

## VARIABILIDAD DEL ENSAYO ECOTOXICOLÓGICO CON *Chironomus calligraphus* Goeldi (DIPTERA: CHIRONOMIDAE) PARA EVALUAR CADMIO, MERCURIO Y PLOMO

José Alberto Iannacone Oliver<sup>1</sup>, Neil Salazar Capcha<sup>1</sup> y Lorena Alvarino Flores<sup>1</sup>

### Resumen

En la evaluación del riesgo ambiental (ERA) de los ambientes acuáticos contaminados por relaves mineros en el Perú se requiere del empleo de organismos biológicos estandarizados como la larva del insecto *Chironomus calligraphus* Goeldi. Los organismos biológicos para ser usados como herramientas ecotoxicológicas requieren ser sencillos, prácticos, sensibles y repetibles. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> en forma de cloruro de cadmio (CdCl<sub>2</sub>), cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) y nitrato de plomo (Pb<sub>3</sub>(NO)<sub>2</sub>) respectivamente, sobre la mortalidad de las larvas de primer estadio del díptero *C. calligraphus* a 48 h de exposición y así determinar su variabilidad. La especie fue aclimatada y criada en condiciones estandarizadas de laboratorio. Se realizaron seis bioensayos de toxicidad aguda estáticos para cada metal, en cada bioensayo se siguió un diseño experimental en bloques completamente randomizados (DBCR): cuatro repeticiones con seis concentraciones y empleándose 240 larvas por bioensayo. La Concentración Letal media (CL<sub>50</sub>) en µg del metal L<sup>-1</sup> a 48 h de exposición y el coeficiente de variación (CV %) fueron: 132 µg L<sup>-1</sup> y 45,45 % para Cd<sup>2+</sup>; 127 µg L<sup>-1</sup> y 22,83 % para Hg<sup>2+</sup>; y finalmente 18.730 µg L<sup>-1</sup> y 33 % para Pb<sup>2+</sup>. La variabilidad del ensayo con *C. calligraphus* es comparada con otros organismos biológicos dulceacuícolas al nivel mundial.

**Palabras clave:** Bioensayo, *Chironomus*, cadmio, ecotoxicología, macroinvertebrado, mercurio, plomo, repetibilidad.

### Abstract

Environmental Risk Assessment (ERA) of freshwater environment in Peru needs the employment of standardized biological organisms such as the larval midge *Chironomus calligraphus* Goeldi. The biological organisms to be employed as ecotoxicological tools should be easy, practical, sensitive and reproducible. The aim of this research was to evaluate Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> as cadmium chlorure (CdCl<sub>2</sub>), mercury chlorure (HgCl<sub>2</sub>) and lead nitrate (Pb<sub>3</sub>(NO)<sub>2</sub>) forms, on the mortality of first instar larva of diptera *C. calligraphus* at 48 h exposure and in this way determinate its variability. The species was acclimated and reared under standardized laboratory conditions. Six bioassays of acute static toxicity for each metal were done, in each one a randomized block experimental design (RBED) was used with four repetitions of five concentrations and employing 240 larvae for each bioassay. The median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) in µg metal L<sup>-1</sup> at 48 h exposure and the coefficient of variation (CV %) were: 132 µg L<sup>-1</sup> and 45,45 % for Cd<sup>2+</sup>; 127 µg L<sup>-1</sup> and 22,83 % for Hg<sup>2+</sup>; and finally 18.730 µg L<sup>-1</sup> and 33 % for Pb<sup>2+</sup>. The variability of the essay of *C. calligraphus* is compared with other freshwater biological organisms all over the world.

**Key words:** Bioassay, *Chironomus*, cadmium, ecotoxicology, lead, macroinvertebrate, mercury, repeatability.

### Introducción

La ecotoxicología es la ciencia que describe y predice el comportamiento de las sustancias en el medio ambiente y las respuestas biológicas del sistema para así, finalmente evaluar el riesgo asociado con estas emisiones (Delvalls & Conradi, 2000). Los bioensayos ecotoxicológicos en el laboratorio con un determinado organismo biológico y el uso de controles permiten predecir el efecto de las sustancias químicas tóxicas (Calow, 1993). Los organismos biológicos para ser usados como herramientas

ecotoxicológicas requieren ser sencillos, prácticos, sensibles y repetibles (Iannacone *et al.*, 1998; Alayo & Iannacone, 2002). La APHA (1989) señala como protocolos estandarizados para la realización de bioensayos de toxicidad aguda y crónica acuática a las larvas de los insectos quironómidos, principalmente *Chironomus tentans* Fabricius, *Chironomus riparius* Meigen y *Chironomus plumosus* (Linnaeus) (Mereggalli *et al.*, 2002; Lahr *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2003). Estos mosquitos quironómidos son abundantes en los ambientes dulceacuícolas y

<sup>1</sup> Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional Federico Villarreal (FCCNM-UNFV). Calle San Marcos 383, Lima 21, Perú.  
Correo electrónico: joseiannacone@hotmail.com / joselorena@terra.com.

componente importante en las comunidades acuáticas detritívoras (Iannacone *et al.*, 2000; Crane *et al.*, 2002; Sánchez & Tarazona, 2002).

*Chironomus calligraphus* Goeldi, es un insecto Pan-Americano, de distribución predominantemente Neotropical, y que también ocurre en la región Neártica Sur, muy común en los ambientes acuáticos epicontinentales de la ciudad de Lima, Perú (Iannacone *et al.*, 1999, 2000; Spies *et al.*, 2002). *C. calligraphus* ha demostrado una alta sensibilidad a metales pesados (Iannacone *et al.*, 1998; Iannacone & Dale, 1999; Arrascue *et al.*, 2001) y a plaguicidas (Iannacone & Alvarino, 1998, 2000). Para la evaluación del riesgo ambiental (ERA) de los ambientes acuáticos epicontinentales en el Perú se requiere del empleo de organismos biológicos estandarizados como la larva del insecto *C. calligraphus*.

Los metales pesados, como el cadmio, mercurio y plomo, producen efectos deletéreos en las aguas naturales (Weber, 1996; Iannacone & Alvarino, 1999; Fernández & Beiras, 2001).

En Latinoamérica existen algunas experiencias de ejercicios de intra e intercalibración empleando baterías de bioensayos, que incluyen artrópodos, para la evaluación de tóxicos de referencias con el fin de determinar el grado de repetibilidad, precisión o variabilidad de estas pruebas ecotoxicológicas (Forget *et al.*, 2000). Así se han realizado en países como Argentina (Ronco *et al.*, 2000), Chile (Castillo & Schäfer, 2000; Castillo *et al.*, 2000a), Colombia (Díaz-Baez & Perez, 2000), Costa Rica (Castillo *et al.*, 2000b) y México (Pica *et al.*, 2000). En el Perú, aún no se tienen este tipo de experiencias para los bioensayos ecotoxicológicos.

Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de variabilidad o repetibilidad del bioensayo que emplea a *C. calligraphus* usando al cadmio, mercurio y plomo como tóxicos de referencia.

## Materiales y métodos

### *Chironomus calligraphus*

La colección, identificación y cría estandarizada de *C. calligraphus*, así como el protocolo de bioensayo siguió el procedimiento detallado descrito por Iannacone *et al.* (2002a). Los ensayos ecotoxicológicos con *C. calligraphus* se iniciaron con larvas de primer estadio dentro de 24 h de haber eclosionado de las masas de huevos procedente de la Planta de Tratamiento de Aguas residuales domésticas de Villa El Salvador, Lima, Perú durante el 2000 al 2001. Los ejemplares se separaron al azar de los frascos de eclosión y recuperación de las larvas de primer estadio. Diez larvas de primer estadio se distribuyeron al azar en cada concentración de las muestras con metales evaluadas en cada una de las cuatro repeticiones del ensayo experimental. Cada repetición incluyó cinco concentraciones ensayadas y

el control. Las larvas se consideraron muertas si no fueron capaces de moverse coordinada y normalmente cuando fueron pinchadas ligeramente con un alfiler luego de 48 h de exposición. Se emplearon un total de 240 larvas por ensayo. Los bioensayos fueron repetidos seis veces secuencialmente. El pH se midió mediante un potenciómetro. El pH se midió en dos réplicas al inicio del ensayo y a las 48 h de exposición. La temperatura se mantuvo regulada a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Metales y Físico-química del agua

Las soluciones madre para los iones tóxicos de cadmio, mercurio y plomo fueron preparadas de la sal metálica a base del cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ), cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) y nitrato de plomo ( $\text{Pb}_3(\text{NO}_3)_2$ ) a una concentración de  $100\text{ mg L}^{-1}$ . Todas las concentraciones se registraron en concentraciones nominales de ión de metálico. Los matraces aforados previamente fueron lavados con ácido nítrico al 10 % y luego enjuagados en agua destilada y mantenidos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Iannacone *et al.*, 2000). El pH fue ajustado al inicio del ensayo a 7 con una solución  $\text{NaOH}$  0,1M o con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M. Los datos de oxígeno disuelto se midieron mediante el método de Winkler (APHA, 1989). En el ensayo con  $\text{Cd}^{2+}$  se emplearon las siguientes cinco concentraciones  $125\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $250\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1.000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  y  $2.000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . En el ensayo con  $\text{Hg}^{2+}$  se emplearon las siguientes cinco concentraciones  $62,5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $125\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $250\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  y  $1.000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . En el ensayo con  $\text{Pb}^{2+}$  se emplearon las siguientes cinco concentraciones  $6.250\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $12.500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $25.000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $50.000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  y  $100.000\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ . Para el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  las cinco concentraciones siguieron un factor de incremento de 2. Las principales características fisicoquímicas del agua destilada son las indicadas por Iannacone *et al.* (2002b).

### Diseño Experimental y Análisis de datos

Se determinaron la Concentración Letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) promedio, su desviación estándar y su Coeficiente de Variación (CV %) para los bioensayos de *C. calligraphus* expuestos al cadmio, mercurio y plomo utilizando los resultados de las sumas de las cuatro repeticiones de cada concentración. Las diferencias entre las concentraciones se evaluaron a través de un Análisis de Varianza (ANDEVA), previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la distribución normal (Zar, 1996). Se utilizaron los bioensayos como bloques y las variables respuestas provinieron de las sumas de las cuatro repeticiones de cada concentración de cada ensayo. En el caso de existir diferencias significativas entre las concentraciones se realizó una Prueba de Significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey (Daniel, 1993).

Las  $\text{CL}_{50}$ s se calcularon usando un programa computarizado de la EPA versión 1,5 -1993 (USEPA,

1993). Estos valores fueron obtenidos a partir del análisis de regresión lineal entre el logaritmo de la concentración de las muestras con metales y la mortalidad Probit (porcentaje transformado). Estos modelos de regresión lineal fueron verificados usando el estadístico  $\chi^2$  (Martín & Holdich, 1986). Se calcularon los valores de NOEC (Concentración de efectos no observables) y LOEC (Concentración más baja de efectos observables) para cada metal.

### Resultados

La secuencia en orden de toxicidad de *C. calligraphus* expuesto a los tres metales fue:  $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+}$  (Tabla 1).

Las Tablas 2, 3 y 4 señalan los porcentajes de mortalidad para cada una de las cinco concentraciones y el control en cada una de los seis bioensayos para el cadmio, mercurio y plomo, respectivamente. Para todos los casos el CV (%) fue menor del 50 %, a excepción del control del ensayo con cadmio que fue del 75,42 %. Sin embargo, en ninguno de los casos la mortalidad en el control sobrepasó el 20 %. La prueba de Tukey mostró que el LOEC para el  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  fue de 62,5, 125 y 6.250  $\mu g L^{-1}$ , respectivamente. En cambio, el NOEC para el  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  fue de  $< 62,5 < 125$  y  $< 6.250 \mu g L^{-1}$ , respectivamente.

Para *C. calligraphus*, el valor promedio de la  $CL_{50}$  al cadmio de 132  $\mu g L^{-1}$  ocupa la posición tercera en comparación a otras diez especies del género *Chironomus* (Tabla 5).

Para *C. calligraphus*, el valor promedio de la  $CL_{50}$  al mercurio de 130  $\mu g L^{-1}$  ocupa la posición cuarta en comparación a otras siete especies del género *Chironomus* (Tabla 6). Para *C. calligraphus*, el valor promedio de la  $CL_{50}$  al plomo de 18.732  $\mu g L^{-1}$  ocupa la posición primera en comparación a otras siete especies del género *Chironomus* (Tabla 7). La Tabla 8, señala que *C. calligraphus* ocupa la posición 12<sup>va</sup> (para el  $Hg^{2+}$ ), 15<sup>va</sup> (para el  $Pb^{2+}$ ) y 18<sup>va</sup> (para el  $Cd^{2+}$ ) entre 29 bioensayos ecotoxicológicos empleando diferentes componentes de la biota animal.

### Discusión

Las especies propuestas como herramientas para bioensayos ecotoxicológicos, requieren como requisitos para uso no solo que sean sensibles, sino que los ensayos sean reproducibles con poca variabilidad en su respuesta (Magdaleno *et al.*, 1997; Steevens & Benson, 1998). *C. calligraphus* es una especie con alta sensibilidad a metales pesados, plaguicidas y a muestras ambientales (Iannacone *et al.*, 2000; Arrascue *et al.*, 2001). Sus valores de  $CL_{50}$  para el cadmio, mercurio y plomo tienen en general el mismo orden de magnitud que otras especies del género (Tablas 5, 6 y 7). En un estudio previo, Iannacone & Dale (1999) encontraron una sensibilidad de *C. calligraphus* al mercurio (seis veces mayor); al plomo (cinco veces menor) y al mercurio (dos veces

menor que la encontrada en el presente estudio). Sin embargo estos resultados correspondieron para cada metal a un bioensayo sin repeticiones.

Entre los numerosos factores bióticos que pudieran influir en la toxicidad del cadmio, mercurio y plomo sobre las especies de la familia Chironomidae, tenemos a la especie, estado de desarrollo y edad. Los valores comparativos de  $CL_{50}$  expuestos al cadmio, mercurio y plomo para las diferentes especies del *Chironomus* señalados en la Tablas 5, 6 y 7 señalan diferencias por ser especies diferentes, así como estados de desarrollo y edades diferentes por ser utilizados formas larvianas del primer al cuarto estadio. En general se considera que las formas larvianas de estadios tempranos son más sensibles que los estadios superiores (Tablas 5, 6 y 7). Las larvas de primer estadio (plantónicas) son más sensibles que las de segundo estadio (bentónicas) de *C. riparius* y de las de cuarto estadio (bentónicas) de *C. decorus*. Además, entre los factores abióticos se señala al tiempo de exposición como un factor de importancia que influiría en la ecotoxicidad de los tres metales pesados (Peck *et al.*, 2002).

Los coeficientes de variación (CV %) obtenidos para los 29 ensayos empleando especies biológicas acuáticas pertenecientes a diferentes taxas, variaron entre 2,1 a más de 100 % (Tabla 8). El ensayo con *C. calligraphus* ocupa la posición 12<sup>va</sup>, 15<sup>va</sup> y 18<sup>va</sup> para  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Cd^{2+}$ , respectivamente, el cual fue aceptable al ser menor al 50 %. Uno de los factores que estaría influyendo en la variabilidad encontrada en el ensayo estático de mortalidad con *C. calligraphus* expuestos a los tres metales a 48 h de exposición, es la estación del año y la calidad del agua (contenido de oxígeno, pH, sólidos suspendidos, etc.) del lugar colecta de los organismos, ya que los quironómidos en la fase de huevos son obtenidos de cuerpos de agua artificiales en forma periódica a través de las diferentes estaciones del año y luego criados artificial y parcialmente en condiciones estandarizadas de laboratorio (Milani *et al.*, 2003). Las especies criadas artificialmente en forma continua durante todo su ciclo vital tienden a presentar menor variabilidad en su respuesta que las especies criadas parcialmente y obtenidas en forma periódica del campo (APHA, 1989; Calow, 1993).

### Agradecimientos

Al Laboratorio de Ecofisiología Animal de la Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú.

### Literatura citada

Alayo M. & Iannacone J. 2002. Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, Diesel 2 y Diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). Gayana. 66: 45-58.

- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION), AWWA (AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION), WPCF (WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION). 1989. Standard methods for examination of water and wastewater. 17<sup>th</sup>. Ed. American Health Association. Washington, D.C.
- Arrascue A., Iannacone J., Alvarino L., Basilio S. & Lazcano C. 2001. El insecto *Chironomus calligraphus* Goeldi y la bacteria *Escherichia coli* como ensayos ecotoxicológicos para evaluar sedimentos elutriados dulceacuicolas. Rev. per. Ent. 42: 159-173.
- Calow P. 1993. Handbook of ecotoxicology. 478 p. Vol. I. Blackwell Science, Sheffield, UK.
- Castillo G.C. & Schäfer L. 2000. Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: A Chilean experience. Environm. Toxicol. 15: 331-337.
- Castillo G.C., Vila I.C. & Neild E. 2000a. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. Environm. Toxicol. 15: 370-375.
- Castillo L.E., Pinnock N. & Martinez E. 2000b. Evaluation of a battery of toxicity tests for use in the assessment of water quality in a Costa Rican laboratory. Environm. Toxicol. 15: 312-321.
- Crane M., Sildanchandra W., Kheir R. & Callaghan R. 2002. Relationships between biomarker activity and development endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. Ecotoxicol. Environm. Saf. 53: 361-369.
- Daniel W.W. 1993. Bioestadística. Tercera Edición. Editorial Limusa (México).
- Delvalls T.A. & Conradi M. 2000. Advances in marine ecotoxicology: laboratory tests versus field assessment data on sediment quality studies. Ciencias Marinas. 26: 39-64.
- Díaz-Baez M.C. & Perez J.B. 2000. Intralaboratory experience with a battery of bioassays: Colombia experience. Environm. Toxicol. 15: 297-303.
- Espiritu E.Q., Janssen C.R. & Persoone G. 1995. Cyst-based toxicity tests. VII. Evaluation of the 1-h enzymatic inhibition test (Fluotox) with *Artemia nauplii*. Environm. Toxicol. Water Qual. 10: 25-34.
- Fargasova A. 2001. Winter third- to fourth- instar larvae of *Chironomus plumosus* as bioassay tools for assessment of acute toxicity of metals and their binary combinations. Ecotoxicol. Environm. Saf. 48: 1-5.
- Fernández N. & Beiras N. 2001. Combined toxicity of dissolved mercury with Copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. Ecotoxicol. 10: 263-271.
- Forget G., Sánchez A., Arkhipchuk V., Beaugregard T., Blaise C., Castillo G., Castillo L.E., Diaz-Baez M.C., Pica Y.G., Ronco A., Srivastava R.C. & Dutka B.J. 2000. Preliminary data of a single-blind, multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring. Environm. Toxicol. 15: 362-369.
- Greene J.C., Miller W.E., De Bacon M.K., Long M. A. & Bartel S. 1985. A comparison of three microbial assay procedures for measuring toxicity of chemical residues. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 14: 659-667.
- Iannacone J., Dale W. & Alvarino L. 2000. Monitoreo ecotoxicológico del río Rímac (Lima-Perú) empleando a *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). Rev. Chil. Ent. 27: 25-34.
- Iannacone J., Alvarino L. & Gutierrez A. 1999. Cinco ensayos ecotoxicológicos para evaluar metales pesados en el agua dulce. Bol. Soc. Quím. Perú 65: 30-45.
- Iannacone J. & Alvarino L. 1998. Ecotoxicidad aguda del insecticida organofosforado temephos sobre *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: chironomidae). Acta Ent. Chilena. 22: 51-53.
- Iannacone J. & Alvarino L. 1999. Acute ecotoxicity of heavy metals using juveniles of freshwater snail *Physa venustula* (Gould, 1847) (Mollusca). Gayana. 63: 101-110.
- Iannacone J. & Alvarino L. 2000. *Chironomus calligraphus* Goeldi y *Moina macrocopa* (Sars) como herramientas ecotoxicológicas para la evaluación del lindano y clorpirifos. Bol. Soc. Biol. Concepción (Chile). 71: 33-39.
- Iannacone J. & Dale W.E. 1999. Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y el Crustáceo *Moina macrocopa* (Crustácea: Cladóceras), en el río rímac. Rev. per. Ent. 41: 111-120.
- Iannacone J., Alvarino L. & Dale W.E. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como una herramienta para la evaluación del impacto ambiental de los ecosistemas acuáticos. Bol. Lima (Perú). 113: 53-68.
- Iannacone J., Alvarino L. & Mansilla J. 2002a. Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). Wiñay Yachay. 6: 59-74.
- Iannacone J., Caballero C. & Alvarino L. 2002b. Employing the freshwater snail *Physa venustula* Gould as an ecotoxicological tool for environmental risk assessment by pesticides. Agri. Téc. (Chile). 62: 212-225.

- Janssen C. 1998. Alternative assay for routine toxicity assessments. A review. Chapter 26. pp. 813-839. In: Ecotoxicology. G. Schüürmann, Markert B. Eds.
- Khangarot B.S. & Ray P.K. 1989. Sensitivity of midge larvae of *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera Chironomidae) to heavy metals. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 42: 325-330.
- Lahr J., Maas-Diepeveen J.L., Stuijzand S.C., Leonards P.E., Druke J.M., Lucker S., Espeldoorn A., Kerkum L.C., van Stee L.L. & Hemdriks A.J. 2003. Response in sediment bioassays used in the Netherlands: can observed toxicity be explained by routinely priority pollutants?. Water Res. 37: 1691-1710.
- Magdaleno A., Gomez C.E., Velez C.G. & Accorinti J. 1997. Preliminary toxicity test using the green alga *Ankistrodesmus falcatus*. Environm. Toxicol. Water Qual. 12: 11-14.
- Martin T.R. & Holdich D.M. 1986. The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to freshwater asellids and gammarids). Water Res. 20: 1137-1147.
- Martinez E.A., Moore B.C., Schaumlöffel J. & Dasgupta N. 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium and copper spiked sediments. Ecotoxicol. Environm. Saf. 55: 204-212.
- Mereggalli G., Bettinetti R., Pluymers L., Vermeulen A.C., Rossaro B. & Ollevier F. 2002. Mouthpart deformities and nucleolus activity in field-collected *Chironomus riparius* larvae. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 42: 405-409.
- Milani D., Reynoldson T.B., Borgmann U. & Kolasa J. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. Environ. Toxicol. Chem. 22: 845-854.
- Postma J.F., Buckert de Jong M.C., Staats N. & Davids C. 1994. Chronic toxicity of cadmium to *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) at different food levels. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 26: 143-148.
- Peck M.R., Klessa D.A. & Baird D.J. 2002. A tropical sediment toxicity test using the dipteran *Chironomus crassiforceps* to test metal bioavailability with sediment pH change in tropical acid-sulfate sediments. Environm. Toxicol. Chem. 21: 720-728.
- Persoone G. 1996. Development and first validation of a "culture free" algal microbiotest: the algaltokit. In: Microscale toxicology, advances, techniques and practice, Wells, P.G., Lee K., Blaise, C. (eds.). CRC Publishers.
- Pica G.Y., Trujillo G.D. & Hernández H.S. 2000. Bioassay standardization for water quality monitoring in Mexico. Environm. Toxicol. 15: 322-330.
- Qureshi S.A., Sakesena A.B. & Singh V.P. 1980. Acute toxicity of four heavy metals to benthic fish food organisms for the River Khan Ujjain. Int. J. Environm. Stu. 15 : 59-61.
- Rao D.S. & Saxena A.B. 1981. Acute toxicity of mercury, zinc, lead, cadmium and manganese to *Chironomus* sp. Int. J. Environ. Stud. 16 : 226-226.
- Reish D.J. 1993. Effect of metals and organic compounds on survival and bioaccumulation in two species of marine gammaridean amphipod, together with a summary of toxicological research on this group. Jour. Nat. History. 27: 781-794.
- Ronco A., Sobrero C., Grassi V., Kaminski L., Massolo L. & Mina L. 2000. WaterTox bioassay intercalibration network: results from Argentina. Environm. Toxicol. 15: 287-296.
- Rossino G.B. & Ronco A.E. 1996. Acute toxicity bioassay using *Daphnia obtusa* as a test organism. Environm. Toxicol. Water Qual. 11: 255-258.
- Sánchez P. & Tarazona J.V. 2002. Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. Aquatic Toxicol. 60: 249-256.
- Snell T.W., Moffat B.D., Janssen C. & Persoone G. 1991. Acute toxicity tests using rotifers: III. Effects of temperature, strain and exposure time on the sensitivity of *Brachionus plicatilis*. Environm. Toxicol. Water Qual. 6: 63-75.
- Spies M., Sublette J.E., Sublette M.F., Wülker W.F., Martin J., Hille A., Miller M.A. & Witt K. 2002. Pan-american *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Diptera: Chironomidae): Species or Complex?. Evidence from external morphology, karyology and DNA sequencing. Aquat. Insects. 24: 91-113.
- Steevens J.A. & Benson W.H. 1998. *Hyaella azteca* 10-day sediment toxicity test: Comparison of growth measurement endpoints. Environm. Toxicol. Water Qual. 13: 243-248.
- USEPA. 1993. Probit analysis program. Version 1,5. U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C. U.S.A.
- Watts M.M. & Pascoe D. 2000. A comparative study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests. Arch. Environm. Toxicol. 39: 299-306.
- Weber D.N. 1996. Lead-induced metabolic imbalances and feeding alterations in juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environm. Toxicol. Water Qual. 11: 45-51.
- Willemsen A., Vaal M.A. & De Zwart D. 1995. Microbiotests as tools for environmental monitoring. National Institute of Public Health and Environmental Planning (RIVM). The Netherlands, report No 9. 607042005.

Zar J.H. 1996. Biostatistical Analysis. 3<sup>th</sup> Ed.  
Prentice –Hall. Inc. Upper Saddle River, Jew  
Jersey.

**Tablas citadas en el texto**

**Tabla 1.** Valores de la CL<sub>50</sub> y sus límites de confianza para los bioensayos realizados con los tres metales pesados.

Repetición	Hg <sup>2+</sup>			Cd <sup>2+</sup>			Pb <sup>2+</sup>		
	L. Inf.	CL <sub>50</sub>	L. Sup.	L. Inf.	CL <sub>50</sub>	L. Sup.	L. Inf.	CL <sub>50</sub>	L. Sup.
1	71	113	154	152	210	264	11.490	19.515	27.782
2	45	83	121	138	179	217	*	19.474	*
3	100	150	200	150	193	232	15.460	22.329	29.062
4	102	152	198	37	86	120	19.620	27.593	34.974
5	86	125	162	15	67	104	9.219	12.748	16.257
6	110	154	197	11	59	99	7.485	10.735	13.915
Promedio	86	130	172	84	132	173	12.660	18.732	24.398
D.E	24	28	32	70	69	73	4.906	6.203	8.961

L. inf. = Límite inferior; CL<sub>50</sub> = Concentración Letal media; L. sup. = Límite superior;  
D.E. = Desviación estándar; (\* ) = No determinado.

**Tabla 2.** Porcentaje de Mortalidad de *C. calligraphus* expuestas al cadmio a 48 h

µg L <sup>-1</sup>	Repeticiones (% mortalidad)						Promedio ± DESig.	CV	
	1	2	3	4	5	6			
control	15	10	10	2,5	2,5	2,5	7,08 ± 5,34	a	75,42
125	32,5	32,5	32,5	67,5	75	77,5	52,92 ± 22,61	b	42,72
250	65	77,5	67,5	92,5	97,5	92,5	82,08 ± 14	c	17,06
500	95	95	97,5	97,5	97,5	97,5	96,67 ± 1,29	d	1,34
1.000	97,5	100	100	100	100	100	99,58 ± 1,02	d	1,02
2.000	100	100	100	100	100	100	100 ± 0	d	0

DE = Desviación Estándar; CV = Coeficiente de Variación; Sig. = Significancia.

**Tabla 3.** Porcentaje de mortalidad de *C. calligraphus* expuestas al mercurio a 48h.

µg/L	Repeticiones (% mortalidad)						Promedio ± DESig.	CV	
	1	2	3	4	5	6			
control	15	12,5	15	17,5	15	12,5	14,58 ± 1,88	a	12,90
62,5	35	47,5	32,5	30	35	25	34,17 ± 7,53	b	22,03
125	70	67,5	52,5	52,5	50	45	56,25 ± 10,09	c	17,94
250	72,5	77,5	67,5	72,5	87,5	75	75,42 ± 6,79	d	9
500	92,5	87,5	95	97,5	95	95	93,75 ± 3,45	e	3,68
1.000	100	100	100	100	100	100	100 ± 0	f	0

DE = Desviación Estándar; CV = Coeficiente de variación; Sig. = Significancia.

**Tabla 4.** Porcentaje de mortalidad de *C. calligraphus* expuestas al plomo a 48 h.

µg L-1	Repeticiones (% mortalidad)						Promedio +/- DE	Sig.	CV
	1	2	3	4	5	6			
Control	17,5	20	10	12,5	10	10	13,33 ± 4,38	a	32,83
6.250	37,5	42,5	25	20	27,5	35	31,25 ± 8,48	ab	27,13
12.500	47,5	55	35	32,5	57,5	62,5	48,33 ± 12,32	bc	25,48
25.000	65	62,5	57,5	47,5	77,5	82,5	65,42 ± 12,89	c	19,70
50.000	75	67,5	80	77,5	95	95	81,67 ± 11,14	d	13,64
100.000	100	100	100	100	100	100	100 ± 0	e	0

DE = Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación; Sig. = Significancia.

**Tabla 5.** Valores comparativos de CL<sub>50</sub> con otras especies de *Chironomus* expuestas al cadmio.

Especie de <i>Chironomus</i>	CL <sub>50</sub> µg L <sup>-1</sup>	Tiempo de Exposición (h)	EstadioReferencia
<i>Chironomus riparius</i> Meigen	13	48	primer Milani <i>et al.</i> (2003)
<i>Chironomus riparius</i> Meigen	16,2	72	cuarto Postma <i>et al.</i> (1994)
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	132	48	primer Original
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	280	48	primer Iannacone & Dale (1999)
<i>Chironomus riparius</i> Meigen	1.200	240	cuarto Watts & Pascoe (2000)
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	1.200	240	cuarto Watts & Pascoe (2000)
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	3.670	24	primer Iannacone & Dale (1999)
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	8.050	48	tercero Khangarot & Ray (1989)
<i>Chironomus plumosus</i> (Linnaeus)	10.000	96	tercero Fargasova (2001)
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	23.250	24	tercero Khangarot & Ray (1989)

**Tabla 6.** Valores comparativos de CL<sub>50</sub> con otras especies de *Chironomus* expuestas al mercurio.

Especie de <i>Chironomus</i>	CL <sub>50</sub> µg L <sup>-1</sup>	Tiempo de Exposición (h)	Estadio Referencia
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	20	48	primer Iannacone & Dale (1999)
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	29	48	tercero Khangarot & Ray (1989)
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	119	24	tercero Khangarot & Ray (1989)
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	127	48	primer Original
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	130	24	primer Iannacone & Dale (1999)
<i>Chironomus tendipes</i>	664	48	tercero Rao & Saxena (1981)
<i>Chironomus</i> sp.	1.800	40	tercero Qureshi <i>et al.</i> (1980)

**Tabla 7.** Valores comparativos de CL<sub>50</sub> con otras especies de *Chironomus* expuestas al plomo.

Especie de <i>Chironomus</i>	CL <sub>50</sub> µg L <sup>-1</sup>	Tiempo de Exposición (h)	Estadio Referencia
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	18.730	48	primer Original
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	34.670	48	tercero Khangarot & Ray (1989)
<i>Chironomus tendipes</i>	50.000	48	tercero Rao & Saxena (1981)
<i>Chironomus tentans</i> Fabricius	52.870	24	tercero Khangarot & Ray (1989)
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	77.180	48	primer Iannacone & Dale (1999)
<i>Chironomus calligraphus</i> Goeldi	13.030	24	primer Iannacone & Dale (1999)
<i>Chironomus</i> sp.	200.000	40	tercero Qureshi <i>et al.</i> (1980)

**Tabla 8.** Variabilidad o repetibilidad de los bioensayos empleando diferentes especies acuáticas.

Taxa	Especie	CV %	Referencia
Pez	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	2,1	Castillo <i>et al.</i> (2000)
Microalga	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	8	Persoone (1996)
Echinodermatha	<i>Paracentrotus lividus</i>	11	Fernández & Beiras (2001)
Bacteria	<i>Vibrio fisheri</i> (Microtox)	12	Janssen (1998)
Celenterado	<i>Hydra attenuata</i>	13	Diaz-Baez & Perez (2000)
Planta	<i>Lactuca sativa</i>	14,9	Forget <i>et al.</i> (2000)
Rotifera	<i>Brachionus plicatilis</i>	15	Snell <i>et al.</i> (1991)
Microcrustáceo	<i>Artemia franciscana</i>	18	Espiritu <i>et al.</i> (1995)
Microalga	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	18	Janssen (1998)
Planta	<i>Allium cepa</i>	20	Forget <i>et al.</i> (2000)
Microcrustáceo	<i>Daphnia magna</i>	20	Janssen (1998)
Insecta	<i>Chironomus calligraphus</i>	22,83	Original (Hg <sup>2+</sup> )
Microcrustáceo	<i>Daphnia magna</i>	26	Willemssen <i>et al.</i> (1995)
Microcrustáceo	<i>Daphnia obtusa</i>	30	Rossini & Ronco (1996)
Insecta	<i>Chironomus calligraphus</i>	33	Original (Pb <sup>2+</sup> )
Microalga	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	40	Magdaleno <i>et al.</i> (1997)
Microcrustáceo	<i>Hyalella azteca</i>	40	Steevens & Benson (1998)
Insecta	<i>Chironomus calligraphus</i>	45,45	Original (Cd <sup>2+</sup> )
Planta	<i>Lactuca sativa</i>	46	Forget <i>et al.</i> (2000)
Microcrustáceo	<i>Artemia franciscana</i>	47	Janssen (1998)
Microcrustáceo	<i>Corophium insidiosum</i>	56	Reish ( 1993)
Bacteria	Muta-Cromo Placa	60	Pica <i>et al.</i> (2000)
Bacteria	<i>Vibrio fisheri</i> (Microtox)	65	Greene <i>et al.</i> (1985)
Nemátoda	<i>Panagrellus redivivus</i>	67	Diaz-Baez & Perez (2000)
Microrganismo	<i>Bacillus cereus</i>	70	Forget <i>et al.</i> (2000)
Microcrustáceo	<i>Daphnia magna</i>	71	Forget <i>et al.</i> (2000)
Microcrustáceo	<i>Elasmopus bampo</i>	72	Reish ( 1993)
Microcrustáceo	<i>Moina macrocopa</i>	77	Iannacone & Dale (1999)
Nemátoda	<i>Panagrellus redivivus</i>	> 100	Pica <i>et al.</i> (2000)

CV % = Coeficiente de Variación