



INNOTEC

ISSN: 1688-3691

innotec@latu.org.uy

Laboratorio Tecnológico del Uruguay
Uruguay

Saona, Gustavo; Carnikian, Agustín; Spósito, Martín; Baklayan, Patricia; Espínola, Julio
Sensibilidad de los bioensayos de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Pimephales promelas*
en una serie de muestras de efluentes y tóxicos de referencia

INNOTEC, núm. 10, enero-diciembre, 2015, pp. 49-55

Laboratorio Tecnológico del Uruguay
Montevideo, Uruguay

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=606166715005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Sensibilidad de los bioensayos de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Pimephales promelas* en una serie de muestras de efluentes y tóxicos de referencia

Sensitivity bioassays of the *Cnesterodon decemmaculatus* and *Pimephales promelas* in a series of samples of effluent and reference toxicant

Saona, Gustavo ⁽¹⁾, Carnikian, Agustín ⁽²⁾, Spósito, Martín ⁽¹⁾, Baklayan, Patricia ⁽²⁾, Espínola, Julio ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, Intendencia de Montevideo – ⁽²⁾ Departamento de Aguas y Productos Químicos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: gustavo.saona@imm.gub.uy

RECIBIDO: 18/8/2015 – APROBADO: 30/11/2015

Resumen

En este estudio se comparó la sensibilidad toxicológica cuantificada por la dosis letal 50% a las 96 horas de los bioensayos de toxicidad aguda de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Pimephales promelas* en su exposición a efluentes industriales, efluentes de saneamiento y tóxicos de referencia. Asimismo, se analizó la sensibilidad toxicológica de *C. decemmaculatus* en función de la longitud estándar.

Con ambas especies se realizaron 16 bioensayos apareados por la misma sustancia o compuesto y se observó una buena concordancia $r_L = 0,75$. El análisis de la sensibilidad toxicológica por talla no presentó diferencias significativas en el análisis global para los efluentes y el dicromato de potasio. Se observaron diferencias significativas en la sensibilidad por talla en los ensayos con dodecilsulfato sódico.

Los antecedentes del bioensayo agudo de *C. decemmaculatus* así como los resultados obtenidos en nuestro estudio acreditan el uso de esta especie en la evaluación ecotoxicológica.

El presente trabajo contribuye a desarrollar herramientas específicas de evaluación ecotoxicológica con una especie nativa (*C. decemmaculatus*) y brinda información comparada con una especie utilizada internacionalmente en un bioensayo de referencia (*P. promelas*). La continuación de estos estudios en el contexto de un área de investigación prioritaria permitirá consolidar instrumentos de análisis, desarrollar capacidades profesionales y contribuir a fortalecer a las instituciones gestoras de los recursos hídricos del Uruguay.

Palabras clave: Bioensayo, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Pimephales promelas*, ecotoxicología, efluentes, tóxicos de referencia.

Abstract

This study compared the toxicological sensitivity quantified by the 50% lethal dose of acute toxicity bioassays of *Cnesterodon decemmaculatus* and *Pimephales promelas* in exposure to toxic industrial effluents, wastewater effluents and reference toxicants. At the same time, the toxicological sensitivity of *C. decemmaculatus* related to the standard length was assayed.

Both species were analyzed with 16 bioassays mated by the same substance or compound and a good agreement $r_L = 0,75$ was observed. No significant differences in the overall analysis for effluents and potassium dichromate appeared in toxicological analysis of sensitivity to size. In contrast, significant difference in sensitivity was observed in assays with sodium dodecyl sulfate.

Previous studies of the acute bioassays of *C. decemmaculatus* as well as the results obtained in this work accredit the use of this species in the ecotoxicological evaluation.

This work contributes to generate specific ecotoxicological tools employing a native species (*C. decemmaculatus*) and provides comparative information with an internationally accepted species used in reference bioassays (*P. promelas*). Progress of these studies as a priority research area will contribute to consolidate analytical tools, develop professional skills and strengthen institutions that manage water resources in Uruguay.

Keywords: Bioassay, *Cnesterodon decemmaculatus*, *Pimephales promelas*, ecotoxicology, effluent, reference toxicant.

Introducción

Los estudios ecotoxicológicos utilizan generalmente tres tipos de herramientas de análisis: determinaciones químicas de sustancias, bioensayos y bioindicadores (Newman, 2013; Walker, et al., 2012; Crane, et al., 2007). Las tres herramientas son consideradas relevantes y aportan información no redundante que permite abordar en forma integral cualquier problema medioambiental asociado a la presencia de compuestos químicos tóxicos: presencia de contaminantes, toxicidad y estructura de la comunidad.

Actualmente, Uruguay no cuenta con una normativa promulgada que regule los efectos de compuestos químicos sobre la biota y no ha reglamentado el uso de bioensayos y bioindicadores. Sin embargo, desde el año 2008 existe una propuesta de modificación del Decreto 253/979 (Uruguay, 1979) desarrollada en el ámbito de la Comisión Técnica Asesora para la Protección del Medio Ambiente (COTAMA) que aplica a efluentes industriales y lodos (GESTA-AGUA, 2008). En el mismo sentido, el Decreto 182/013 (Uruguay, 2013), Reglamento de Gestión de Residuos Sólidos Industriales y Asimilados, exige la evaluación mediante bioensayos en su área de competencia, pero aún se encuentra sin una implementación definitiva. A nivel académico y técnico esta ausencia en la normativa es reconocida como una gran debilidad para la protección ambiental en nuestro país.

Los ensayos de laboratorio realizados sobre organismos vivos o sus derivados (órganos, tejidos y células) son denominados bioensayos. Son estudios de tipo experimental en los que se controlan muchas de las variables que pueden afectar la respuesta biológica, en particular la magnitud del agente problema (Newman, 2013; Castillo, 2004; Rand, 1995). Específicamente en los bioensayos de toxicidad, se prueban una serie de concentraciones fijas de la sustancia problema, pero también se controlan otros factores como temperatura, medio de dilución, volumen u otra medida del recipiente de ensayo, alimento (cantidad y tipo), sexo, edad y tamaño de los individuos (Castillo Morales, 2004; Rand, 1995).

Para la realización de experimentos con seres vivos un factor determinante a controlar es la producción o cría estandarizada de la especie que se empleará en los ensayos. La cría estandarizada mediante un protocolo o manual de materiales y procesos permite obtener individuos aproximadamente equivalentes en sus características para el ensayo: edad, tamaño, factor de condición, situación sanitaria y fisiológica (USEPA, 1999).

En nuestra región sudamericana existen bioensayos validados, protocolizados y estandarizados solo para un número aún insuficiente de especies, debido a la complejidad y el costo de desarrollar un protocolo de cría y ensayo con la validez y confiabilidad suficientes. Particularmente, el estudio de la validez de un bioensayo toxicológico requiere del análisis de la respuesta biológica frente a tóxicos de referencia y también la respuesta comparada entre bioensayos de distintos organismos (EPS, 1999). Estos desarrollos existen mayormente para especies nativas de países como EE.UU., Canadá y en la Comunidad Económica Europea (USEPA, 2002; EPS, 1999).

El uso de estos bioensayos se ha extendido a otros países, ya que son una medida útil del riesgo ecotoxicológico, aunque la especie utilizada no forme parte de la fauna o flora nativa. Sin embargo, esta realidad no debe justificar el abandonar el objetivo de conocer la magnitud del efecto tóxico sobre nuestras especies.

En el presente trabajo se compara la sensibilidad toxicológica entre *Cnesterodon decemmaculatus* y *Pimephales promelas*, dos peces pertenecientes a las familias Poeciliidae y Cyprinidae, respectivamente.

C. decemmaculatus es una especie sudamericana abundante y de amplia distribución en ambientes de agua dulce lenticos y lóticos de pequeño tamaño (Lucinda, 2005; Rosa and Costa, 1993). Su reproducción es vivípara y su alimentación es omnívora; se alimenta de fitoplancton y zooplancton (Lorier y Berois, 1995; Quintans, et al., 2009). Existen antecedentes del uso de *C. decemmaculatus* en bioensayos (Mastrángelo y Ferrari, 2013; Casares, et al., 2012; Vera-Candioti, et al., 2011; Carriquiriborde, et al., 2007; Di Marzio, et al., 2005; Parma de Croux, et al., 2002; Ferrari, et al., 1998; Gómez, et al., 1998; de la Torre, et al., 1997) y recientemente se ha publicado un manual para su producción en laboratorio (Somma, et al., 2011).

Pimephales promelas es un pez perteneciente a la familia Cyprinidae que está distribuida en el medio-oeste de EE.UU. en la cuenca superior del río Mississippi, al oeste hasta Utah, al norte hasta Canadá y en el este hasta Maine (Page y Burr, 2011). Debido a su amplia distribución se la ha utilizado extensamente en tests de toxicidad aguda, crónica y en ensayos de ciclo de vida en soporte y promoción de los programas regulatorios ambientales en EE.UU. y Europa (Dietrich y Krieger 2009) desde la década de 1960 (USEPA, 1988). *P. promelas* es de fácil cultivo en laboratorio y es utilizada regularmente por United States Environmental Protection Agency (USEPA), Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), American Society for Testing and Materials (ASTM), American Public Health Association (APHA) y Environment Canada (EC) para realizar pruebas de letalidad, determinar los riesgos potenciales del uso de nuevos químicos y para estudios regulatorios de rutina (Ankley y Villeneuve, 2006). Esta especie es a su vez recomendada por la USEPA (2002) y OECD (2007) para evaluar los efectos de disruptores endócrinos a diversos niveles de organización biológica debido a la capacidad de extrapolar los resultados hacia otros vertebrados (Ankley y Jhonson, 2004). Desde el año 2007 el Departamento de Productos Químicos y Aguas Residuales (PQAR) del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) desarrolla bioensayos de toxicidad aguda y crónica con *P. promelas* basados en el método EPA-821-R-02-012, acreditados por el Organismo Uruguayo de Acreditación (O.U.A.) desde 2015.

El objetivo de este estudio es comparar la sensibilidad toxicológica, cuantificada por la dosis letal 50% (DL50%), a las 96 horas, de los bioensayos de toxicidad aguda de *C. decemmaculatus* y *P. promelas* en su exposición a efluentes industriales, efluentes de saneamiento y tóxicos de referencia. A su vez, se presenta un estudio de la sensibilidad de *C. decemmaculatus* en función de la longitud estándar en el rango de tamaños (7 a 15 mm) utilizados para los ensayos.

Materiales y Métodos

Diseño experimental y muestras

Como resultado principal se pretende estimar una medida de concordancia entre los bioensayos, por lo cual el diseño experimental del presente estudio es apareado, aplicando cada bioensayo a todas las muestras (Zar, 1996).

Se analizaron 16 bioensayos con *C. decemmaculatus* y *P. promelas* utilizando: dos muestras de efluentes de saneamiento, ocho muestras de efluentes industriales y seis ensayos con tóxico de referencia.

Los ensayos con tóxico de referencia se realizaron con dos sustancias: dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y dodecilsulfato sódico ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$). Ambos son ampliamente recomendados en la bibliografía especializada en bioensayos de organismos acuáticos (USEPA, 2002; Schirmer, et al., 2008). Por otra parte, el cromo hexavalente es un contaminante frecuente de desecho de la industria del curtido de cueros y el dodecilsulfato sódico es un tensioactivo aniónico frecuente en las formulaciones de productos para la higiene y, por tanto, abundante en efluentes de saneamiento.

Bioensayos de *C. decemmaculatus*

El ensayo con *C. decemmaculatus* se realizó en el Laboratorio de Bioensayos (Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental, Intendencia de Montevideo), según el protocolo que se describe en la Tabla 1.

Característica del ensayo	Condición o valor
Tipo de ensayo	Estático
Duración	96 hs
Temperatura	24 ± 1 °C
Período de iluminación	16 hs luz / 8 hs oscuridad
Intensidad de iluminación	2000 lux
Recipiente de ensayo	Pote de polipropileno 420 mL con tapa
Volumen del medio de ensayo	300 mL
Sexo	Machos y hembras inmaduros
Tamaño (talla estándar)	7 a 15 mm (≤ 5 semana de nacimiento)
Número de organismos	10 por réplica (pote); 20 por tratamiento
Diluciones de la sustancia estudiada	Mínimo 4 diluciones con factor 1/2
Validez del ensayo	<10% mortalidad en control negativo
Medio de dilución y control negativo	Agua dura
Alimento	Nauplios de <i>Artemia salina</i> (eclosión <24 hs)
Alimentación	1 mL por réplica a tiempo 0 h y 48 hs

Tabla 1. Protocolo de bioensayos de *Cnesterodon decemmaculatus*.

La longitud o talla estándar fue medida previamente al ensayo colocando los peces en una caja de petrí y sobre una hoja

milimetrada, con agua suficiente para que naden libremente. Con dicho procedimiento se aseguró que los peces fueran menores o iguales a 15 mm. Durante el ensayo los peces que fueron muriendo y al finalizar el ensayo los supervivientes, que fueron sacrificados, se midieron nuevamente con regla milimetrada y la ayuda de lupa de mano para confirmar y registrar la longitud estándar.

El medio de dilución fue agua dura de la marca comercial de consumo humano Nativa (Milotur S.A.): cloruros 12 mg/L, calcio 64 mg/L, magnesio 32 mg/L, sodio 10,7 mg/L y potasio 1,1 mg/L.

No se realizó aireación de medio durante los ensayos.

En el Laboratorio de Bioensayos (Servicio ECCA) se realizó el cultivo de *C. decemmaculatus* para la obtención de los organismos de ensayo según un protocolo (Tabla 2) adaptado de Somma et al. (2011). Dicho protocolo permitió obtener peces de talla estándar de 7 a 15 mm durante todo el año, que corresponden a individuos de edad menor o igual a 5 semanas.

Característica del cultivo	Condición o valor
Recipiente	Plástico transparente con capacidad para 20 L
Temperatura	24 ± 2 °C
Período de iluminación	16 hs luz / 8 hs oscuridad
Intensidad de iluminación	2000 lux
Aireación	Aireador pipa con filtro de guata
Alimento	Nauplios de <i>Artemia salina</i> (eclosión <24 hs) y escamas Koi (Labcon®)
Alimentación	Nauplios en cantidad <i>ad libitum</i> y escamas 0,25 g/día
Peces adultos	6 a 9 hembras y 2 o 3 machos
Medio	Agua potable declorada
Limpieza	Recambio de agua mensual y lavado del recipiente trimestral

Tabla 2. Protocolo de cría en laboratorio de *Cnesterodon decemmaculatus* (adaptado de Somma, et al., 2011).

Las adaptaciones respecto del protocolo de cría de Somma et al. (2011) fueron las siguientes: se usaron recipientes de plástico de calidad alimentaria en lugar de vidrio; se aceptó un rango mayor de variación en la temperatura (22 a 26 °C); la alimentación en todas las clases de edad fue mayoritariamente con nauplios.

Bioensayos de *P. promelas*

Los ejemplares de *P. promelas* que se utilizaron fueron criados en el departamento de Productos Químicos y Aguas Residuales (PQAR) del LATU. En PQAR se cría esta especie de pez desde el año 2007 de acuerdo al protocolo de cultivo de peces

y calidad de agua reconstituida (AR) de U.S.E.P.A. (1988). Se realizaron bioensayos de toxicidad aguda de acuerdo al protocolo EPA-821-R-02-012 (USEPA, 2002) test method 2000.0 (Tabla 3).

Característica del ensayo	Condición o valor
Tipo de ensayo	Semi-estático, se renueva 75% a las 48 hs
Duración	96 hs
Temperatura	25 ± 1 °C
Período de iluminación	16 hs luz / 8 hs oscuridad
Intensidad de iluminación	540 – 1080 lux
Recipiente de ensayo	Pote de polipropileno 330 mL con tapa
Volumen del medio de ensayo	200 mL
Sexo	No determinado
Edad	1 – 14 días post-eclosión
Número de organismos	10 por réplica (pote); 20 por tratamiento
Diluciones de la sustancia estudiada	mínimo 5 diluciones con factor 1/2
Validez del ensayo	<10% mortalidad en control negativo
Medio de dilución y control negativo	Agua reconstituida según USEPA 1988, 2002
Alimento	Nauplios de <i>Artemia salina</i> (eclosión <24 hs)
Alimentación	1 mL por réplica a tiempo -2 hs y 48 hs

Tabla 3. Protocolo de bioensayos de *Pimephales promelas*.

Cuantificación de los bioensayos y análisis estadístico

En ambos ensayos se registró la mortalidad para cada dilución y en el control negativo a las 96 horas de exposición. Se calculó la dosis letal 50% (DL50%) utilizando el método Probit cuando presentó buen ajuste a los datos (test de Chi-cuadrado de bondad de ajuste; valor $p > 0,05$) y el método de media móvil o interpolación no lineal en caso contrario.

Para valorar la semejanza entre las sensibilidades de ambos bioensayos se utilizó el coeficiente de concordancia de Linn (r_L ; 1989, 2000) y el gráfico de Bland y Altman (1986, 1999). Este gráfico representa la diferencia entre los valores DL50% de cada par de ensayo (con una misma sustancia) en ordenadas y la media en abscisas. Además, se traza una línea horizontal con el promedio de las diferencias y otras dos correspondientes al intervalo de acuerdo del 95% (IA95%: media de las diferencias ± 1,96 desvío estándar).

La variación en la sensibilidad de los individuos de *C. decemmaculatus* de distinta talla fue estudiada mediante un

modelo de regresión logística binaria, en el cual la variable dependiente fue la situación del individuo vivo o muerto a las 96 horas y las variables independientes fueron la talla estándar (mm) y la concentración (mg/L o %). El análisis se realizó estratificando por cada ensayo y agrupando por efluentes de saneamiento, efluentes industriales y cada tóxico de referencia.

En el cálculo de la DL50% se utilizó el programa TO-XCALC (EPS, 2007) y en los demás análisis estadísticos se trabajó con STATA 12.1 (www.stata.com). Se calificó una buena concordancia cuando r_L fue mayor a 0,7 y se consideraron significativos los valores p menores o iguales a 0,05.

Resultados

Los valores promedio de la DL50% fueron siempre mayores con el bioensayo de *C. decemmaculatus* para los tres grupos de compuestos y sustancias estudiados (Tablas 4 y 5).

En el caso de los efluentes y el dicromato de potasio (DP) los intervalos de confianza del 95% contuvieron a la media del ensayo comparado, por lo que las diferencias no fueron significativas (Tablas 4 y 5). Sin embargo, en el caso del dodecilsulfato sódico (SDS) la DL50% media fue 6,78 mg/L para *C. decemmaculatus* y 4,24 mg/L para *P. promelas*, diferencias significativas dado que los IC95% no se superponen conteniendo las medias del grupo comparado.

	N	Media	DE	IC95%
Efluente (%)	10	71,90	37,42	46,68 – 97,12
DP (mg/L)	3	35,81	19,50	11,82 – 59,81
SDS (mg/L)	3	6,78	0,82	5,77 – 7,80

Tabla 4. Distribución de los valores de dosis letal 50% en los bioensayos realizados con *Cnesterodon decemmaculatus* en efluentes (saneamiento e industrias), dicromato de potasio (DP) y dodecilsulfato sódico (SDS).

	N	Media	DE	IC95%
Efluente (%)	10	49,09	37,33	24,06 – 74,11
DP (mg/L)	3	28,83	3,39	24,67 – 33,00
SDS (mg/L)	3	4,24	0,32	3,85 – 4,63

Tabla 5. Distribución de los valores de dosis letal 50% en los bioensayos realizados con *Pimephales promelas* en efluentes (saneamiento e industrias), dicromato de potasio (DP) y dodecilsulfato sódico (SDS).

La concordancia entre los bioensayos fue buena ($r_L > 0,7$), con un valor $r_L = 0,749$ (IC95%: 0,547 – 0,951). La diferencia promedio entre los valores de los ensayos fue 16,0 (IA95%: -27,3 – 59,4) (Gráfico 1). En dicho gráfico el cero del eje de ordenadas (destacado en azul) indica la concordancia perfecta y una diferencia promedio mayor a cero indica un sesgo de menor sensibilidad para el bioensayo de *C. decemmaculatus*. Sin embargo, el IA95% indica que solo un ensayo presentó una diferencia significativa en su sensibilidad (Gráfico 1).

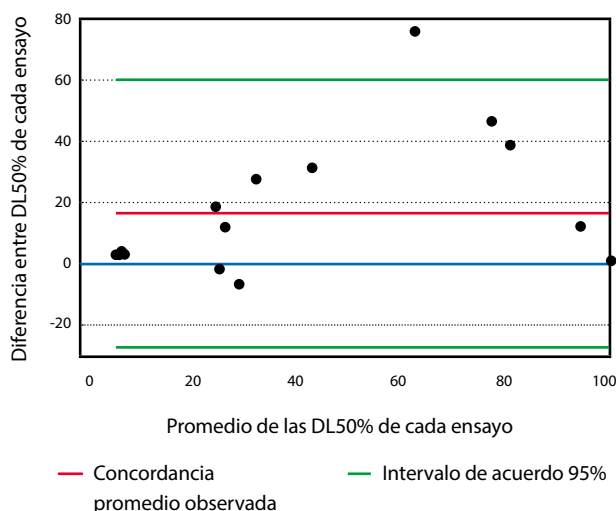


Gráfico 1. Representación del gráfico de Bland-Altman para valorar la concordancia o acuerdo entre los valores obtenidos para cada muestra con el ensayo de *C. decemmaculatus* y *P. promelas*. Cada punto indica la relación entre la diferencia de los valores de DL50% obtenidos con cada ensayo de una misma muestra (eje de ordenadas) respecto del promedio de los mismos valores de DL50% (eje de abscisas).

En los datos globales del estudio la relación entre mortalidad y tamaño no fue significativa, resultado observado para la talla ($p=0,165$) y en la interacción talla y dilución ($p=0,103$). No obstante, se encontró una relación significativa en los ensayos realizados con SDS, tanto para el tamaño ($p=0,026$) como en la interacción tamaño y dilución ($p=0,017$).

Discusión

Nuestro trabajo presenta el primer estudio comparativo de la sensibilidad de los bioensayos de toxicidad aguda de la especie nativa *Cnesterodon decemmaculatus* respecto de una especie de referencia mundial en ecotoxicología en peces como lo es *Pimephales promelas*.

En el diseño de este estudio se utilizó un protocolo de cría en laboratorio (adaptado de Somma, et al., 2011) y se presenta un protocolo de bioensayo de *C. decemmaculatus* que permitió trabajar con características estandarizadas en los ensayos. Fue posible obtener individuos durante todo el año, pero la producción de juveniles fue menor durante el invierno.

Los resultados obtenidos muestran una buena concordancia ($r_t > 0,7$) entre ambos bioensayos, pero con una tendencia o sesgo que resulta en un promedio mayor de los valores de DL50% (96 hs) del ensayo de *C. decemmaculatus*. La diferencia promedio entre las DL50% de ambos ensayos fue relativamente pequeña, pero el intervalo de acuerdo 95% fue amplio. Dado que *C. decemmaculatus* puede habitar ambientes eutróficos (Teixeira de Mello, 2007), es posible que presente mayor resistencia a la contaminación orgánica y por ello haya sido particularmente menos sensible con algunos de los efluentes analizados.

Los resultados obtenidos con *P. promelas* en dicromato de potasio (DP) se encontraron en el rango de valores de DL50% citados en la bibliografía de referencia: 20 mg/L

(Rand, 1995) y 38 – 214 mg/L (EPS, 1990). Con *C. decemmaculatus* se hallaron valores semejantes que indican una sensibilidad similar para este tóxico de referencia. Para *P. promelas* se han citados valores de DL50% medios de 8,6 mg/L con el tóxico de referencia dodecilsulfato sódico (SDS; USEPA, 2002), siendo mayor al observado en el presente estudio. Este valor resultó superior a las DL50% estimadas con *C. decemmaculatus*, indicando una respuesta sensible también con este tóxico de referencia.

El estudio de la sensibilidad diferencial por tamaño (talla estándar) en *C. decemmaculatus* no presentó diferencias para los efluentes y el DP. Sin embargo, sí se observaron diferencias en la sensibilidad por tamaño con el SDS, indicando un efecto diferencial dentro de un rango de tallas que es muy estrecho (7 a 15 mm). Se considera que son necesarios más estudios con un número mayor de tóxicos de referencia y mayor tamaño de muestra para poder concluir respecto de la sensibilidad diferencial por tamaño en *C. decemmaculatus*.

El bioensayo de *C. decemmaculatus* presenta una serie importante de estudios con tóxicos de referencia y muestras ambientales que la respaldan como una buena herramienta ecotoxicológica (Mastrángelo y Ferrari, 2013; Casares, et al., 2012; Vera-Candioti, et al., 2011; Di Marzio, et al., 2005; Gómez, et al., 1998; de la Torre, et al., 1997). El reciente trabajo de Mastrángelo y Ferrari (2013) es el primero en presentar resultados con una estandarización completa que resulta del uso de un protocolo de cría y de bioensayo. Nuestro trabajo desarrollado en paralelo es coincidente y reafirma la mayor parte de las características de los protocolos de cría y ensayo disponibles (Mastrángelo y Ferrari, 2013; Somma, et al., 2011).

Los antecedentes del bioensayo agudo *C. decemmaculatus* así como los resultados obtenidos en nuestro estudio acreditan el uso de esta especie en la evaluación ecotoxicológica. Sin embargo, se deberán realizar más estudios para definir una versión definitiva del protocolo de bioensayo que le otorgue mayor validez y exactitud a esta herramienta ecotoxicológica.

Este trabajo contribuye a generar herramientas específicas de evaluación ecotoxicológica con una especie nativa y brinda información comparada con una especie utilizada internacionalmente como bioensayo de referencia. La continuación de estos estudios en el contexto de un área de investigación prioritaria permite consolidar instrumentos de análisis, desarrollar capacidades profesionales y contribuir a fortalecer a las instituciones gestoras de los recursos hídricos de Uruguay.

Reconocimientos

Manifestamos nuestro agradecimiento a los funcionarios de la Unidad de Efluentes Industriales de la Intendencia de Montevideo: Hernán Méndez, Antuanet Calero, Mary Yafalian y Silvia Tejera por el apoyo al proporcionarnos las muestras de efluentes.

Se agradece a la directora del Servicio de Evaluación de la Calidad y Control Ambiental Quím. Gabriella Feola por su apoyo al desarrollo de la presente línea de investigación y a la colaboración interinstitucional que la sustenta.

Se agradece a los integrantes del Departamento de Aguas y Productos Químicos del LATU por su colaboración en el desarrollo de esta investigación. Destacamos nuestro agradecimiento a la Ph.D. Diana Míguez por su amplia contribución a la investigación ecotoxicológica en LATU, que es la base para el desarrollo de estudios como el que se presenta.

Referencias

- Ankley, G. y Jhonson, H., 2004. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. En: *ILAR Journal*, 45(4), pp.469-483.
- Ankley, G. y Villeneuve, D., 2006. The fathead minnow in aquatic toxicology: past, present and future. En: *Aquatic Toxicology*, 78, pp.91-102.
- Bland, J.M. y Altman, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. En: *Lancet*, 1(8476), pp.307-310.
- Bland, J.M. y Altman, D.G., 1999. Measuring agreement in method comparison studies. En: *Statistical Methods in Medical Research*, 8, pp.135-160.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C. y Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish population under field-use in biotech-soybean production. En: *Chemosphere*, 68, pp.613-621.
- Castillo Morales, G. (Ed), 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de agua. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. México: IMTA; Canadá: IDRC.
- Crane, M., Burton, G. A., Culp, J. M., Greenberg, M. S., Munkittrick, K. R., Ribeiro, R., Salazar, M. H. y St-Jean, S. D., 2007. Review of aquatic in situ approaches for stressor and effect diagnosis. En: *Integr. Environ. Assess. Manag.*, 3(2), pp.234-245.
- de la Torre, F.R., Demichelis, S.O., Ferrari, L. y Salibián, A., 1997. Toxicity of reconquista river water: Bioassays with juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. En: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, pp.558-565.
- Dietrich, D. y Krieger, H., 2009. *Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish*. New Jersey: Jhon Wiley and Sons.
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M. y Galassi, S., 2005. Riskassessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61, pp.380-391.
- EPS, 1990. *Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants*. Ottawa: Environment Canada. (Report EPS 1/RM/12.)
- EPS, 1999. *Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology*. Ottawa: Environment Canada. (Environment Protection Series, EPS 1/RM/34).
- EPS, 2007. *Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests*. Ottawa: Environment Canada. (Environment Canada Report, EPS 1/RM/46).
- Ferrari, L., García, M.E., de la Torre, F.R. y Demichelis, S.O., 1998. Evaluación ecotoxicológica del agua de un río urbano mediante bioensayos con especies nativas. En: *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 148, pp.1-16.
- GESTA-AGUA, 2008. *Normas reglamentarias para prevenir la contaminación ambiental mediante el control de las aguas* [En línea]. Montevideo: GESTA-AGUA. [Consulta: 12 de agosto de 2015]. Disponible en: http://www.ciu.com.uy/innovaportal/file/30555/1/Dec.%20253_79_modificaciones%202008.pdf
- Gómez, S., Villar, C. y Bonetto, C., 1998. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata Estuary. En: *Environmental Pollution*, 99, pp.159-165.
- Lin, L., 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. En: *Biometrics*, 45, pp.255-268.
- Lin, L., 2000. A note on the concordance correlation coefficient. En: *Biometrics*, 56, pp.324-325.
- Lorier, E. y Berois, N., 1995. Reproducción y nutrición embrionaria en *Cnesterodon decemmaculatus* (Teleostei: Poeciliidae). En: *Revista Brasileira de Biología*, 55, pp.27-44.
- Lucinda, P.H.F., 2005. Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). En: *Neotropical Ichthyology*, 3(2), pp.259-270.
- Mastrángelo, M. y Ferrari, L., 2013. *Cnesterodon decemmaculatus* juveniles as test organisms in toxicity assessment: cadmium case. En: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 91, pp.49-54.
- Newman, M.C., 2013. *Quantitative ecotoxicology*. 2a ed. Boca Raton: CRC Press.
- Page, L.M. y Burr, B.M., 2011. *A field guide to freshwater fishes of North America north of Mexico*. Boston: Houghton Mifflin Harcourt.
- OECD, 2008. *Report of the validation peer review for the 21-day fish endocrine screening assay and agreement of the working group of the national coordinators of the est guidelines programme on the follow-up of this report*. [s.l.]: OECD. (Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94)
- Parma de Croux, M.J., Loteste, A. y Campana, M., 2002. Toxicidad aguda del piretroide cipermetrina en *Poecilia reticulata* y *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). En: *Revista FABICIB*, 6, pp.69-74.
- Quintans, F., Scasso, F., Loureiro, M. y Yafe, A., 2009. Diet of *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) and *Jenynsia multidentata* (Anablepidae) in a hypertrophic shallow lake of Uruguay. En: *Iheringia, Série Zoología*, 99(1), pp.99-105.
- Rand, G.M. (ed.), 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. 2a ed. New York: Taylor & Francis. ISBN: 1-56032-091-5.
- Rosa, R. S. y Costa, W. J. E. M., 1993. Systematic revision of the genus *Cnesterodon* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) with the description of two new species from Brazil. En: *Copeia*, pp.696-708.
- Schirmer, K., Tanneberger, K., Kramer, N.I., Völker, D., Scholz, S., Hafner, Ch., Lee, L.E.J., Bols, N.C. y Hermens, J.L.M., 2008. Developing a list of reference chemicals for testing alternatives to whole fish toxicity tests. En: *Aquatic Toxicology*, 90, pp.128-137.
- Somma, L.A., Mastrángelo, M. y Ferrari, L., 2011. *Manual de producción de Cnesterodon decemmaculatus en laboratorio*. Ushuaia: Editorial Utopías. ISBN: 978-987-1529-87-2.
- Teixeira de Mello, F., 2007. *Efecto del uso del suelo sobre la calidad del agua y las comunidades de peces en sistemas lóticos de la cuenca baja del río santa lucía (Uruguay)*. Montevideo: Facultad de Ciencias, Udelar. 58p.
- Uruguay. Decreto 253/979, de 19 de mayo de 1979. *Diario Oficial*, 31 de mayo de 1979, p.1473.
- Uruguay. Decreto 182/013, de 20 de junio de 2013. *Diario Oficial*, 27 de junio de 2013, p.13.
- USEPA, 1988. *Guidelines for the culture of Fathead minnows, Pimephales promelas for use in toxicity tests*. Washington: USEPA. (EPA/600/S3-87/001). pp. 4.
- USEPA, 1999. *Guidance document on application and*

- interpretation of single-species tests in environmental toxicology*. Washington: USEPA. (EPS 1/RM/34). pp. 226.
- USEPA, 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 5ta. ed. Washington: USEPA. (EPA-821-R-02-012). Test Method 2000.0.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L., 2011. Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). En: *Theoria*, 20(1), pp.81-88.
- Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P. y Peakall, D.B., 2012. *Principles of ecotoxicology*. 4ta ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN: 978-1-4398-6266-7.
- Zar, J.H., 1996. *Biostatistical analysis*. 3ra. ed. New Jersey: Prentice Hall.