

## TOXICIDAD DE MEZCLAS DE CONTAMINANTES QUÍMICOS SOBRE EL CLADÓCERO *Daphnia magna*

Hernán GAETE<sup>1</sup> y Karina PAREDES<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioensayos, Proyecto Fondef 2-72. Departamento de Zoología, Universidad de Concepción, Casilla 2407, Concepción, Chile

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Ambiental, Centro EULA-Chile. Universidad de Concepción, Casilla 156-C, Concepción, Chile

(Recibido marzo 1995, aceptado marzo 1996)

Palabras clave: *Daphnia magna*, toxicidad acuática, bioensayos, calidad de agua, concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)

### RESUMEN

El río Biobío es uno de los sistemas acuáticos chilenos que actualmente presenta características potenciales de contaminación críticas. Estudios recientes realizados en el curso inferior del río, han demostrado la existencia durante algunos períodos del año, de concentraciones significativamente altas de sustancias tóxicas como mercurio (Hg), cobre (Cu), cadmio (Cd) y pentaclorofenol (PCF). El efecto tóxico combinado de tales productos químicos es desconocido y se sugiere que podría ser mayor al de cada uno de ellos individualmente. Para determinar la interacción toxicológica entre estos agentes químicos, se examinó la toxicidad de diferentes combinaciones de mercurio, cobre, cadmio y PCF sobre *Daphnia magna*. Los resultados muestran que la mortalidad se incrementa significativamente al aumentar la cantidad de sustancias presentes en la mezcla, lo que destaca la importancia de considerar la acción conjunta de contaminantes en la estimación del efecto que estos producen en los sistemas naturales.

### ABSTRACT

The Biobio river is an aquatic system in Chile that represents a potential risk for serious environmental contamination. Studies carried out during different periods showed high concentrations of toxics such as mercury (Hg), copper (Cu), cadmium (Cd) and pentachlorophenol (PCP) in the lower third of the river. The added toxic effect of these chemicals is unknown and it is suggested that the cumulative effect can be greater than the single toxic effect of each pollutant. In order to assess the toxicological interaction between these chemicals, we studied the toxicity of different combinations of mercury, copper, cadmium and pentachlorophenol on *Daphnia magna*. These results showed that the mortality of *D. magna* increases dramatically in proportion to the number of elements present in the mixture. These results emphasize the importance of the research on the toxicity of hazardous wastes mixtures in the aquatic biota.

### INTRODUCCIÓN

Una importante variable ambiental que puede afectar la toxicidad de contaminantes químicos en los ecosistemas acuáticos es la presencia de otros contaminantes (Abel 1989, Martínez *et al.* 1995). En la estimación de criterios de calidad para la vida acuática, normalmente se consideran concentraciones de agentes químicos individuales que sean ecológicamente seguras. Sin embargo, las comunidades biológicas acuáticas usualmente están expuestas a varios contaminantes en forma simultánea, siendo la toxicidad de estas mezclas dependiente

de las múltiples interacciones de sus constituyentes (Swartz *et al.* 1981, Abel 1989). En este sentido, al combinar dos o más agentes químicos pueden ocurrir interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas (Warren 1987).

El río Biobío (Chile Central) (Fig. 1), es uno de los cuerpos lóticos que presenta características potenciales de contaminación más críticas, especialmente por ser ejemplo de un sistema que recibe a lo largo de su curso, los múltiples desechos de las actividades agrícolas, industriales, forestales y urbanas que se desarrollan en su cuenca, los que finalmente son transportados hacia el Golfo de Arauco (Parra *et al.* 1991).

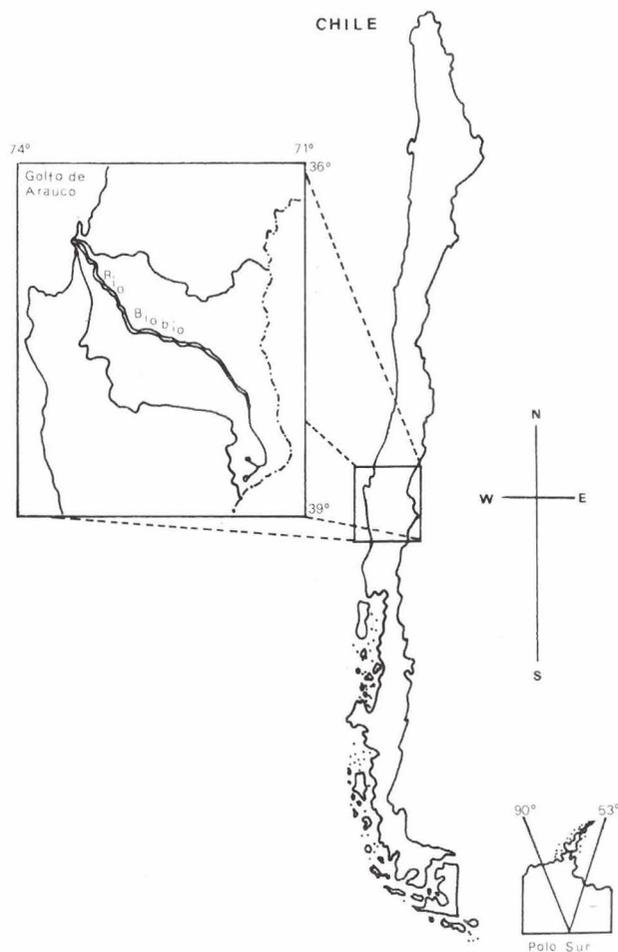


Fig. 1. Río Biobío, VIII Región, Chile

En el Biobío (sector potamal) se han encontrado metales pesados (por ejemplo, mercurio (Hg), cobre (Cu), cadmio (Cd)) y contaminantes orgánicos (por ejemplo, pentaclorofenol (PCF)), en concentraciones indicadoras de procesos de contaminación (Parra *et al.* 1993). Desde el punto de vista toxicológico son muy importantes metales pesados como Cu, Hg y Cd (Abel 1989, Hellowell 1989).

En cuanto al PCF, en Chile ha sido utilizado en la industria de la madera principalmente como fungicida (Venegas *et al.* 1993). Por ello, las concentraciones detectadas en el río Biobío, se deben a la actividad forestal de la zona (Parra *et al.* 1993). Estudios sobre la toxicidad aguda del PCF, revelan que muchos organismos acuáticos, invertebrados (anélidos, moluscos y crustáceos) y vertebrados (peces), son afectados por concentraciones menores a 1 mg/L (WHO 1987).

Los trabajos de Arenas (1993) y Urrutia (1993), señalan que tanto las comunidades fitobentónicas como las zoobentónicas en el río Biobío, son afectadas por las complejas mezclas de sustancias provenientes de efluentes tanto urbanos como industriales, que provocan cambios en la estructura de dichas comunidades (abundancia, diversidad de especies,

biomasa). Pero hasta la fecha no hay información de la toxicidad que resulta de la interacción de los contaminantes en el río Biobío. Con relación a lo anterior, se espera que algunos compuestos químicos presentes en este río interactúen modificando su toxicidad. Para verificar la hipótesis de interacción toxicológica de contaminantes tales como cobre, cadmio, mercurio y pentaclorofenol en el río Biobío, se planteó como objetivo de esta investigación, examinar experimentalmente la toxicidad de mezclas de estos agentes químicos en el cladóceros *Daphnia magna*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos de toxicidad fueron efectuados con el cladóceros *Daphnia magna* (neonatos de menos de 24 horas de edad) cultivados en el laboratorio de Biología Ambiental del Centro EULA-Chile en la Universidad de Concepción. Los dafnidos fueron mantenidos en medio de prueba, de acuerdo con ISO (1982); pH  $7.8 \pm 0.2$ ; dureza  $250 \pm 25$  mg/l (como  $\text{CaCO}_3$ ); OD sobre 80% de saturación, temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo 16 h luz / 8 h oscuridad y alimentados con concentrado de pescado, alfalfa, levadura y microalgas (*Selenastrum capricornutum*) (Lewis y Hornin 1987). Se realizaron pruebas de toxicidad aguda, estáticas, de acuerdo con las Normas de la Organización Mundial de Estandarización (ISO 1982). La respuesta evaluada en los organismos fue mortalidad a las 24 h de exposición ( $24\text{h-CL}_{50}$ ) y el criterio de aceptabilidad fue sobrevivencia en los testigos mayor a 90%.

En los experimentos se consideraron cuatro agentes químicos presentes en el río Biobío: cobre (Cu), mercurio (Hg), cadmio (Cd) y pentaclorofenol (PCF). Las soluciones madre fueron preparadas a partir de Titríssoles de  $\text{Cl}_2\text{Cu}$ ,  $\text{Cl}_2\text{Cd}$  y  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ . En el caso del PCF, se utilizó pentaclorofenol estándar Analytical Carlo Erba (99% de pureza), el cual fue disuelto en acetona de acuerdo con ISO (1982).

El primer experimento consistió en estimar la  $24\text{h-CL}_{50}$  de Hg, Cu, Cd y PCF, exponiendo a los dafnidos a una serie de concentraciones preliminares de los agentes químicos individuales. Para ello, se usaron cámaras de 25 ml y un volumen de prueba de 15 ml. En cada tratamiento se emplearon 10 individuos divididos en dos réplicas por concentración. Posteriormente, se realizaron las pruebas definitivas que consistieron en cinco concentraciones por cada agente químico (Tabla I) además del testigo. En el caso del PCF, se utilizó un segundo testigo con la mayor concentración de acetona. En cada tratamiento se emplearon 20 individuos por concentración divididos en cuatro réplicas. Durante el tiempo de exposición a los agentes químicos, los dafnidos no fueron alimentados. Los valores de  $24\text{h-CL}_{50}$  en cada una de las pruebas fueron calculados a través del análisis Probit (USEPA 1993).

En el segundo experimento, los cuatro agentes químicos fueron mezclados en dos, tres y cuatro combinaciones, usando siempre concentraciones individuales que explicaran mortalidades iguales o menores al 5%. Para ello, se emplearon

**Tabla I.** TOXICIDAD DEL COBRE (Cu), MERCURIO (Hg), CADMIO (Cd) Y PENTAFLOROFENOL (PCF) SOBRE *D. magna*. VALORES DE 24h-CL<sub>50</sub> Y  $\chi^2$  ESTIMADOS MEDIANTE EL PROGRAMA PROBIT

Cu			Hg			Cd			PCF		
Conc. (mg/l)	Mo (%)	Me (%)	Conc. (mg/l)	Mo (%)	Me (%)	Conc. (mg/l)	Mo (%)	Me (%)	Conc. (mg/l)	Mo (%)	Me (%)
50	35	27	100	30	30	600	45	37	500	25	14
60	35	51	150	60	57	800	50	50	550	30	33
70	85	71	200	80	80	1000	60	61	600	40	56
80	75	84	250	85	91	1200	65	69	650	68	75
100	100	96	300	100	96	1400	65	75	700	100	87
						1600	75	80			
						2000	100	86			
CL <sub>50</sub>	60			127			784			583	
IC	(53 - 65)			(72 - 165)			(515 - 957)			(558 - 613)	
$\chi^2$	6.76*			1.76*			5.24*			7.01*	

Conc.: Concentración, Mo: Mortalidad observada, Me: Mortalidad esperada, IC: Intervalo de confianza (95%), \*: Valores de  $\chi^2$  calculados, menores a los tabulados a un nivel de significancia de  $p = 0.05$

concentraciones de Cu, Hg y PCF a la mitad de las pruebas 24h-CL<sub>50</sub> (24h-CL<sub>50</sub>/2) de cada uno en forma individual (concentraciones equitoxicas) estimadas a partir del primer experimento. En el caso del Cd, la concentración aplicada fue menor a la 24h-CL<sub>50</sub>/2 debido a que la mortalidad registrada a esta concentración fue mayor de 5%. Las combinaciones consideraron a todos los pares de sustancias (seis tratamientos), a todos los grupos de tres (cuatro tratamientos) y a la mezcla de las cuatro.

La presencia o ausencia de interacción de los contaminantes se determinó sometiendo a prueba la hipótesis nula, es decir que no hay diferencias significativas entre la mortalidad en la mezcla de sustancias y la mortalidad más alta a 24h-CL<sub>50</sub>/2 de una de las sustancias presente en la mezcla, mediante la prueba de *t* de Student con el 95% de confianza.

## RESULTADOS

La **tabla I** muestra las concentraciones de Cu, Hg, Cd y PCF utilizadas en las pruebas de toxicidad definitivas. Además incluye a la mortalidad observada, la mortalidad esperada en cada concentración, la estimación de la 24h-CL<sub>50</sub> y la  $\chi^2$  para

cada agente químico. Se observa que el metal que presenta el menor valor de CL<sub>50</sub> es Cu (60 mg/l), en tanto que Cd registra el mayor (784 mg/l). En el análisis Probit, los valores de  $\chi^2$  calculados son menores a los tabulados a un nivel de significancia de  $P = 0.05$ .

La **tabla II** muestra datos acerca de 24h-CL<sub>50</sub>/1 y 24h-CL<sub>50</sub>/2,  $\chi^2$ , así como también sobre el porcentaje de mortalidad de *D. magna* estimados a la mitad del 24h-CL<sub>50</sub>. Se observa que la mortalidad a la mitad del 24h-CL<sub>50</sub> para Cu y PCF es de 1%, para Hg de 5%, en tanto que para Cd es de 15%. Es por esto, que para realizar los experimentos de interacción se emplea una concentración de Cd que provoca menos del 5% de mortalidad (196 mg/l).

Los resultados obtenidos de las diferentes combinaciones muestran que al incrementar la cantidad de contaminantes presentes en la mezcla, aumenta la toxicidad. El porcentaje promedio de mortalidad por mezcla al combinar dos sustancias fue 24.1%, en combinaciones de tres 47.5% y de cuatro 100% (**Fig. 2**).

Al comparar la toxicidad individual de Cu, Hg y PCF a 24h-CL<sub>50</sub>/2 y Cd (196 mg/l) con la mezcla, en la mayoría de las combinaciones aumenta, con excepción de Hg + Cd y Cd + PCF en donde no se nota interacción (**Tabla III**). Se destaca

**Tabla II.** TOXICIDAD DE COBRE (Cu), MERCURIO (Hg), CADMIO (Cd) Y PENTAFLOROFENOL (PCF) SOBRE *D. magna*. VALORES DE 24h-CL<sub>50</sub> Y % DE MORTALIDAD A 24h-CL<sub>50</sub>/2, ESTIMADOS MEDIANTE EL PROGRAMA PROBIT

Agente químico (mg/l)	$\chi^2$ CL <sub>50</sub> *	Calculados	Valores de $\chi^2$ para $p = 0.05$	CL <sub>50</sub> /2	Mortalidad (%)
Cu	60 ± 6.0	6.76 **	7.81	30.0	1
Hg	127 ± 46.5	1.76 **	7.81	63.5	5
Cd	784 ± 221.0	5.24 **	11.07	392.0	15
PCF	583 ± 27.5	7.01 **	7.81	291.5	1

\* Valores ± intervalo de confianza

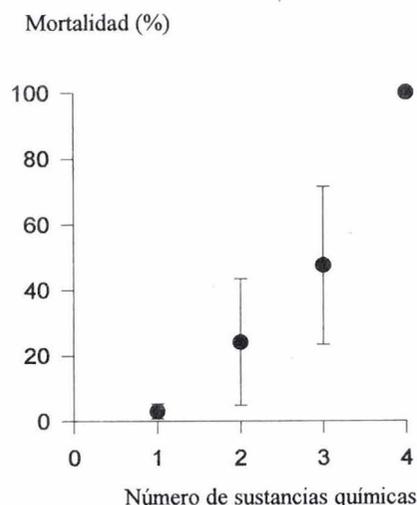


Fig. 2. Porcentaje promedio de mortalidad de *D. magna* y desviación estándar con relación a la cantidad de agentes químicos tóxicos adicionados al agua de dilución

la combinación de los cuatro agentes químicos, que en menos de 24 horas provocan el 100 % de mortalidad. En las que está presente el cobre, se observa un incremento en la toxicidad con relación a las toxicidades individuales, de acuerdo con la prueba estadística de *t* de Student. En tanto en las que no hay cobre, se evidencia que la mortalidad promedio es notoriamente menor. En cuanto a los testigos usados tanto en las pruebas con metales como en los empleados con el PCF, no se evidencia mortalidad de los organismos dentro de las 24h de exposición.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Para predecir los efectos de contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, la acción conjunta de mezclas de agentes químicos debe ser tomada en consideración (Enserink *et al.* 1991, Martínez *et al.* 1995). En este sentido, los resultados de este estudio indican que las diversas mezclas de agentes químicos como Cu, Cd, Hg y PCF en el medio acuático pueden causar efectos tóxicos sobre *Daphnia magna*, mayores que los producidos individualmente por ellos. De acuerdo con esto y tomando en cuenta que al combinar los distintos agentes químicos probados, en la mayoría de los casos los resultados de la toxicidad fueron más elevados que la suma de sus toxicidades individuales, lo cual indica que se trataría de una toxicidad más que aditiva (Abel 1989).

Resultados similares encontraron Enserink *et al.* (1991) al realizar ensayos de toxicidad crónica de diferentes combinaciones de As, Cd, Cr, Pb, Ni y Zn sobre *Daphnia magna*, determinando que la toxicidad era aditiva y que su efecto tóxico era tanto a nivel de sobrevivencia individual como de crecimiento poblacional. Otros estudios, que demuestran que la acción conjunta de agentes químicos ejerce efectos tóxicos significativos sobre la biota acuática están dados por Mosser

*et al.* (1974) y Babich y Stotzky (1983). Por otra parte, en el caso de las combinaciones entre Hg + Cd, Cd + PCF, a las concentraciones probadas, no se observó mortalidad, lo que podría estar dado por la presencia del Cd en la mezcla, ya que en las combinaciones Hg + PCF, la mortalidad fue de 35% y luego en la combinación Hg + PCF + Cd, la mortalidad disminuyó a 15%. Sin embargo, esta interacción varía según el agente químico con el que se combina, Biesinger *et al.* (1986) encontraron que al mezclar Cd + Zn en concentraciones que individualmente no tenían efecto, provocaron la disminución en la reproducción de *D. magna*.

En cuanto a las diferencias en los porcentajes de mortalidad de 0% a 45%, en las combinaciones de dos agentes químicos y de 15% a 70% en la combinación de tres, estarían dadas principalmente por la presencia del cobre en la mezcla. Este último, además de incrementar su toxicidad en mezcla también aumentaría la toxicidad de Hg, PCF y Cd. En este sentido, Fingl y Woodbuty (1965, citados por Warren 1987), señalan que cuando aumenta el efecto de una sustancia por la presencia de otra y que sola no tiene ninguno, se trata de una interacción

TABLA III. TOXICIDAD DE COMBINACIONES DE Cu, Hg, Cd y PCF SOBRE *D. magna*

Combinación química	Mortalidad (%)	Valores de <i>t</i>
Testigo	0	
Testigo + acetona	0	
CL <sub>50</sub>		
Cu (60 mg/l)		
Hg (127 mg/l)		
PCF (583 mg/l)		
Cd (784 mg/l)		
1/2 LC <sub>50</sub>		
Cu (30 mg/l)	1	
Hg (63.5 mg/l)	5	
PCF (291.5 mg/l)	1	
Cd (196 mg/l)	5	
Combinaciones a 1/2 LC <sub>50</sub>		
Cu x Hg	45	-3.7033*
Cu x Cd	35	-2.7775*
Cu x PCF	30	-3.2733*
Hg x Cd	0	
Hg x PCF	35	-2.7775*
Cd x PCF	0	
Cu x Hg x Cd	70	-4.6950**
Cu x Hg x PCF	45	-3.7033*
Hg x Cd x PCF	15	-0.9258
Cd x Cu x PCF	60	5.7446**
Cu x Hg x Cd x PCF	100	-19.0000**

La mortalidad por cada combinación, fue comparada mediante la prueba *t* de Student, con la mortalidad de cada agente químico presente en la combinación, que tuvo la mortalidad más alta a 24h-LC<sub>50</sub>/2 para Cu, Hg y PCF y en el caso del Cd, a concentración menor a la LC<sub>50</sub>/2.

\* Significativo ( $p < 0.05$ ).

\*\*Significativo ( $p < 0.01$ )

sinérgica. Al respecto, Stokes (1975) detectó efecto sinérgico entre el cobre y el níquel. El níquel a bajas concentraciones provocó inhibición del 22% del crecimiento del alga *Scenedesmus*, el cobre a baja concentración causó inhibición del 40%, sin embargo, juntos inhibieron en 75% el crecimiento en esta especie. Similares resultados fueron descritos por Brown y Dalton (1970), al efectuar ensayos de interacción toxicológica entre Cu, Zn y Ni sobre *Oncorhynchus mykiss*. Se ha sugerido, que el Cu actúa como un agente tóxico que al unirse a la superficie celular disminuye la carga negativa de ésta, altera el transporte en la membrana y por consiguiente, afecta su permeabilidad, lo que facilitaría el ingreso de otros agentes al interior de la célula actuando negativamente sobre el metabolismo. Por otra parte, los metales que no traspasan las barreras de la membrana celular como los iónicos, serían transportados en forma compleja uniéndose a la membrana celular, lo que podría ocurrir entre el Cu y el PCF (Salomons y Förstner 1984).

El incremento de la toxicidad de las mezclas en *D. magna*, al aumentar la cantidad de agentes químicos, es similar a lo encontrado por Swartz *et al.* (1988), en ensayos de toxicidad de sedimentos en el anfípodo *Rhepoxinius abronius*, pues estos factores se correlacionaron positivamente.

Aunque, este estudio no pretende simular las condiciones del río Biobío, las interacciones obtenidas, que en su mayoría podrían corresponder a aditivas o sinérgicas, explicaría en parte, los resultados obtenidos por Arenas (1993) y Urrutia (1993), con relación al efecto de los efluentes industriales sobre la estructura de las comunidades fito y zoobentónicas. Estos efluentes se comportarían como mezclas complejas en las cuales se producirían efectos sinérgicos entre sus diferentes constituyentes, lo que afectaría la sobrevivencia de algunas especies, alterando la estructura, la diversidad y la abundancia en el ecosistema del río Biobío.

Los mecanismos que gobiernan los efectos de mezclas de metales sobre los sistemas biológicos no son bien conocidos. Sin embargo, estudios en donde se utilizan dos o más contaminantes y se evalúan sus posibles interacciones, son necesarios para conocer la toxicidad y el efecto de las mezclas en los ecosistemas acuáticos (Naddy *et al.* 1995). Finalmente, estos resultados sugieren la existencia de posibles interacciones toxicológicas entre los contaminantes presentes en este río de tipo sinérgico y aditivo. Por lo tanto, se destaca la importancia de considerar que la acción conjunta de agentes químicos se debe tomar en cuenta en el desarrollo de criterios de calidad de agua ecotoxicológicamente relevantes, ya que los actuales generalmente los consideran en forma individual (Enserink *et al.* 1991, Logan y Wilson 1995).

## REFERENCIAS

Abel P.D. (1989). *Water pollution biology*. Cap. 4. The toxicity of pollutants to aquatic organisms. Ellis Horwood, 231 p.

- Arenas J. (1993). Macroinvertebrados bentónicos como bioindicadores de la calidad de agua del río Biobío, Chile. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales, EULA, Universidad de Concepción, Chile.
- Babich H. y Stotzky G. (1983). Synergism between nickel and copper in their toxicity to microbes: mediation by pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7, 576-587.
- Beisinger K., Christemen G. y Fiandt J. (1986). Effects of metal salt mixture on *Daphnia magna* reproduction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 11, 9-14.
- Brown V.M y Dalton R.A. (1970). The acute lethal toxicity to rainbow trout of mixture of copper, phenol, zinc and nickel. *J. Fish. Biol.* 2, 211-216.
- Enserink E.L., Maas Diepeveen J.L. y Van Leeuwen C.J. (1991). Combined effects of metals; an ecotoxicological evaluation. *Water Res.* 25, 679-687.
- Hellawell J.M. (1989). *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management* (K. Mellamy Ed.). Pollution Monitoring Series. Elsevier Applied Science, Nueva York, 546 p.
- ISO (International Organization for Standardization) (1982). Water quality determination of the inhibition of the mobility for *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 6341, pp.1-10.
- Lewis P. y Horning W. (1988). A short-term chronic toxicity test using *Daphnia magna*. En: *Aquatic toxicology and hazard assessment* (W.J. Adams, G.A. Chapman, and W.G. Landis, Eds.). American Society for Testing and Materials. 10th Volume, ASTM STP 971 Filadelfia, pp. 548-555.
- Logan D. y Wilson H. (1995). An ecological risk assessment method for species exposed to contaminant mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 351-359.
- Martínez L., Germán C., Ramírez B. y Galar I. (1995). Efecto del carbaril y del plomo sobre fenoles, clorofila y proteínas de la microalga *Ankistrodesmus falcatus*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 37,93-99.
- Mosser J.L., Teng T., Walther W. y Wurster C. (1974). Interaction of PCBs, DDT in a marine diatom. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 665-668.
- Naddy R., La Point T. y Klaine S. (1995). Toxicity of arsenic, molybdenum and selenium combinations to *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 329-336.
- Parra O., Chuecas L., Vighi M. y Vismara R. (1991). El río Biobío y los problemas ambientales asociados a la calidad del agua. Resúmenes de ponencias, Seminario Internacional: Gestión Ambiental de los Recursos Hídricos Continentales y Marinos y Planificación Territorial. Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción pp. 52-54.
- Parra O., Chuecas L., Campos H., Vighi M. y Vismara R. (1993). Evaluación de la calidad del agua y ecología del sistema limnítico y fluvial del río Biobío. Serie Monografías Científicas EULA, Universidad de Concepción 12, 15-161.
- Salomons W. y Förstner V. (1984). *Metals in the hydrocycle*. Springer-Verlag, Berlin, 349 p.

- Stokes P.M. (1975). Uptake and accumulation of copper and nickel by metal-tolerant strains of *Scene*. *Verhandlungen, Internationale Vereinigung für Theoretische and Angewandte Limnologie* 19, 2128-37.
- Sprage J.B. (1973). The ABC's of pollutant bioassay using fish. En: *Biological methods for the assessment of water quality*. American Society for Testing and Materials ASTM STP 528, pp. 6-30.
- Swartz R.C., Kemp P.F., Schults D.W. y Lamberson J.O. (1981). Effects of mixtures of sediment contaminants on the marine infaunal amphipod, *Rhepoxinius abronius*. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 1013-1020.
- Urrutia R. (1993). Modificación de la estructura de las comunidades fitobentónicas producidas por la acción de agentes naturales, industriales y urbanos. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales, EULA, Universidad de Concepción.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1993). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine organisms. 4a. Ed., EPA/600/4-90/027F.
- Venegas W., Hermosilla I., Gavilán J.F., Naveas R. y Carrasco P. (1993). Estados larvales del anfibio anuro *Caudiverbera caudiverbera*: modelo biológico para estudios de agentes genotóxicos. *Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile* 58, 171-180.
- Warren C. (1987). *Biology and water pollution control*. W.B. Saunders, Filadelfia.
- WHO (World Health Organization) (1987). Pentachlorophenol. *Environ. Health Criteria* 71, Ginebra, 236 p.