *Hyalella*.

Organismo	LC50 (mg Cu/l)	Duración	Referencia
<i>H. curvispina</i>	0.184	96 h	
	0.067	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 y 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	96 h	
	0.0526	7 días	
	0.0672	10 días	Suedel et al. 1996
<i>H. azteca</i>	0.056	7 días	Borgmann et al. 2005

Los niveles de fenantreno y de PAHs en la columna de agua de los ecosistemas acuáticos pueden ser muy variables. Por ejemplo, la concentración máxima de fenantreno encontrada en el monitoreo de las cuencas de los ríos Rhin y Meuse (Holanda) durante el período 2006-2010 fue de 1 µg/l (Verbruggen y van Herwijnen, 2011), mientras que en la Bahía de Guanabara (Brasil) el valor máximo de fenantreno fue de 322 ng/l (Freitas, De Almeida y Aquino, 2007).

A la mayor concentración de fenantreno aplicada en la presente investigación (200 µg/l) la sobrevivencia de los organismos expuestos 96 horas y 10 días fue mayor al 80 %. Si bien los resultados obtenidos podrían sugerir que *H. curvispina* presenta una mayor tolerancia al fenantreno que otros anfípodos, esta aseveración requiere ser confirmada, por lo que siguientes investigaciones deberían abarcar una serie de tratamientos en un rango de concentraciones superiores a este nivel, de modo de proporcionar mortalidades parciales en dos o más concentraciones y permitir el cálculo de una LC50 con límites de confianza aceptablemente estrechos.

Los resultados aquí presentados constituyen el primer acercamiento al conocimiento de la sensibilidad de *H. curvispina* frente a la salinidad y al fenantreno. Asimismo, constituyen el primer reporte para *H. curvispina* de exposición de 10 días a cobre, siendo que para la exposición de 96 h al cobre se encuentran en el orden de los reportados en la literatura. Los resultados de tolerancia a la salinidad apoyan el uso de *H. curvispina* como organismo adecuado para la evaluación de la toxicidad de sedimentos estuarinos, así como para la evaluación de la toxicidad de sedimentos y agua dulce. Nuestros resultados sugieren que *H. curvispina* podría presentar mayor tolerancia que otras especies de anfípodos frente al fenantreno, y para determinar la LC50 deberían ensayarse exposiciones a concentraciones mayores a las aplicadas en este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue posible gracias a la beca de maestría (POS\_2011\_1\_3579) financiada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación otorgada a MEB. También PM agradece al SNI-ANII, UdelaR y a la Intendencia de Montevideo por el apoyo brindado para financiar parte de la investigación. Gracias extendidas a varios colegas de Oceanografía y Ecología Marina (Fcién-Udelar) por haber colaborado durante diferentes etapas en el marco del proyecto de maestría del cual deriva el presente trabajo. El manuscrito se enriqueció gracias a los comentarios/correcciones de dos revisores anónimos. Un agradecimiento a la SZU por haber permitido la realización del número especial del Boletín en homenaje al Dr. JM Clemente, gran colega y amigo, ¡te extrañamos Checho!

## BIBLIOGRAFÍA

- Amiard-Triquet, C. (2015). Introduction. En: C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard y C. Mouneyrac (Eds.) *Aquatic Ecotoxicology* (pp. 1–23). Academic Press.
- Borgmann, U., Couillard, Y., Doyle, P. y Dixon, D.G. (2005). Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(3), 641–652.
- Bouvier, M.E., Pérez, A. y Muniz, P. (2013). A simple Home-Made Turbidimeter (HMT) for turbidity measurements using *Hyalella curvispina* Shoemaker 1942 (Crustacea: Amphipoda) for the assessment of environmental quality of coastal waters. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(3), 169–206.
- Brooks, S.J. y 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.
- Ccme.ca. 1999. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). [online] Disponible en: <<https://ccme.ca/en/res/polycyclic-aromatic-hydrocarbons-pahs-en-canadian-water-quality-guidelines-for-the-protection-of-aquatic-life.pdf>> [Recuperado el 25 de noviembre de 2021].
- Casado-Martinez, M.C., Beiras, R., Belzunce, M.J., Gonzalez-Castromil, M.A., Marin-Guirao, L., Postma, J.F., ... DelValls, T.A. (2006). Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV. Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods. *Ciencias Marinas*, 32(1B), 149–157
- Casset, M.A., Momo, F.R. y 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.
- Chapman, P.M. y Wang, F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 3–22.
- Deaver, E. y Rodgers, J.H. (1996). Measuring bioavailable copper using anodic stripping voltammetry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(11), 1925–1930.
- Del Brio, J., Montagna, C.M., Lares, B.A., Parolo, M.E. y Venturino, A. (2018). Chemical characterization and toxicity of water-accommodated fraction of oil on the South American native species *Hyaella curvispina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60, 209–215.
- Delgado, L., Guerao, G. y Ribera, C. (2011). Effects of different salinities on juvenile growth of *Gammarus aequicauda* (Malacostraca: Amphipoda). *International Journal of Zoology*, 2011, (Article ID 248790), 6p.
- Environment Canada. (1992). Biological test method: acute test for sediment toxicity using marine and estuarine amphipods. EPS 1/RM/26. Environmental Protection, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario.
- Environment Canada. (1997). Environmental Protection Series. Biological Test Method: Test for survival and growth in sediment using the freshwater amphipod *Hyaella Azteca*. EPS 1/RM/33.
- Freitas Da Silva, T., De Almeida Azevedo, D. y Aquino Neto, F.R. (2007). Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(3), 628–637.
- FREPLATA (2001). Catálogo ilustrado de los organismos zoobentónicos colectados en la campaña de prospección ambiental del Río de la Plata.
- Gauthier, P.T., Norwood, W.P., Prepas, E.E., Pyle, G.G. (2016). Behavioural alterations from exposure to Cu, phenanthrene, and Cu-phenanthrene mixtures: linking behaviour to acute toxic mechanisms in the aquatic amphipod, *Hyaella azteca*. *Aquatic Toxicology*, 170, 377–383,
- Giorgi, A. y 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. y 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. y 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.
- Graça, M., Rodrigues-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.
- Grosso, L.E. y Peralta, M. (1999). Anfípodos de agua dulce Sudamericanos. Revisión del género *Hyaella* Schmitt. I. *Acta Zool. Lilloana*, 45, 79–98.
- Ingersoll, C.G. (1995). Sediment toxicity tests. En: Rand, G.M. (Ed.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (pp. 231–256). 2nd ed. Taylor and Francis, Washington, DC.
- Jergentz, S., Pessacq, P., Mugni, H., Bonetto, C. y 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.
- Lee, C.M. y 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.
- Lotufo, G.R. y 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. & Ho, K.T. (1993). Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. En: Calow, P. (Ed.) *Handbook of Ecotoxicology* (pp. 193–226). Vol.1. 1<sup>st</sup> ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Mugni, H., Paracampo, A., Demetrio, P., Pardi, M., Bulus, G., Ronco, A. y Bonetto, C. (2016). Toxicity Persistence of Chlorpyrifos in Runoff from Experimental Soybean Plots to the Non-target Amphipod *Hyalella curvispina*: Effect of Crop Management. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 257–264.
- National Research Council. (1985). *Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Nebeker, A.L. y Miller, C.E. (1988). Use of the amphipod crustacean *Hyalella azteca* in freshwater and estuarine sediment toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7(12), 1027–1033.
- 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. y Ronco, A.E. (2011). *Hyalella curvispina* (Amphipoda) as a test organism in laboratory toxicity testing of environmental samples. *Environmental Bulletin*, 20, 372–376.
- Phipps, G.L., Mattson, V.R. y 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. y 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. y Momo, F. (2003). Composición y dinámica poblacional de *Hyalella curvispina* en el arroyo Las Flores (Cuenca del río Luján). *Biología Acuática*, 20.
- Pyle, G.G. y 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. y Mc Carthy, L.S. (1995). Introduction to aquatic toxicology. En: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology* (pp. 3–67). 2nd ed. Taylor and Francis, Washington, DC.
- RIKZ. (1999). The 10d marine amphipod *Corophium volutator* mortality sediment toxicity test. Standard Operating Procedure Nr: SPECIE-01. National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ), The Netherlands, p. 17.
- Saigo, M., Marchese, M. y Montalto, L. (2009). Hábitos alimentarios de *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 (Amphipoda: Gammaridea) en ambientes lénticos de la llanura aluvial del Río Paraná medio. *Natura Neotropicalis*, 40, 1y2: 43–59.
- Sanz-Lázaro, C., Marin, A., y Borredat, M. (2008). Toxicity Studies of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on European Amphipods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18(4), 323–327.
- Solis, M., Paracampo, A., Bonetto, C. (2019). Acute Toxicity of Chlorpyrifos to *Hyalella curvispina*: Comparison of species sensitivity and assessment of environmental risk. *Environmental Processes*, 6, 107–117.
- Somma, A., Giusto, A. y Ferrari, L. (2011). Manual de producción de *Hyalella curvispina* en laboratorio. 1a ed. - *Ushuaia: Utopías*, 2011.25p.
- Suedel, B.C., Deaver, E. y 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.
- Tani, K., Watanabe, H., Noguchi, M., Hiki, K., Yamagishi, T., Tatarazako, N. y Yamamoto, H. (2021). Toxicity assessment of typical polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in water-only and sediment–water exposure systems. *Science of The Total Environment*, 784, 147156.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1984). Ambient water quality criteria for copper. [online] Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-03/documents/ambiente-wqc-copper-1984.pdf> [Recuperado el 25 de noviembre de 2021].
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1994). Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA/600/R- 94/025. Office of Research and Development, Narragansett, RI.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. 2<sup>nd</sup> edition EPA/600/R-99/064. Office of Water, Office of Science and Technology. 192p.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (2007). Aquatic life criteria-copper. [online] Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2019-02/documents/al-freshwater-copper-2007-revision.pdf> [Recuperado el 25 de noviembre de 2021].
- UTHSCSA Image Tool. desarrollado por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas. Disponible en <https://imagetool.software.informer.com/> Descarg

- ar-gratis/\_ [Recuperado el 25 de noviembre de 2021].
- Verbruggen, E.M.J. y van Herwijnen, R. (2011). Environmental risk limits for phenanthrene. National Institute for Public Health and the Environment- Ministry of Health, Welfare and Sport. RIVM Letter report 601357007.
- Verrhiest, G., Clement, B. y Blake, G. (2001). Single and combined toxicity of sediments-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology*, 10: 363–372.
- Waller, A., Ramos, T. y Verdi, A. (2020). Estructura poblacional y aspectos reproductivos de una población de *Hyalella curvispina* (Shoemaker, 1942) de Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica de Uruguay*, 29(2), 106–115.
- West, C.W., Mattson, V.R., Leonard, E.N., Phipps, G.L. y 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.
- Wu, J.; Yan, Z., Liu, Z., Liu, J., Liang, F., Wang, X. y Wang, W. (2015). Development of water quality criteria for phenanthrene and comparison of the sensitivity between native and non-native species. *Environmental Pollution*, 196, 141–146.

Editor de Sección: Mariana Meerhoff