



SETAC – Brazil

Efecto de Mezclas Binarias de Tres Metales Pesados Sobre Larvas de *Chironomus calligraphus*

J. IANNAONE^{1,2*} & N. SALAZAR²

¹Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú

²Laboratorio de Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), Lima, Perú

(Received January 17, 2007; Accepted October 25, 2007)

RESUMEN

Se evaluó el efecto tóxico de mezclas binarias de tres metales pesados: Cd²⁺ y Hg²⁺ (constante); Pb²⁺ y Hg²⁺ (constante); Hg²⁺ y Cd²⁺ (constante); Pb²⁺ y Cd²⁺ (constante); Cd²⁺ y Pb²⁺ (constante); y finalmente Hg²⁺ y Pb²⁺ (constante) sobre la larva de *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae) a 48 h de exposición. La toxicidad aguda de los metales pesados en pares de mezclas mostraron interacciones de tipo sinérgico (Unidad tóxica (UT) < 1) para Pb²⁺ y Hg²⁺ (constante) (UT = 0,44); Cd²⁺ y Pb²⁺ (constante) (UT = 0,61); Pb²⁺ y Cd²⁺ (constante) (UT = 0,63); y Hg²⁺ y Cd²⁺ (constante) (UT = 0,77) y interacciones antagónicas (UT > 1) para Cd²⁺ y Hg²⁺ (constante) (UT = 1,23) y Hg²⁺ y Pb²⁺ (constante) (UT = 4,15). Los resultados indican que *C. calligraphus* es una herramienta ecotoxicológica adecuada para evaluar mezclas de metales pesados.

Palabras claves: *Chironomus*, concentración letal media, ensayos ecotoxicológicos, ecotoxicidad, mezclas de metales, cadmio, mercurio, plomo.

ABSTRACT

Effect of binary mixtures of three heavy metals on larvae of *Chironomus calligraphus*

Toxic effects of binary mixtures of three heavy metals: Cd²⁺ and Hg²⁺ (constant); Pb²⁺ and Hg²⁺ (constant); Hg²⁺ and Cd²⁺ (constant); Pb²⁺ and Cd²⁺ (constant); Cd²⁺ and Pb²⁺ (constant); and finally Hg²⁺ and Pb²⁺ (constant) on larvae of *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae) after 48 h exposure were evaluated. The acute toxicity of heavy metals in pairs of mixtures, showed synergistic interactions (Toxic Unit = (TU) < 1) for Pb²⁺ and Hg²⁺ (constant) (TU = 0.44); Cd²⁺ and Pb²⁺ (constant) (TU = 0.61); Pb²⁺ and Cd²⁺ (constant) (TU = 0.63); and Hg²⁺ and Cd²⁺ (constant) (TU = 0.77), and antagonistic interactions (TU > 1) for Cd²⁺ and Hg²⁺ (constant) (TU = 1.23) and Hg²⁺ and Pb²⁺ (constant) (TU = 4.15). Obtained results showed that *C. calligraphus* is a suitable ecotoxicological tool to evaluate mixtures of heavy metals.

Key words: *Chironomus*, mean lethal concentration, ecotoxicological bioassay, ecotoxicity, mixture of metals, cadmium, lead, mercury.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo industrial acelerado en los últimos años en los países y regiones del mundo con abundancia de recursos naturales ha contribuido a aumentar el grado de contaminación de las aguas superficiales y marítimas. Los ríos, lagos y mares

son receptores finales de las evacuaciones de desechos de distintos orígenes como residuales domésticos, de las escorrentías en agricultura y principalmente de los efluentes sólidos y líquidos de las actividades industriales del sector minero (Paredes, 1999; Denton *et al.*, 2003; Overmyer *et al.*, 2003). La acumulación de esos residuos contaminantes en los

*Corresponding author: José Iannacone, e-mail: joseiannacone@yahoo.es.

diferentes cuerpos de agua ocasiona un creciente deterioro del ambiente a escalas locales, regionales y globales (Ahumada, 1995). Se ha señalado que la mezcla de metales pesados puede modificar la toxicidad de éstos en el ambiente (Utgikar *et al.*, 2004).

Por no presentar degradación biológica ni química y por ser bioacumulables, los metales pesados están considerados entre los contaminantes más letales (Merian, 1994). Como consecuencia de la bioacumulación, las concentraciones de los metales pesados en los últimos niveles de las cadenas tróficas pueden alcanzar valores muchas veces superiores a las que se encuentran en el agua (Cassee *et al.*, 1999).

La investigación del efecto ecotoxicológico de mezclas de metales pesados otorga mayor realismo a la evaluación de la calidad de agua (Wong & Pak, 2004), lo que justifica la realización de ensayos que analicen los efectos de las sustancias químicas combinadas (Enserink *et al.*, 1991). A través de estos estudios se establecen los criterios de calidad para la protección de la vida acuática los que posteriormente se utilizan para determinar los estándares de calidad ambiental para cada agente químico (Burton & Nordstrom, 2004).

Para medir la toxicidad en ambientes acuáticos se han utilizado especies de invertebrados, entre ellos miembros de la familia Chironomidae (Silva *et al.*, 2001; Michailova *et al.*, 2003; de Haas *et al.*, 2004; Janssens *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2004). En el Perú, para estudios de ecotoxicidad en muestras de agua se ha utilizado a *Chironomus calligraphus* (Goeldi, 1905) (Diptera: Chironomidae), especie predominantemente neotropical, característica de los ambientes acuáticos naturales y antropogénicos (Iannacone & Dale, 1999). Presenta como ventaja principal su abundancia y disponibilidad, así como la importancia ecológica en las cadenas tróficas dulceacuícolas. Además son fáciles de mantener en cultivos en condiciones de laboratorio, presentan el primer estadio larval planctónico y los otros estadios larvales bentónicos. Es sabido que en el primer estadio larval son sensibles a metales pesados y pesticidas en el agua, y se les ha empleado para el monitoreo ecotoxicológico del agua del río Rímac, principal río de la ciudad de Lima, Perú (Iannacone *et al.*, 2000; Iannacone *et al.*, 2002; Iannacone & Alvariano, 2005). También se ha evaluado su supervivencia en muestras acuáticas que provienen de sedimentos elutriados dulceacuícolas (Arrascue *et al.*, 2001). Sin embargo, en *C. calligraphus*, solo se conocen los efectos individuales de los metales pesados como cobre, cadmio, mercurio y plomo, siendo desconocidos los efectos de mezclas binarias (Iannacone *et al.*, 2003; Iannacone & Alvariano, 2004).

Así, es importante estimar si la mezcla binaria de metales pesados (cadmio, mercurio y plomo) produce efectos toxicológicos sinérgicos o antagónicos en organismos representativos del ambiente acuático. Como resultado de lo expresado arriba, el objetivo de la presente investigación fue el siguiente: detectar y medir la toxicidad aguda estática, de las mezclas binarias de tres metales pesados (cadmio, mercurio

y plomo) a 48 h de exposición, sobre el primer estadio larval de *C. calligraphus* (Diptera: Chironomidae).

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo prueba

Chironomus calligraphus. Las masas de huevos de *C. calligraphus* fueron obtenidas de las paredes de la laguna terciaria de oxidación, del Complejo Biotecnológico y Unidad de Acuicultura de Villa el Salvador, Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), localizado en el Departamento de Lima, Perú. Las masas fueron extraídas con la ayuda de pinzas entomológicas y con una pipeta para captura acuática (Cienytec, Bogota, Colombia) para luego ser trasladadas en recipientes de plástico de un litro de capacidad. Las colectas de las masas de huevos fueron realizadas semanalmente durante un periodo de seis meses, siendo realizados de dos a tres bioensayos por semana. Los huevos fueron incubados en una solución a base de hojas de cereal "Cereal Leaves" (0,01%) (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) en recipientes de vidrio de 100 mL aproximadamente mantenidos a un fotoperiodo de 12:12, a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a un pH de $7 \pm 0,5$. Después de la eclosión de huevos entre las 48 a 72 h a la temperatura estudiada, se obtuvieron individuos del primer instar larval que son planctónicos por ser el estado larval más susceptible a metales pesados en ensayos de toxicidad acuática (Iannacone *et al.*, 2000). El primer instar larval planctónico permanece entre 72 a 96 h antes de pasar al segundo instar larval bentónico. La identificación taxonómica como *C. calligraphus* fue realizada por el Dr. Wolfgang Wuelker, Institute für Biologie, Freiburg, Alemania (Iannacone & Dale, 1999).

Ensayos ecotoxicológicos utilizando larvas de Chironomus calligraphus

Larvas de *Chironomus*. El procedimiento de este bioensayo es descrito por Iannacone & Dale (1999). Para realizar los bioensayos de toxicidad aguda con mezclas binarias de metales pesados se utilizaron 240 larvas de primer instar de *C. calligraphus*. Se distribuyeron al azar colocando grupos de 10 larvas dentro de las 24 h de haber eclosionado de los huevos en envases de vidrio de 40 mL de capacidad. Las larvas no se alimentaron durante el ensayo y tampoco se empleó ningún sustrato en el fondo del envase (Iannacone & Dale, 1999). Para la discriminación de la mortalidad se usó el criterio propuesto por Iannacone *et al.* (2002). Las larvas de *C. calligraphus* fueron expuestas durante 48 h en condiciones de laboratorio con fotoperiodo de 12:12, a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a un pH de $7 \pm 0,5$. El control consistió para todos los casos en un medio de dilución para las mezclas de una solución a base de hojas de cereal "Cereal Leaves" al 0,01% (APHA, 1995). Se realizaron paralelamente a las evaluaciones ensayos con sulfato de cobre (CuSO_4) como tóxico de referencia para evaluar la sensibilidad

de *C. calligraphus* y de esta forma asegurar la apropiada condición fisiológica del insecto (Iannacone & Alvareño, 2004).

Preparación de las soluciones prueba. Se empleó las sales de cloruro de mercurio (HgCl_2), cloruro de cadmio (CdCl_2) y nitrato de plomo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) para la preparación de las soluciones “stock” de los metales pesados evaluados. Los experimentos de interacción se hicieron después de lograr todas las combinaciones posibles entre los iones metálicos: mercurio, cadmio y plomo. Los iones se combinaron en pares conformados por: [$\text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante); $\text{Pb}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante)], [$\text{Hg}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante); $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante)]; [$\text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante); $\text{Hg}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante)] a partir de sus sales respectivas. El ión del metal pesado que se mantuvo constante fue aquel que no varió en su cantidad en mg L^{-1} con las cinco concentraciones crecientes del otro ión en la mezcla binaria. Las concentraciones utilizadas para los iones que se mantuvieron constantes durante las distintas combinaciones binarias fueron: Hg^{2+} ($0,06 \text{ mg L}^{-1}$), Cd^{2+} ($0,06 \text{ mg L}^{-1}$) y Pb^{2+} ($9,36 \text{ mg L}^{-1}$). Estas concentraciones fueron calculadas a partir de la siguiente fórmula: $[(\text{Concentración letal media} = \text{CL}_{50}) / 2]$, la cual fue obtenida a partir de la CL_{50} de cada uno de los metales utilizados individualmente en bioensayos previos a 48 h de exposición (Iannacone *et al.*, 2003). Las concentraciones utilizadas para los tres iones metálicos para las mezclas binarias fueron las indicadas en la Tabla 1.

Tratamiento de datos

Para el análisis de los datos de cada bioensayo se diseñó una estructura de bloques completamente aleatorizados constituido por seis niveles (cinco concentraciones y un control) y cuatro repeticiones. Cada bioensayo con mezclas binarias de metales fue repetido seis veces. La eficacia de los tratamientos se evaluó mediante la prueba de Fisher a través de un análisis de Varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los porcentajes de mortalidad a raíz cuadrada del arcoseno, con el fin de ajustar los datos a la distribución normal (Zar, 1996). En el caso de las diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones se realizó una Prueba de Significación DVS (Diferencia Verdaderamente Significativa) de Tukey a un nivel de significancia de 0,05. La CL_{50} y sus

respectivos límites de confianza al 95%, se calcularon usando el programa computarizado EPA – Probit versión 1,5. Además se determinaron experimentalmente dos valores de efectos subletales: Concentración de Efectos No Observables (NOEC) y Concentración más Baja de Efectos Observables (LOEC) para cada uno de los ensayos evaluados. Se calculó el parámetro de unidad tóxica (= UT) ($\text{CL}_{50} \text{ mezcla} / \text{CL}_{50} \text{ del metal individual}$) para determinar si existen efectos antagónicos ($\text{UT} > 1$) o sinérgicos ($\text{UT} < 1$) para las mezclas binarias de metales. El nivel de significancia fue $\alpha = 0,05$ (Zar, 1996). Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete SPSS versión 11,0 para Windows.

RESULTADOS

El orden decreciente de los valores de CL_{50} de la mezcla binaria de metales fue: $\text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Hg}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Cd}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Hg}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Pb}^{2+} + \text{Hg}^{2+}$ (constante) $>$ $\text{Pb}^{2+} + \text{Cd}^{2+}$ (constante) (Tabla 2).

La Tabla 3 muestra los rangos de valores de la prueba de Fisher para cada una de los metales pesados en las interacciones binarias, los cuales indican que los porcentajes de mortalidad de *C. calligraphus* fueron diferentes al control desde la concentración más baja para mezcla binaria de los tres metales pesados. Se observó en todos los casos que los porcentajes de mortalidad de *C. calligraphus* se incrementaron con el aumento de la concentración binaria de metales pesados (Tabla 3).

Dos interacciones binarias de las mezclas de los tres metales pesados fueron antagónicas y cuatro fueron sinérgicas (Tabla 4). La toxicidad aguda de los metales pesados en pares de mezclas, mostraron interacciones de tipo sinérgico (Unidad tóxica $\text{UT} < 1$) para Pb^{2+} y Hg^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,44$); Cd^{2+} y Pb^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,61$); Pb^{2+} y Cd^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,63$); y Hg^{2+} y Cd^{2+} (constante) ($\text{UT} = 0,77$) e interacciones antagónicas ($\text{UT} > 1$) para Cd^{2+} y Hg^{2+} (constante) ($\text{UT} = 1,23$), y Hg^{2+} y Pb^{2+} (constante) ($\text{UT} = 4,15$). El Cd presentó un comportamiento muy particular, cuando se presentaba en concentración constante con Hg y Pb que variaban, produjo efectos sinérgicos; en cambio cuando la concentración del Cd varía con Hg constante, entonces se observó efecto antagónico sobre *C. calligraphus* a 48 h de exposición (Tabla 4).

Tabla 1 – Concentraciones nominales utilizadas para los tres iones metálicos en los ensayos de toxicidad con larvas de *Chironomus calligraphus*.

Ion metálico	Concentración (mg L^{-1})				
	1	2	3	4	5
Cadmio (Cd^{2+})	0,125	0,25	0,5	1	2
Mercurio (Hg^{2+})	0,06	0,12	0,25	0,5	1
Plomo (Pb^{2+})	6,25	12,5	25	50	100

Tabla 4 – Valor de la CL_{50} , expresados en $mg L^{-1}$, para cada metal empleado individualmente, en mezclas, y tipo de interacción verificada. CL_{50} ($mg L^{-1}$): Hg (0,13); Cd (0,13); Pb (18,73).

Combinaciones	CL_{50}	Cálculo de la unidad tóxica	UT	Tipo de interacción
$Cd^{2+} + Hg^{2+}$	0,16	$Cd^{2+} + Hg^{2+}/Cd^{2+}$	1,23	Antagónica
$Pb^{2+} + Hg^{2+}$	8,32	$Pb^{2+} + Hg^{2+}/Pb^{2+}$	0,44	Sinérgica
$Hg^{2+} + Cd^{2+}$	0,10	$Hg^{2+} + Cd^{2+}/Hg^{2+}$	0,77	Sinérgica
$Pb^{2+} + Cd^{2+}$	11,80	$Pb^{2+} + Cd^{2+}/Pb^{2+}$	0,63	Sinérgica
$Cd^{2+} + Pb^{2+}$	0,08	$Cd^{2+} + Pb^{2+}/Cd^{2+}$	0,61	Sinérgica
$Hg^{2+} + Pb^{2+}$	0,54	$Hg^{2+} + Pb^{2+}/Hg^{2+}$	4,15	Antagónica

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que las interacciones sinérgicas y antagónicas observadas para las diversas combinaciones binarias de Cd, Hg y Pb sobre *C. calligraphus* indican una reevaluación de los límites máximos permisibles actuales de calidad de agua para proteger la vida acuática. Los valores referidos a la Clase VI para aguas de zonas de preservación de fauna acuática y pesca recreativa o comercial de la Ley General de Aguas del Perú, D.L. N° 17752 son para el Cd de $0,004 mg L^{-1}$, para el Hg de $0,0002 mg L^{-1}$ y para el Pb de $0,03 mg L^{-1}$, los cuales se basan en datos obtenidos en pruebas de toxicidad con un solo contaminante individual (Pyle *et al.*, 2002; Verslycke *et al.*, 2003). Enserick *et al.* (1991) encontró que distintos metales, en mezclas equitóxicas, provocaron efectos tóxicos en especies como *Daphnia magna* Strauss, 1820 y *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), pero que individualmente a las mismas concentraciones no causaron efectos significativos. Nuestros resultados concuerdan con lo obtenido por estos autores al encontrar que diversas mezclas binarias de metales pesados pueden producir efectos sinérgicos o antagónicos (Tabla 4). Gray & Ventilla (1973) encontraron que la acción conjunta del Zn, Pb y Hg en varias combinaciones afectó la tasa de desarrollo de protozoos marinos, observándose efectos más o menos aditivos dependiendo de las concentraciones ensayadas.

Se ha observado en pruebas ecotoxicológicas con organismos acuáticos bénticos como *Tympanotonus fuscatus* (Linnaeus, 1758), *Clibanarius africanus* (Milne-Edwards, 1867) y *Perisesarma huzardi* (Desmarest, 1825) que el Pb en combinación con otros metales, presenta interacciones sinérgicas (Otitoloju, 2003). En forma similar, en *C. calligraphus* se observó un patrón de sinergismo del Pb + Hg (constante) y Pb + Cd (constante) (Tabla 4). En los salmónidos *Salvelinus confluentus* (Suckley, 1859) y *O. mykiss*, se observaron efectos sinérgicos entre Cd + Zn. Forget *et al.* (1999) encontraron efectos sinérgicos en las combinaciones binarias de As, Cu

y Cd en el copépodo *Tigriopus brevicornis* (Müller, 1776). En oposición, en *C. calligraphus* se observaron efectos antagónicos de Cd + Hg y del Hg + Pb (Tabla 4). Fernández & Beiras (2001) indican efectos aditivos en las mezclas binarias de Hg + Cd y Hg + Cu en embriones del erizo *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), solamente se presentó efectos sinérgicos en la mezcla binaria Hg + Pb. En *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) se ha encontrado efectos sinérgicos entre Zn + Cd, pero en cambio en embriones de bivalvos efectos antagónicos para esta misma mezcla binaria (Vanegas *et al.*, 1997). Las mezclas de Hg + Cu + Zn sobre larvas de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) fueron antagónicas. Nuestros resultados muestran que las interacciones cambian dependiendo de las concentraciones empleadas (Tabla 4). Biesinger *et al.* (1986) encontró una reducción significativa en la reproducción de *D. magna* por acción de combinaciones binarias de Cd + Hg, Cd + Zn y Zn + Hg, a concentraciones donde los metales individuales no causaron efectos significativos. Ince *et al.* (1999) indican toxicidad del Zn, Cu, Co y Cr en interacciones binarias sobre la bacteria *Vibrio fisheri* (Beijerinck, 1889) usando el ensayo Microtox® y en la lentejita de agua *Lemna minor* (Linnaeus, 1753). Fargasova (2001) encontró en ensayos ecotoxicológicos con *Chironomus plumosus* (Linnaeus, 1758) en asociación binaria de Cd, Cu, Zn y Al que los modelos de interacción variaron de sinérgico a antagónico. La adición de más Cd en una mezcla binaria con Cu disminuye la toxicidad en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) (Jonker *et al.*, 2004). En nuestro caso se encontró un comportamiento semejante de disminución de la toxicidad (antagonismo) en *C. calligraphus* al incrementar la concentración de Cd en mezclas binarias con Hg (Tabla 4).

Para estimar el impacto de la contaminación por metales pesados en el ambiente acuático es necesario evaluar no solo mezclas binarias, sino también combinaciones de tres o más metales con contaminantes orgánicos. Esto es difícil porque el número de pruebas se incrementan exponencialmente con el número de químicos involucrados (Enserink *et al.*, 1991;

Cassee *et al.*, 1999). Además, los metales no sólo interactúan entre ellos, sino que su toxicidad también depende de los factores ambientales que afectan su especiación como el pH, la salinidad y los niveles materia orgánica disuelta (Witters, 1998; Fernández & Beiras, 2001). Finalmente, nuestros resultados indican que las interacciones sinérgicas y antagónicas observadas para las combinaciones binarias de Cd, Hg y Pb sobre *C. calligraphus* requieren reevaluar los límites máximos permisibles actuales de calidad de agua dulce para proteger la vida acuática en el Perú, debido a que actualmente se sustentan en valores obtenidos de pruebas de toxicidad con un solo contaminante individual.

REFERENCIAS

- AHUMADA, R., 1995, Herramientas conceptuales para la conservación del ambiente costero. Criterios para evaluar los impactos ambientales en los sistemas marinos. *Cienc. Tec. Mar. Cona*, (Número especial): 3-13.
- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) & WPCF (Water Pollution Control Federation), 1995, *Standard methods for examination of water and wastewater*. 19th American Health Association, Washington, D.C.
- ARRASCUE, A., IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L., BASILIO, S. & LASCANO, 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.
- BIESINGER, N. E., CHRISTENSEN, G. M. & FIANDT, J.T., 1986, Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 11: 9-14.
- BURTON, G. A. J. R. & NORDSTROM, J. E., 2004, An *in situ* toxicity identification evaluation method. Part I: Laboratory validation. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 2844-2850.
- CASSEE, F. R., SÜHNEL, J., GROTEN, J. P. & FERON, V., 1999, Toxicology of chemical mixtures. In: B. Ballantyne, Marrs, T. & Syversen, T. (eds.), *General and applied toxicology*, Vol. 1. MacMillan, London, p. 303-319.
- DENTON, D. L., WHEELLOCK, C. E., MURRIA, S. A., DEANOVIC, L. A., HAMMOCK, B. D. & HINTON, D. E., 2003, Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to larval fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 336-341.
- ENSERINK, E. L., MAAS-DIEPEVEEN, J. L. & VAN LEEUWEM, C. J., 1991, Combined effects of metals: an ecotoxicological evaluation. *Wat. Res.*, 25: 679-687.
- FARGASOVA, A., 2001, Winter third- to fourth instar larvae of *Chironomus plumosus* as bioassay tools for assessment of acute toxicity metals and their binary combinations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48: 1-5.
- FERNÁNDEZ, N. & BEIRAS, R., 2001, Combined toxicity of dissolved mercury and copper; lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicol.*, 10: 263-271.
- FORGET, J., PAVILLON, J. F., BELIAEFF, B. & BOCQUENÉ, G., 1999, Joint action of pollutant combination (pesticides and metals) on survival (LC₅₀ values) and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis* (Copepoda, Harpacticoida). *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 912-918.
- GRAY, J. S. & VENTILLA, R. J., 1973, Growth rates of sediment-living marine protozoan as a toxicity indicator for heavy metals. *Ambio*, 2: 118-121.
- DE HAAS, E. M., LEON PAUMEN, M., KOELMANS, A. A. & KRAAK, M. H., 2004, Combined effects of copper and food on the midge *Chironomus riparius* in whole-sediment bioassays. *Environ. Pollut.*, 127: 99-107.
- IANNAZONE, J. & DALE, W., 1999, Protocolo de bioensayo ecotoxicológico para evaluar metales pesados contaminantes de agua dulce con *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae) y *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera), en el Rímac, Lima, Perú. *Rev. Per. Ent.*, 41: 111-120.
- IANNAZONE, J., DALE, W. & ALVARIÑO, L., 2000, Monitoreo ecotoxicológico del río Rímac (Lima-Perú) empleando a *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae). *Rev. Chilena Ent.*, 27: 25-34.
- IANNAZONE, J., ALVARIÑO, L. & MANSILLA, J., 2002, Actividad insecticida de cuatro extractos botánicos sobre larvas de los mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) y *Chironomus calligraphus* (Diptera: Chironomidae). *Wiñay Yachay*, 6: 56-71.
- IANNAZONE, J., SALAZAR, N. & ALVARIÑO, L., 2003, Variabilidad del ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cadmio, mercurio y plomo. *Ecol. Apl.*, 2: 103-110.
- IANNAZONE, J. & ALVARIÑO, L., 2004, Variabilidad de un ensayo ecotoxicológico con *Chironomus calligraphus* Goeldi (Diptera: Chironomidae) para evaluar cobre. *Rev. Per. Ent.*, 44: 125-130.
- IANNAZONE, J. & ALVARIÑO, L., 2005, Selectividad del insecticida cartap empleando bioensayos con organismos no destinatarios. *Ecol. Apl.*, 4: 91-104.
- INCE, N. H., DIRILGEN, N., APIKYAN, I. G., TEZCANI, G. & USTUN, B., 1999, Assessment of toxic interaction of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36: 365-372.
- JANSSENS DE BISTHOVEN, L., GERHARDT, A. & SOARES, A. M., 2004, Effects of acid mine drainage on larval *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) measured with the multispecies freshwater biomonitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1123-1128.
- JONKER, M. J., PISKIEWICZ, A. M., IVORRA, N., CASTELLA, I., KAMMENG, J. E., 2004, Toxicity of binary mixtures of cadmium-copper and carbendazim-copper to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1529-1537.
- MARTÍNEZ, E. A., MOORE, B. C., SCHAUMLOFFEL, J. & DASGUPTA, N., 2004, Teratogenic versus mutagenic abnormalities in chironomid larvae exposed to zinc and lead. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 193-198.
- MERIAN, E., 1994, Metals aquatic contamination. Workshop. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 144-146.
- MICHAILOVA, P. V., ILKOVA, J. & WHITE, K., 2003, Cytogenetic alterations in Prodiamesinae species (Diptera, Chironomidae) from different polluted regions. *Folia Biol. (Krakow)*, 51: 69-79.
- OTITOLOJU, A. A., 2003, Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *J. Environ. Manag.*, 67: 121-128.
- OVERMYER, J. P., ARMBRUST, K. L. & NOBLET, R., 2003, Susceptibility of black fly larvae (Diptera: Simuliidae) to lawn-care insecticides individually and as mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 1582-1588.
- PAREDES, O., 1999, *Niveles de contaminación por relaves en la Laguna de Pías, Enero -Diciembre 1998*. Tesis de Magister en Ciencias, Mención Gestión Ambiental, Trujillo, Universidad Nacional de Trujillo, Perú, 110 p.

- PYLE, G. G., SWANSON, S. M. & LEHMKUHL, D. M., 2002, Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environ. Pollut.*, 116: 243-255.
- SILVA, J., IANNAcone, J., CIFUENTES, A., TRONCOSO, L., BAY-SCHMITH, E. & LARRAIN, A. 2001, Assessment of sensitivity to pentachlorophenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. *Ecotoxicol. Environm. Rest.*, 4: 10-17.
- UTGIKAR, V. P., CHAUDHARY, N., KOENIGER, A., TABAK, H. H., HAINES, J. R. & GOVIND, R., 2004, Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water. Res.*, 38: 3651-3658.
- VANEGAS, C., ESPINA, S., BOTELLO, A. V. & VILLANUEVA, S., 1997. Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, Juveniles. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58: 87-92.
- VERSLYCKE, T., VANGHELUWE, M., HEIJERICK, D., DE SCHAMPHELAERE, K., VAN SPRANG, P. & JANSSEN, C. R., 2003, The toxicity of metal mixture to estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) under changing salinity. *Aquat. Toxicol.*, 64: 307-315.
- WITTERS, H. E., 1998, Chemical speciation dynamic and toxicity assessment in aquatic systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 41: 90-95.
- WONG, C. K. & PAK, A. P., 2004, Acute and subchronic toxicity of the heavy metals copper, chromium, nickel, and zinc, individually and in mixture, to the freshwater copepod *Mesocyclops pehpeiensis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 73: 190-196.
- ZAR, J. H., 1996, *Bioestatistical analysis*. 3th ed. Prentice-Hall. Inc., New Jersey, Upper Saddle River, 662 p.

