



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Relación entre el método BMWP y la sensibilidad al cobre en macroinvertebrados acuáticos de aguas continentales

Sara Tabares Cardona

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente
Medellín, Colombia
2020

Relación entre el método BMWP y la sensibilidad al cobre en macroinvertebrados acuáticos de aguas continentales

Sara Tabares Cardona

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Medio Ambiente y desarrollo

Director:

PhD. Sebastian Reynaldi

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente

Medellín, Colombia

2020

Resumen

El método “Biological Monitoring Working Party” (BMWP) identifica taxones de macroinvertebrados acuáticos con un puntaje del uno al diez, excluyendo el nueve. El puntaje diez corresponde a los taxones más sensibles a la materia orgánica (MO). Sin embargo, la MO disminuye las concentraciones medianas letales (LC_{50}) para el cobre (Cu), puesto que la MO forma complejos con los iones, impidiendo de esta manera la entrada de Cu a los organismos acuáticos. Lo anterior, sugiere tolerancia al Cu en taxones con alta puntuación del BMWP. Mediante curvas de distribución de sensibilidad (SSD) se compararon las LC_{50} para $CuSO_4$ descargadas de ECOTOX (<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>). Rutinas en lenguaje R combinaron los paquetes “dplyr”, “ssdtools” y “ggplot2” para seleccionar las LC_{50} determinadas en especies de taxones incluidos en el BMWP bajo condiciones comparables y finalmente, construir mediante ellas, curvas SSD. El taxón más tolerante fue Perlidae con puntaje diez. Pero, Ephemerellidae, igualmente con puntaje diez, resultó afectado a una concentración poco mayor a la que afectó el 50% de los taxones (HC_{50}). El taxón más sensible fue Unionidae con puntaje seis. Sin embargo, Gammaridae, igualmente con puntaje seis, resultó afectado a una concentración mayor que HC_{50} . La especie más tolerante fue *Asellus aquaticus* con puntaje tres. Pero, *Biomphalaria glabrata*, igualmente con puntaje tres, resultó afectada a una concentración menor a la que afectó al 25% de las especies. La especie más sensible fue *Lampsilis siliquoidea* con puntaje seis. Pero, *Gammarus lacustris*, también con puntaje seis, resultó afectada a una concentración mayor de la que afectó el 75% de las especies. Además, la sensibilidad de las especies fue diferente dentro de un mismo taxón. Estos resultados sugieren que no existe relación entre el puntaje BMWP y la tolerancia al Cu, la cual varía de especie a especie.

Palabras clave: SSD, LC_{50} , BMWP, Cobre, Materia Orgánica.

Relationship between the BMWPmethod and copper sensitivity inaquatic macroinvertebrates of continental water.

Sara Tabares Cardona

Research thesis submitted as a partial requirement to qualify for the degree of:

Master in Environment and Development

Director:

PhD, Sebastián Reynaldi

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente

Medellín, Colombia

2020

Abstract

The Biological Monitoring Working Group (BMWP) method ranks aquatic macroinvertebrate taxa with a score of one to ten, excluding nine. Score ten corresponds to the taxa most sensitive to organic matter (OM). However, OM forms complexes with metal ions, preventing their entry into aquatic organisms. OM decreased lethal median concentrations (LC₅₀) for copper. This effect suggests tolerance to copper in taxa with high BMWP scores. Sensitivity distribution curves (SSD) compared LC₅₀s para CuSO₄ of downloaded from ECOTOX (<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>). Routines in R language combined the packages "dplyr", "ssdtools" and "ggplot2" to select LC₅₀s determined in species of BMWP taxa under comparable conditions, and build the SSD curves with them. The most tolerant taxon was Perlidae, scored with ten. However, Ephemerellidae, also scored with ten, resulted affected for a concentration slightly higher than that which affected 50% of the taxa (HC₅₀). The most sensitive taxon was Unionidae scored with six. However, Gammaridae, also scored with six, was affected at a concentration higher than HC₅₀. The most tolerant species was *Asellus aquaticus*, scored with three. However, *Biomphalaria glabrata*, also scored with three, resulted affected for a concentration lower than which affected 25% of the species. The most sensitive species was *Lampsilis siliquoidea*, scored with six. However, *Gammarus lacustris*, also scored with six, was affected for a concentration higher than which affected 75% of the species. Furthermore, the sensitivity of the species was different within the same taxon. These results suggest that there is no relationship between the BMWP score and copper tolerance, and the copper sensitivity varies from specie to specie.

Keywords: SSD, LC₅₀, BMWP, Copper, Organic matter

Contenido

Resumen	V
Abstract	VII
Contenido	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de ilustraciones	X
Lista de tablas	XI
Lista de abreviaturas	XII
Introducción	13
Capítulo 1	4
Materiales y métodos	4
Capítulo 2	7
Resultados	7
1.1 Sensibilidad de los taxones	7
1.2 Sensibilidad de las especies	10
1.3 Sensibilidad de las especies dentro de un mismo taxón	13
Capítulo 3	21
Discusión	21
Conclusiones	25
Bibliografía	26

Lista de figuras

- Figura 2-1.** Curva de distribución de sensibilidad al sulfato de cobre (CuSO₄) de taxones del método BMWP con sus respectivos puntajes. 10
- Figura 2-2.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones del método BMWP con sus respectivos puntajes. 12
- Figura 2-3.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones Asellidae (blanco), y Baetidae (negro) 15
- Figura 2-4.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones Chironomidae (blanco), y Ephemerellidae (negro) 16
- Figura 2-5.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones Gammaridae (blanco), y Lymnaeidae (negro) 17
- Figura 2-6.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones Perlidae (blanco), y Physidae (negro) 19
- Figura 2-7.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones Planariidae (blanco), y Planorbidae (negro) 20
- Figura 2-8.** Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones Tubificidae (blanco), y Unionidae (negro) 21

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Descripción ilustrativa de la Introducción	3
--	---

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1. Concentraciones peligrosas (HC) que afectan al 5, 25, 50, 75 y 95 % de los taxones o las especies.....	11
--	----

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>BMWP</i>	Biological monitoring working party
<i>MO</i>	Materia Orgánica
<i>CUSO₄</i>	Sulfato de cobre II
<i>LC₅₀</i>	Concentración mediana letal
<i>LC_{50S}</i>	Concentraciones medianas letales
<i>EC₅₀</i>	Concentración efectiva media
<i>HC₅</i>	Concentración que afecta al 5% de las especies o taxones
<i>HC₂₅</i>	Concentración que afecta al 25% de las especies o taxones
<i>HC₅₀</i>	Concentración que afecta al 50% de las especies o taxones
<i>HC₇₅</i>	Concentración que afecta al 75% de las especies o taxones
<i>HC₉₅</i>	Concentración que afecta al 95% de las especies o taxones
<i>SSD</i>	Curvas de distribución de la sensibilidad de las especies

Introducción

Un grupo de biólogos del Reino Unido, *Biological monitoring working party* (BMWP), desarrolló un método para monitorear la contaminación por materia orgánica, principalmente de aguas cloacales domésticas, en cuerpos de aguas dulceacuícolas. Este método, conocido como BMWP, utiliza invertebrados observables a simple vista, conocidos como macroinvertebrados, los cuales son identificados utilizando una puntuación del uno al diez, excluyendo el nueve (Metcalf-Smith, 1994). Las puntuaciones más altas corresponden a los organismos de taxones sensibles a la materia orgánica, como los encontrados en hábitats oligotróficos. En contraste, las puntuaciones más bajas corresponden a organismos de los taxones tolerantes a la materia orgánica, como los encontrados en hábitats eutróficos (Paisley *et al.*, 2014). De esta manera, el método BMWP ha sido utilizado para distinguir entre hábitats eutróficos y oligotróficos (Bazzanti *et al.*, 2017).

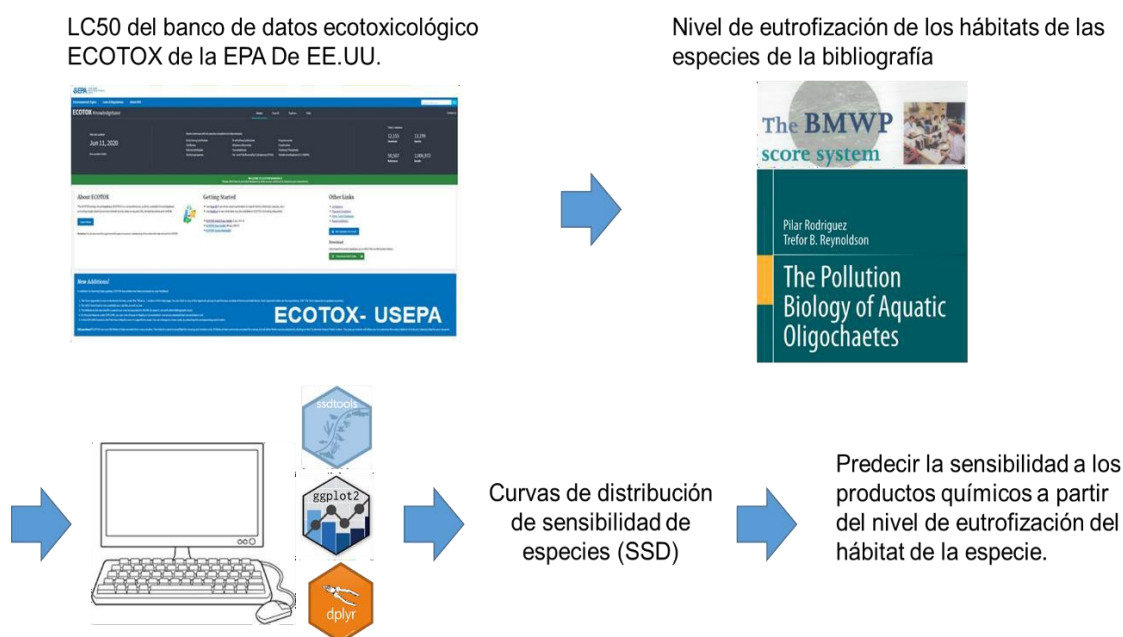
La materia orgánica disuelta en el agua disminuye los efectos de los metales tóxicos al formar complejos con los iones de estos metales, impidiendo que estos entren a los organismos acuáticos (Adams *et al.*, 2020). Sin embargo, la tolerancia a los metales tóxicos no sería seleccionable como una adaptación en individuos de especies de hábitats eutróficos con abundante materia orgánica disuelta. Por el contrario, los individuos tolerantes serían seleccionados en hábitats oligotróficos, sin grandes cantidades de materia orgánica para protegerlos. En especies dulceacuícolas de la subclase Oligochaeta, la sensibilidad a los metales fue mayor en especies de hábitats eutróficos que en especies de hábitats oligotróficos (Chapman *et al.*, 1982). Rodríguez y Reynoldson (2011) explicaron estos resultados, al indagar cuáles eran las exposiciones naturales a metales, producto de la erosión, que seleccionaron a los individuos más tolerantes en las especies de Oligochaeta en los hábitats oligotróficos. Así, las especies de los taxones con bajas puntuaciones en el método BMWP deberían ser más tolerantes a los metales que los taxones con altas puntuaciones.

La sensibilidad de una especie a un compuesto químico resulta de exponer poblaciones de organismos de la especie a crecientes concentraciones del compuesto químico. La salud de los individuos expuestos, monitoreada bajo condiciones controladas, permite establecer una relación de causalidad entre el compuesto químico y los efectos tóxicos (TGD, 2011). El porcentaje de la población expuesta sin respuesta biológica, cuantifica los efectos tóxicos del compuesto químico (ECHA, 2017). Cada concentración testada y su correspondiente porcentaje de inhibición, determinan puntos en un sistema de ejes cartesianos (ECHA, 2008). Modelos matemáticos predeterminados ajustan los puntos para extrapolar las concentraciones medianas efectivas (Ritz *et al.*, 2015). Entre las concentraciones efectivas está la concentración mediana letal (LC_{50}), la cual causa la muerte del 50% de los organismos de la población expuesta.

Los bancos de datos ecotoxicológicos almacenan las LC_{50} s desde hace más de cien años, como sucede con el banco Ecotox de la agencia de protección ambiental de los EE. UU (United States Environmental Protection Agency (USEPA, 2020)). El banco Ecotox permite seleccionar LC_{50} s determinados para un mismo compuesto químico, en varias especies, bajo condiciones experimentales comparables (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020). Curvas de distribución de la sensibilidad de las especies (SSD), comparan parámetros ecotoxicológicos o “endpoints” como LC_{50} s. La media geométrica es un método comúnmente utilizado para resumir todas las LC_{50} s equivalentes por especie o taxón en las curvas SSD (EPA, 2005). Cada media geométrica tiene su correspondiente percentil con respecto al total de especies o taxones considerados, resultando puntos bidimensionales en un sistema de ejes cartesianos (Kooijman, 1987). Funciones de densidad de probabilidades ajustan estos puntos para determinar la función de distribución acumulada más probable (Thorley y Schwarz, 2018). Esta función describe el aumento del porcentaje de especies o taxones afectados con el incremento de la concentración del compuesto químico investigado. La HC_5 , por las siglas “Hazardous concentration”, es la concentración que afecta al 5% de las especies o taxones (Posthuma *et al.*, 2001). Los taxones y especies más sensibles son los afectados a concentraciones menores o cercanas a HC_5 .

La disminución de la toxicidad del cobre en presencia de materia orgánica ha sido reportada en macroinvertebrados dulceacuícolas como los caracoles (Rogevich et al., 2008), crustáceos (Ryan *et al.*, 2009) y bivalvos (Gillis *et al.*, 2010). Así en el presente trabajo tuvo como objetivo comparar la sensibilidad al cobre de especies de macroinvertebrados cuyos taxones son considerados en el método BMWP, utilizando curvas SSD construidas con LC₅₀s descartadas del banco Ecotox (Ilustración 1).

Ilustración 1. Descripción ilustrativa de la Introducción



Capítulo 1

Materiales y métodos

Se seleccionaron y descargaron las LC_{50} s de macroinvertebrados incluidos en el BMWP, desde la parte acuática del banco Ecotox (<https://cfpub.epa.gov/ecotox/>). La selección incluyó las siguientes opciones: 1- “copper” en el parámetro “All chemicals”; 2- “Mortality Group” en el parámetro “All effects”; 3- “ LC_{50} ”, “ LD_{50} ”, “ AC_{50} ”, “ ID_{50} ”, “ IC_{50} ”, “ EC_{50} ”, y “ ED_{50} ” en el parámetro “All Endpoints”; 4- “Insects/Spiders”, “Other Invertebrates”, “Crustaceans”, “Molluscs” y “Worms” en el parámetro “All species”; 5- “Lab” y “Fresh Water” en el parámetro “All test Conditions”; y 6- los datos publicados desde 1915 hasta el tercer trimestre de 2020 en el parámetro “All publication options”. La selección incluyó “Select All” en “Display Fields” dentro de “Customize Out Fields”.

El programa Libre Office (<https://es.libreoffice.org>) abrió la planilla de cálculo descargada del banco Ecotox. El programa Libre Office permite seleccionar el idioma inglés de EE.UU, como idioma de origen del archivo, realizando la traducción del sistema de puntuación en sistemas operativos sin inglés como idioma estándar.

La comparación de sensibilidad abarcó una parte del total de los valores de LC_{50} s descargados y comparables entre sí. La selección consistió en el filtrado y eliminación de las siguientes LC_{50} s: 1. Aquellas LC_{50} s no registrados (NR) y las imprecisas en el campo o columna “Conc 1+” (considerados como imprecisas a las precedidas por los símbolos

">" y "<"); 2. Los correspondientes a especies con nombres científicos incompletos 3. Los determinados en periodos de tiempo no registrados (NR) o mayores a cuatro días en la columna "Observed Duration (Days)"; 4. Los correspondientes a los invertebrados no macroinvertebrados, identificados como "Ciliated Protozoa", "Rotifer", "Protozoan", "Ciliated" y "Protozoa" en la columna "Species Common Name"; 5. Los correspondientes a "labile", "dissolved" y "Formulation" en la columna "Concentration type", para conservar solo las LC₅₀s correspondientes a "Total"; 6. los determinados con concentraciones de CaCO₃ mayores que 80 mg/L y menores que 12 mg/L; 7. Los determinados con pH mayor que 7 y menor que 6; y 8. Los reportados en trabajos que investigaron los efectos de la materia orgánica, el pH, la alcalinidad, la dureza del agua sobre las LC₅₀s para cobre. El archivo resultante fue una hoja de cálculo del tipo "Open Document Spreadsheet" (ods) generada con programa el Libre Office.

Una rutina en lenguaje R (www.r-project.org) seleccionó las LC₅₀s de las especies que forman los taxones del método BMWP y los asoció con los respectivos puntajes, utilizando el paquete "dplyr" (Wickham *et al.*, 2018a). El comando "filter ()" seleccionó los valores de LC₅₀ de las especies que forman los taxones BMWP, teniendo en cuenta una previa comparación de los datos descargados con el listado de taxones del método BMWP (Paisley *et al.*, 2014). El comando "group_by ()" agrupó las LC₅₀s por especie o taxón y puntaje BMWP. El comando "summarise ()" calculó las respectivas medianas geométricas. Los comandos de esta rutina, permitieron también identificar al sulfuro de cobre (CuSO₄), número CAS 7758-98-7, como el compuesto químico de cobre con mayor número de LC₅₀s determinadas en especies de taxones del método BMWP con diferentes puntajes.

La segunda rutina en lenguaje R construyó las curvas SSD utilizando el paquete "ssdtools" (Thorley y Schwarz, 2018). El comando "ssd_fit_dists()" ordenó las LC₅₀s en forma ascendente y calculó los respectivos percentiles, también ajustó los puntos resultantes a las funciones de distribución acumulada de las siguientes seis funciones de densidad de probabilidades: Gamma, Log-Gumbel, Log-normal, Log-logístico, Gompertz y Weibull. El comando "ssd_gof()" fue utilizado para evaluar el ajuste y realizar un promedio de todas funciones de distribución acumulada, priorizando las de mejor ajuste.

El comando “predict()” de R generó 10.000 curvas con muestreo reiterativo. El comando “ssd_plot()” graficó: 1. Las curva promedio y las curvas de los extremos junto con el comando “geom_line”; 2. Los puntos junto con el comando “geom_point”; y 3. Los nombres de las especies o los taxones con el comando “geom_text”.

Dichos comandos “geom_line”, “geom_point” y “geom_text” pertenecen al paquete “ggplot2” (Wickham *et al.*, 2018b). Por su parte, el comando “geom_text” también permitió colocar el puntaje correspondiente dentro de los puntos que representaron a los taxones o las especies. El comando “ssd_hc” del paquete “ssdtools” extrapoló de la curva promedio las concentraciones de peligro o “Hazardous concentration” (HC) que afectaron el 5, 25, 50, 75, y 95% de los taxones o de las especies. El comando “ssd_hc” también extrapoló de las curvas de los extremos inferior y superior, los límites inferior y superior de cada HC, respectivamente. El comando “ggsave” del paquete “ggplot2” guardó los gráficos generados con la extensión “jpg” y una resolución de 300 dpi.

La tercera rutina en lenguaje R validó los nombres científicos de las especies y taxones; utilizando los comandos “tnrs()”, “gnr_resolve()” y “get_tsn” del paquete Taxise (Chamberlain y Szöcs, 2013). Todas las rutinas para lenguaje R incluyeron el comando “read_ods” del paquete ReadODS (Schutten *et al.*, 2016) para poder leer la planilla de cálculo generada con el programa Libre Office.

Capítulo 2

Resultados

1.1 Sensibilidad de los taxones

La familia Unionidae (orden Unionoida), con puntaje seis, resultó afectada a una concentración menor que HC_5 (Figura 2-1). HC_5 fue la concentración que afectó el 5% de los taxones, y su valor fue 0,03 mg/L con 0,01 y 0,13 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1). La familia Baetidae (orden Ephemeroptera), con puntaje cuatro, y la subclase Oligochaeta (clase Clitellata), con puntaje uno, resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_5 , pero menores que HC_{25} (Figura 2-1). HC_{25} fue la concentración que afectó el 25% de los taxones, y su valor fue 0,14 mg/L con 0,05 y 0,38 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1). Las familias Physidae (orden Basommatophora), Planorbidae (orden Basommatophora) y Lymnaeidae (orden Basommatophora), todas con puntaje tres, resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{25} , pero menores que HC_{50} (Figura 2-1). HC_{50} fue la concentración que afectó el 50% de los taxones, y su valor fue 0,4 mg/L con 0,16 y 1,03 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1).

Las familias Ephemerellidae (orden Ephemeroptera), con puntaje diez, Gammaridae (orden Amphipoda), con puntaje seis, y Chironomidae (orden Diptera), con puntaje dos, resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{50} , pero menores que HC_{75} (Figura 2-1). HC_{75} fue la concentración que afectó el 75% de los taxones, y su valor fue 1,25 mg/L con 0,41 y 3,44 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1). Las familias Asellidae (orden Isópodos), con puntaje tres, y Planariidae (orden Tricladida), con puntaje cinco, resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{75} , pero menores que HC_{95} (Figura 2-1). HC_{95} fue la concentración que afectó el 95% de los taxones, y su valor fue 8,43 mg/L con 1,36 y 61,4 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1).

La familia Perlidae (orden Plecoptera) con puntaje diez resultó afectada a una concentración mayor que HC_{95} (Figura 2-1). Los menores puntajes corresponden a los taxones tolerantes a la eutrofización. Cada punto es la media geométrica de los valores de las LC_{50} s descargadas para las especies que forman el taxón del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020) en el eje x; y su respectivo percentil de afectación con respecto al total de taxones considerados, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de $CuSO_4$, resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas. Entre paréntesis, límites superior e inferior de las HC. Los valores de HC y sus límites fueron extrapolados de la curva promedio y de las curvas extremas de las 10.000 curvas ajustadas.

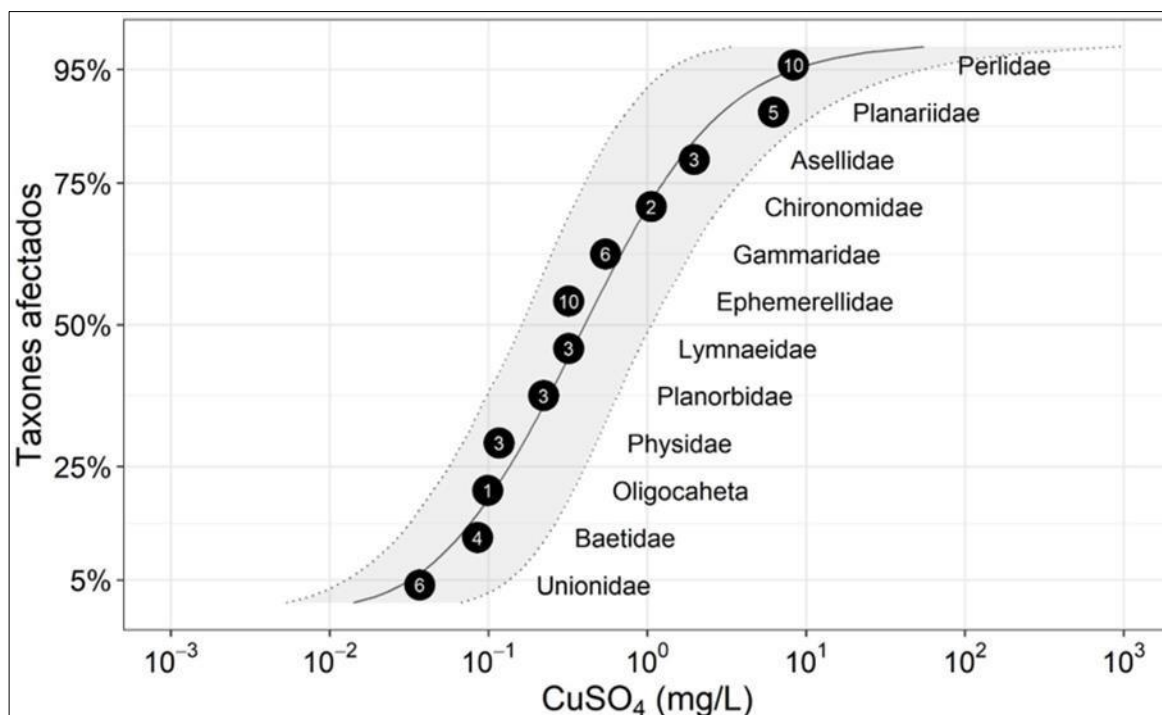


Figura 2-1. Curva de distribución de sensibilidad al sulfato de cobre ($CuSO_4$) de taxones del método BMWP con sus respectivos puntajes.

Tabla 2-1. Concentraciones peligrosas (HC) que afectan al 5, 25, 50, 75 y 95 % de los taxones o familias.

HC	Taxones	Especies
5	0,03 (0,01-0,13)	0,03 (0,02-0,05)
25	0,14 (0,05-0,38)	0,09 (0,05-0,16)
50	0,40 (0,16-1,03)	0,26 (0,15-0,46)
75	1,25 (0,41-3,44)	0,91 (0,41-1,98)
95	8,43 (1,36-61,4)	9,92 (2,54-34,0)

1.2 Sensibilidad de las especies

Las especies *Lampsilis siliquoidea* (orden Unionoida, familia Unionidae) y *Villosa vibex* (orden Unionoida, familia Unionidae) con puntaje seis, resultaron afectadas a concentraciones menores que HC₅ (Figura 2-2), la cual fue 0,03 mg/L, con 0,02 y 0,05 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1). La HC₂₅ fue 0,09 mg/L, con 0,05 y 0,16 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1). Las siguientes especies resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC₅, pero menores o iguales que HC₂₅: *Lampsilis teres* (orden Unionoida, familia Unionidae), *Actinonaias ligamentina* (orden Unionoida, familia Unionidae) y *Pyganodon grandis* (orden Unionoida, familia Unionidae), todas con puntaje seis; *Biomphalaria glabrata* (orden Unionoida, familia Unionidae) y *Physella gyrina* (orden Basommatophora, familia Physidae) con puntaje tres; y *Lampsilis straminea* (orden Unionoida, familia Unionidae) y *Epioblasma capsaeformis* (orden Unionoida, familia Unionidae), ambas especies con puntaje seis (Figura 2-2). La HC₅₀ fue 0,26 mg/L, con 0,15 y 0,46 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1).

Las siguientes especies resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC₂₅, pero menores que HC₅₀: *Tubifex tubifex* (orden Haplotaxida, familia Tubificidae) con puntaje uno; *Cloeon dipterum* (orden Ephemeroptera, familia Baetidae) con puntaje cuatro; *Radix natalensis* (clase Gastropoda, familia Lymnaeidae) y *Lymnaea acuminata* (orden Basommatophora, familia Lymnaeidae), ambas con puntaje tres; *Chironomus plumosus* (orden Diptera, familia Chironomidae) con puntaje dos; *Anodonta imbecillis* (orden Unionoida, familia Unionidae) con puntaje seis; *Echinogammarus meridionalis* (orden Amphipoda, familia Gammaridae) con puntaje seis; y *Physella acuta* (orden Basommatophora, familia Physidae) con puntaje tres (Figura 2-2).

La HC₇₅ fue 0,91 mg/L, con 0,41 y 1,98 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1). Las siguientes especies resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC₅₀, pero menores o iguales que HC₇₅: *Ephemerella subvaria* (orden Ephemeroptera, familia Ephemerellidae) con puntaje diez;

Branchiura sowerbyi (orden Haplotaxida, familia Tubificidae) con puntaje uno; *Chironomus tentans* (orden Diptera, familia Chironomidae) con puntaje dos; *Isidorella newcombi* (orden Basommatophora, familia Planorbidae), *Planorbis planorbis* (orden Basommatophora, familia Planorbidae) y *Biomphalaria alexandrina* (orden Basommatophora, familia Planorbidae) con puntaje tres; *Chironomus decorus* (orden Diptera, familia Chironomidae) con puntaje dos; *Radix luteola* (orden Basommatophora, familia Lymnaeidae) y *Lymnaea emarginata* (orden Basommatophora, familia Lymnaeidae) con puntaje tres (Figura 2-2). La HC_{95} fue 9,92 mg/L, con 2,54 y 34,0 mg/L como límites inferior y superior, respectivamente (Tabla 2-1).

Las siguientes especies resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{75} , pero menores que HC_{95} : *Asellus meridianus* (orden Isópodos, familia Asellidae) con puntaje tres; *Gammarus lacustris* (orden Amphipoda, familia Gammaridae) con puntaje seis; *Polypedilum nubifer* (orden Diptera, familia Chironomidae) con puntaje dos; *Helisoma duryi* (orden Basommatophora, familia Planorbidae) con puntaje tres; *Dugesia schubarti* (orden Tricladida, familia Planariidae) con puntaje cinco; *Acroneuria lycorias* (orden Tricladida, familia Planariidae) con puntaje diez (Figura 2-2A). Dos especies resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{95} : *Chironomus luridus* (orden Diptera, familia Chironomidae) con puntaje dos, y *Asellus aquaticus* (orden Isópoda, familia Asellidae) con puntaje tres (Figura 2-2B).

Los menores puntajes corresponden a los taxones tolerantes a la eutrofización. Cada punto representa la media geométrica de los valores de las LC_{50} s para cada especie, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y el respectivo percentil de afectación en el eje y, calculado con respecto al total de especies considerados en el trabajo. A. El 50% de las especies afectadas a las menores concentraciones, B. El 50% de las especies afectadas a las mayores concentraciones. La línea continua representa el promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas.

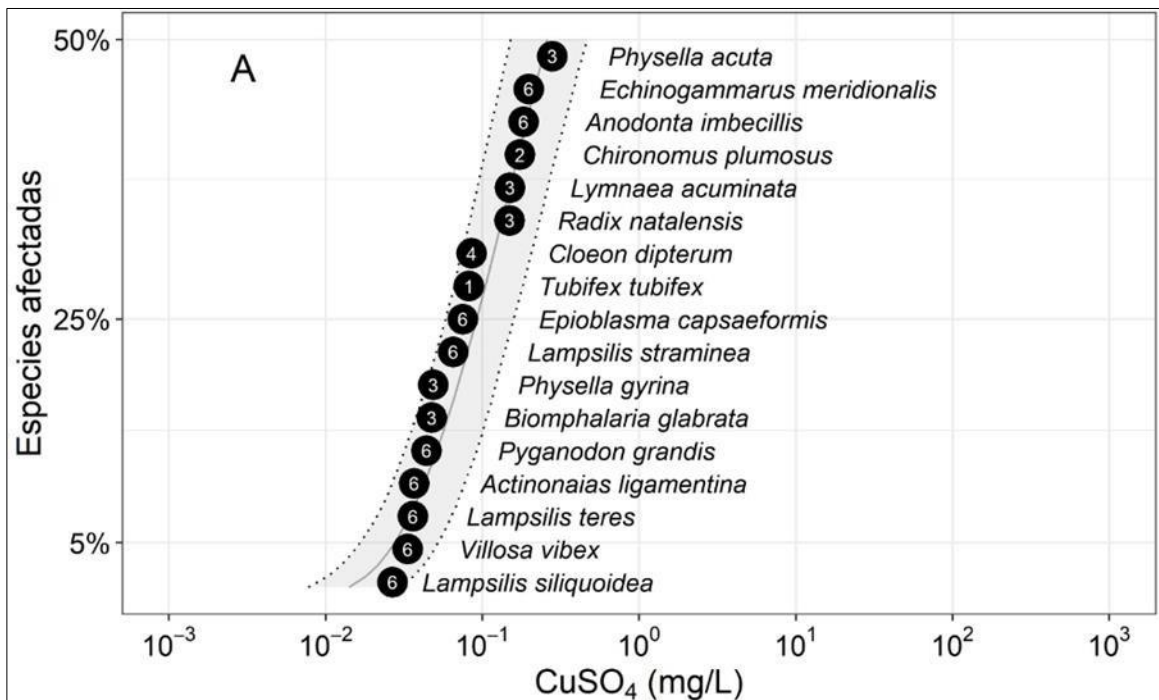
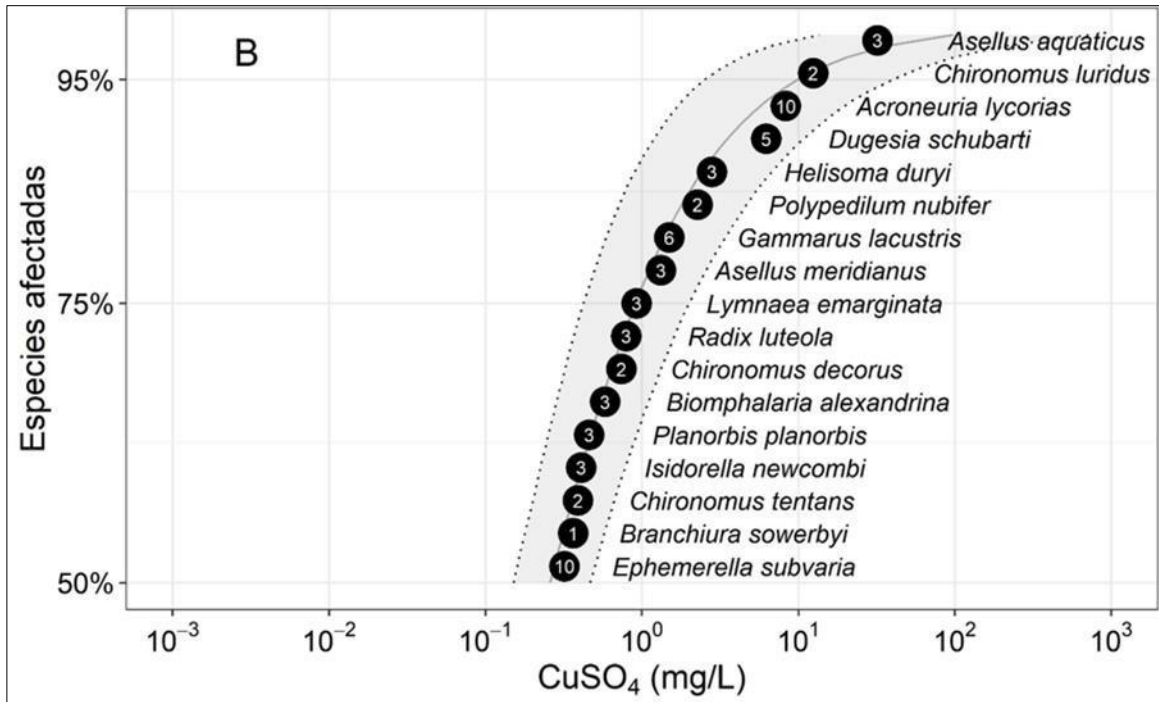


Figura 2-2. Curva de distribución de sensibilidad al CuSO₄ de las especies de los taxones del método BMWP con sus respectivos puntajes

1.3 Sensibilidad de las especies dentro de un mismo taxón

Dos especies representaron a la familia Asellidae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{75} . La especie *Asellus meridianus* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{75} , pero menor que HC_{95} . La especie *Asellus aquaticus* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{95} . Solo una especie representó a la familia Baetidae. La especie *Cloeon dipterum* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{25} , pero menor que HC_{50} (Figura 2-3).

Cinco especies representaron a la familia Chironomidae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{25} , pero menores que HC_{75} . La especie *Chironomus plumosus* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{25} , pero menor que HC_{50} . Las especies *Chironomus tentans* y *Chironomus decorus* resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{50} , pero menores que HC_{75} . La especie *Polypedium nubifer* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{75} , pero menor que HC_{95} . La especie *Chironomus luridus* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{95} . Solo una especie representó a la familia Ephemerellidae. La especie *Ephemerella subvaria* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{50} , pero menor que HC_{75} (Figura 2-4).

Dos especies representaron a la familia Gammaridae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{25} , pero menores que HC_{95} . La especie *Echinogammarus meridionalis* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{25} , pero menor que HC_{50} . La especie *Gammarus lacustris* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{75} , pero menor que HC_{95} . Cuatro especies representaron a la familia Lymnaeidae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{25} , pero iguales a HC_{75} . Las especies *Radix natalensis* y *Lymnaea acuminata* resultaron afectadas a concentraciones mayores que LC_{25} , pero menores que HC_{50} . La especie *Radix luteola* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{50} , pero menor que HC_{75} . La especie *Lymnaea emarginata* resultó afectada a una concentración igual a HC_{75} (Figura 2-5).

Cada punto describe las medias geométricas de los valores de las LC_{50} s de las especies, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y sus respectivos percentiles de afectación calculados sobre el total de las especies consideradas en el presente trabajo, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de $CuSO_4$, resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas.

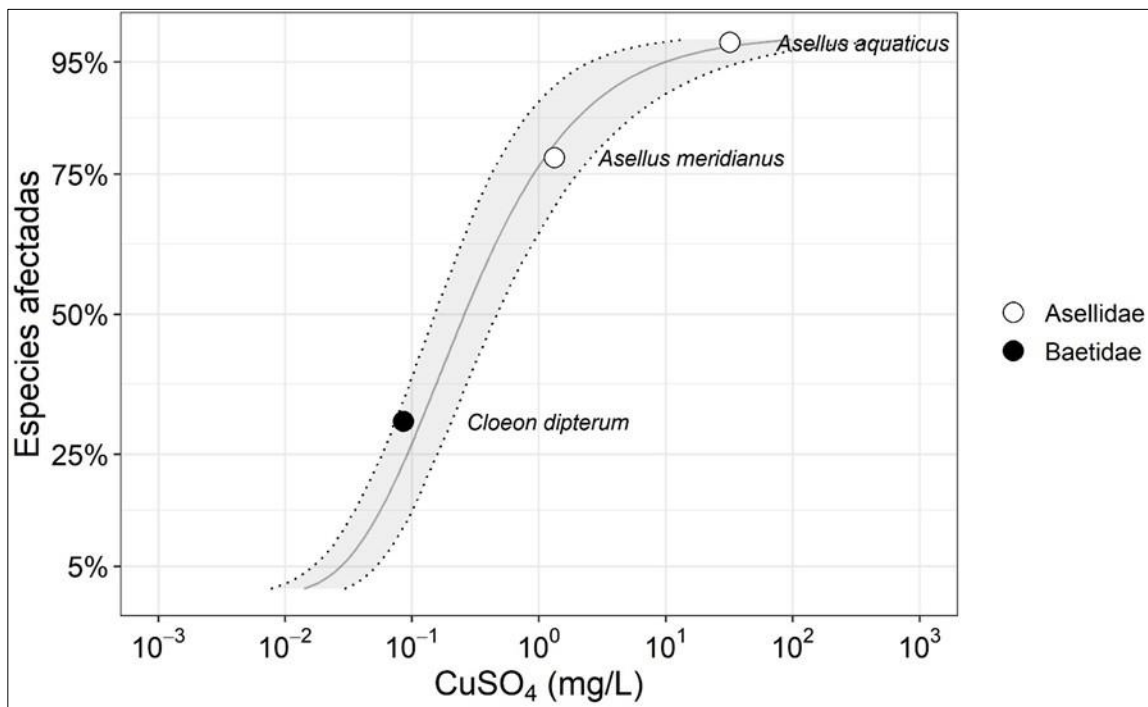


Figura 2-3. Curva de distribución de sensibilidad al $CuSO_4$ de las especies de los taxones Asellidae (blanco), y Baetidae (negro).

Cada punto describe las medias geométricas de los valores de las LC_{50} s de las especies, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y sus respectivos percentiles de afectación calculados sobre el total de las especies consideradas en el presente trabajo, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de $CuSO_4$, resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas.

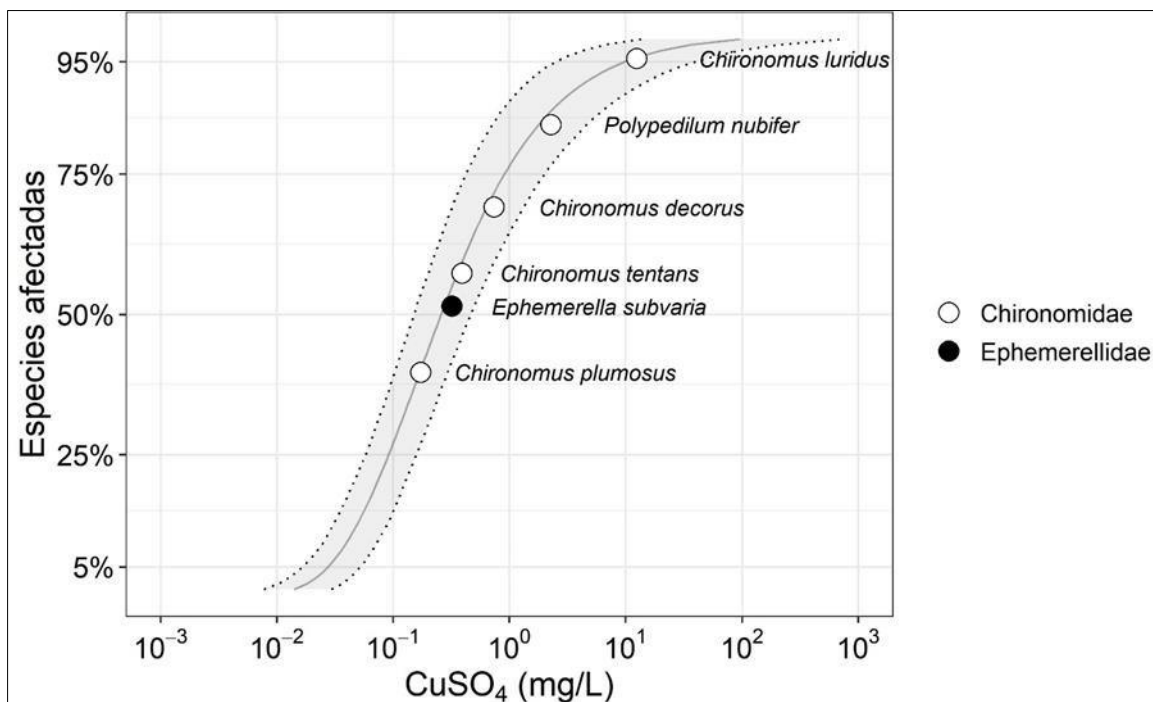


Figura 2-4. Curva de distribución de sensibilidad al CuSO_4 de las especies de los taxones Chironomidae (blanco), y Ephemerellidae (negro).

Cada punto describe las medias geométricas de los valores de las LC_{50} s de las especies, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y sus respectivos percentiles de afectación calculados sobre el total de las especies consideradas en el presente trabajo, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de CuSO_4 , resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas.

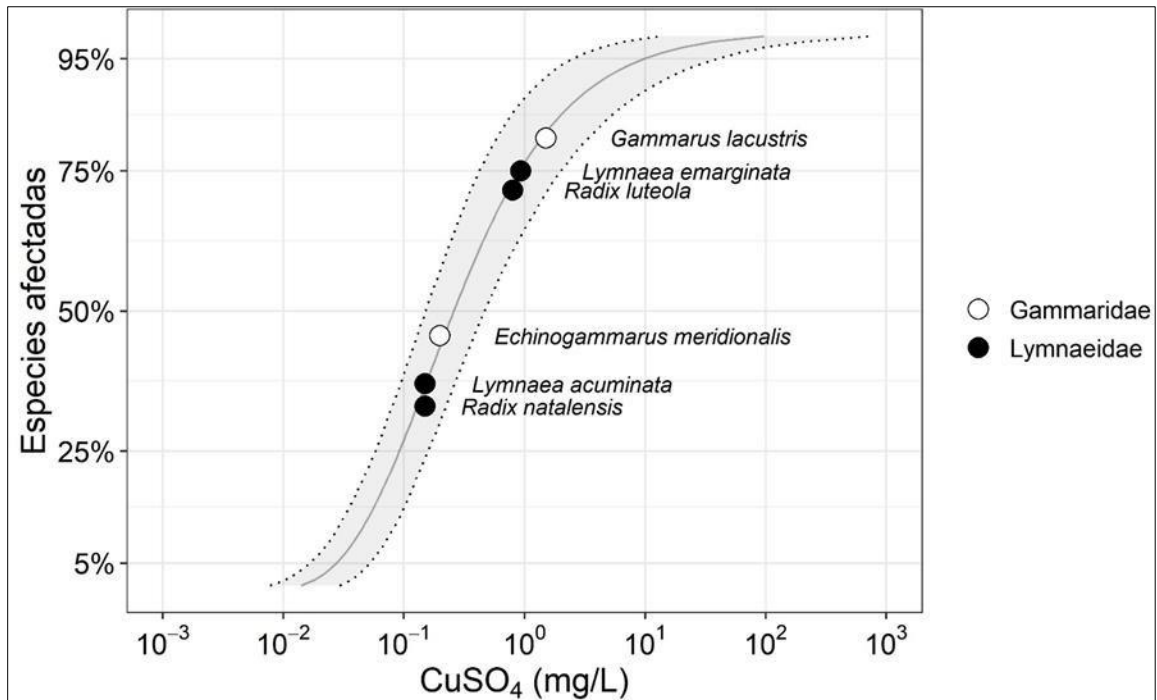


Figura 2-5. Curva de distribución de sensibilidad al CuSO_4 de las especies de los taxones Gammaridae (blanco), y Lymnaeidae (negro).

Solo una especie representó a la familia Perlidae. La especie *Acroneuria lycorias* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{75} , pero menor que HC_{95} . Dos especies representaron a la familia Physidae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_5 , pero menores que HC_{50} . La especie *Physella gyrina* resultó afectada a una concentración mayor que HC_5 , pero menor que HC_{25} . La especie *Physella acuta* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{25} , pero menor que HC_{50} (Figura 2-6).

Solo una especie representó a la familia Planariidae. La especie *Dugesia schubarti* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{75} , pero menor que HC_{95} . Cinco especies representaron a la familia Planorbidae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_5 , pero menores que HC_{95} . La especie *Biomphalaria glabrata* resultó afectada a una concentración mayor que HC_5 , pero menor que HC_{25} . Las especies *Isidorella newcombi*, *Planorbis planorbis* y *Biomphalaria alexandrina* resultaron afectadas a concentraciones menores que HC_{50} , pero menores que HC_{75} . La especie *Helisoma duryi* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{75} , pero menor que HC_{95} (Figura 2-7).

Dos especies representaron a la subclase Oligochaeta, las cuales resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_{25} , pero menores que HC_{50} . La especie *Tubifex tubifex* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{25} , pero menor que HC_{50} . La especie *Branchiura sowerbyi* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{50} , pero menor que HC_{75} . Ocho especies representaron a la familia Unionidae, las cuales resultaron afectadas a concentraciones menores que HC_{50} . Las especies *Lampsilis siliquoidea* y *Villosa vibex* resultaron afectadas a concentraciones menores que HC_5 . Las especies *Lampsilis teres*, *Actinonaias ligamentina*, *Pyganodon grandis* y *Lampsilis straminea* resultaron afectadas a concentraciones mayores que HC_5 , pero menores que HC_{25} . La especie *Epioblasma capsaeformis* resultó afectada a una concentración igual a HC_{25} . La especie *Anodonta imbecillis* resultó afectada a una concentración mayor que HC_{25} , pero menor que HC_{50} (Figura 2-8).

Cada punto describe las medias geométricas de los valores de las LC_{50} s de las especies, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y sus respectivos percentiles de afectación calculados sobre el total de las especies consideradas en el presente trabajo, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de $CuSO_4$, resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas.

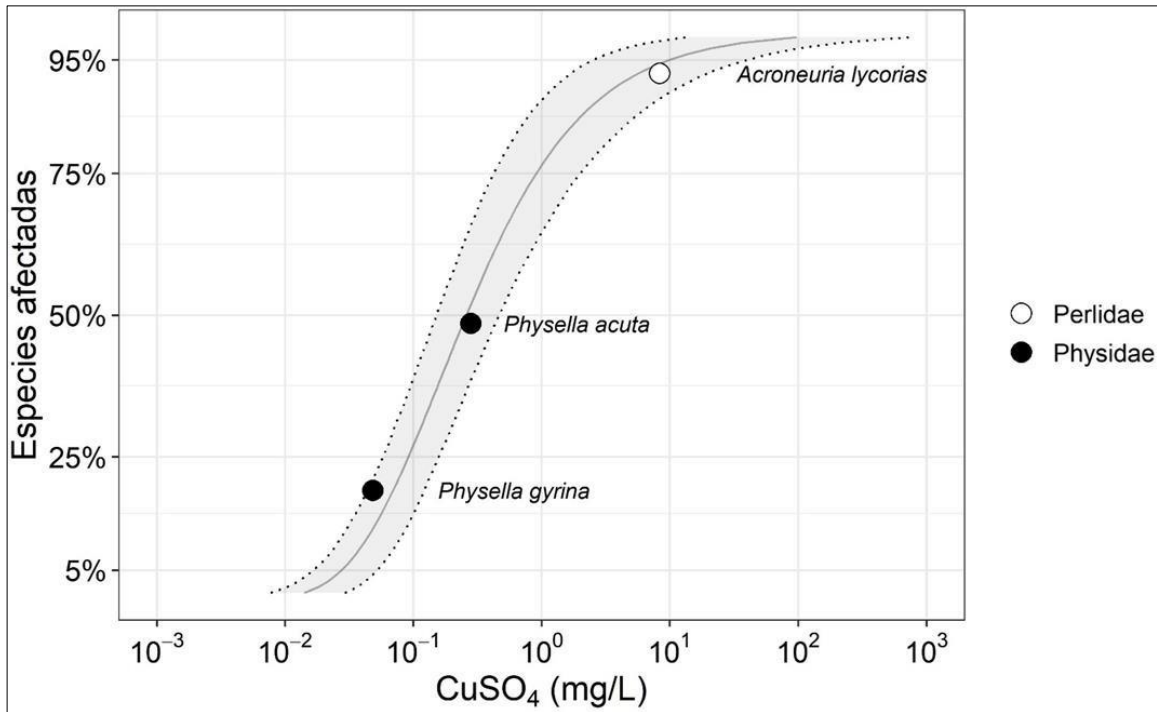


Figura 2-6. Curva de distribución de sensibilidad al CuSO_4 de las especies de los taxones Perlidae (blanco), y Physidae (negro).

Cada punto describe las medias geométricas de los valores de las LC_{50} s de las especies, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y sus respectivos percentiles de afectación calculados sobre el total de las especies consideradas en el presente trabajo, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de CuSO_4 , resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas puntuadas.

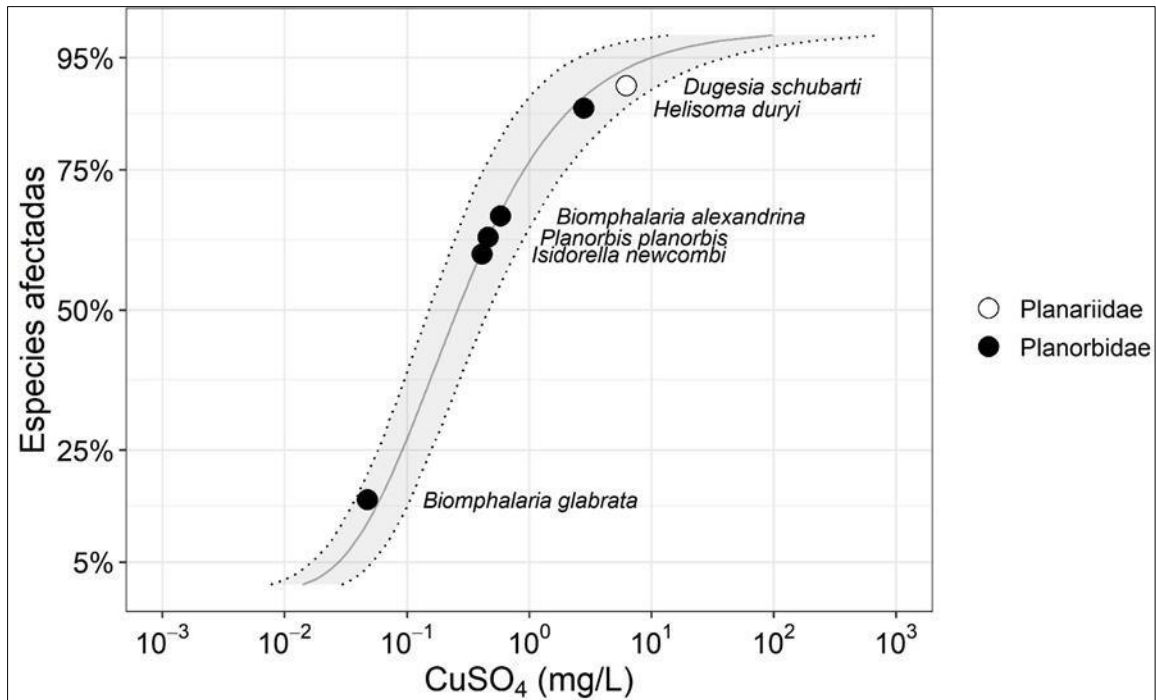


Figura 2-7. Curva de distribución de sensibilidad al CuSO_4 de las especies de los taxones Planariidae (blanco), y Planorbidae (negro).

Cada punto describe las medias geométricas de los valores de las LC_{50} s de las especies, descargados del banco Ecotox (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2020), en el eje x; y sus respectivos percentiles de afectación calculados sobre el total de las especies consideradas en el presente trabajo, en el eje y. La línea continua representa el porcentaje de especies afectadas a crecientes concentraciones de CuSO_4 , resulta del promedio del total de 10.000 curvas ajustadas a los puntos, las cuales están representadas por el intervalo sombreado. Las curvas de los extremos están representadas por las líneas punteadas.

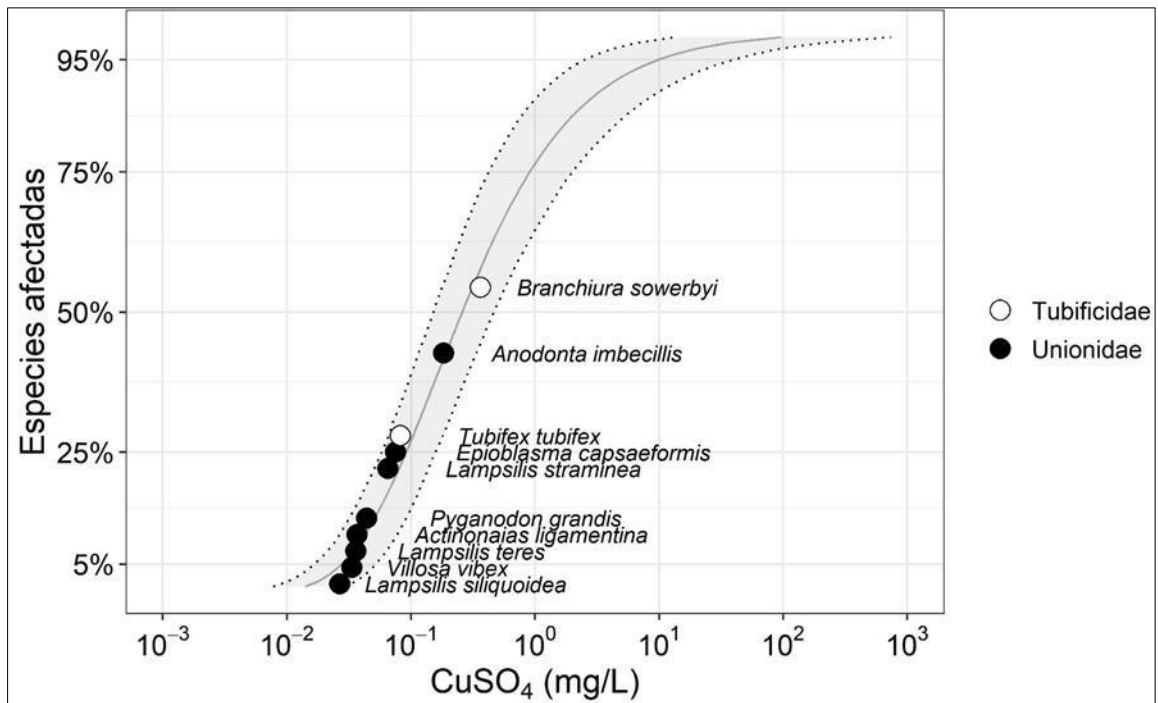


Figura 2-8. Curva de distribución de sensibilidad al CuSO_4 de las especies de los taxones Tubificidae (blanco), y Unionidae (negro).

Capítulo 3

Discusión

La selección de los datos descargados de Ecotox resultó en LC₅₀s determinados en 34 especies de 12 taxones con puntaje BMWP, los cuales cubrieron siete, de los nueve puntajes posibles en el método (Paisley *et al.*, 2014). Cuatro puntajes presentaron un solo taxón: uno (subclase Oligochaeta), dos (familia Chironomidae), cuatro (familia Baetidae), cinco (familia Planariidae). Los puntajes cuatro y uno resultaron afectados a una concentración menor que HC₂₅, mientras los puntajes dos y cinco resultaron afectados a una concentración mayor que HC₅₀. Más aun, el puntaje cinco resultó afectado a una concentración mayor que HC₇₅ (Figura 2-1). Esto indica que no existió una relación entre estos puntajes y la sensibilidad al cobre. Tres puntajes presentaron más de un taxón: tres (familias Physidae, Planorbidae, Lymnaeidae y Asellidae), seis (familias Unionidae y Gammaridae) y diez (familias Perlidae y Ephemerellidae). Estos tres puntajes, además de no presentarse una relación con la sensibilidad al cobre, las familias que los componen resultaron afectadas a diferentes concentraciones (Figura 2-1). Esto aún sugiere que las características que definen el puntaje de un taxón, son diferentes de las características que definen la sensibilidad al cobre.

Comber *et al.* (2008) investigaron la relación entre la concentración de cobre y zinc en el agua y los taxones de macroinvertebrados considerados por el método BMWP. Estos

autores encontraron zonas con alta concentración de cobre y zinc y con taxones con altos puntajes BMWP. Estos autores concluyeron que la tolerancia a los metales evolucionó en los taxones con altos puntajes BMWP. Los individuos de estos taxones habitaban zonas sin materia orgánica que los protegiese de los metales, acomplejando los iones de los mismos (Adams *et al.*, 2020). Bajo estas condiciones, las concentraciones de cobre y zinc posiblemente actuaron como agentes selectivos sobre los individuos de los taxones que viven en estas zonas. Sin embargo, la selección de los individuos tolerantes pudo no haber ocurrido en todos los taxones con alto puntaje BMWP. Esto explicaría porque, en el presente trabajo, uno de los taxones de puntaje diez fue el más tolerante al cobre; pero el segundo taxón fue afectado a una concentración poco mayor que HC_{50} Figura 2-1.

En hábitats oligotróficos, la ausencia de la protección de la materia orgánica puede ser la causa de la selección; pero no asegura la presencia de individuos tolerantes que puedan ser seleccionados en todas las especies que forman un taxón. En el presente trabajo, las especies con un mismo puntaje BMWP resultaron estar presentes a lo largo de toda la curva de distribución de sensibilidad, o por lo menos, a lo largo de una de sus mitades (Figura 2-2 A y B).

Bossuyt y Janssen (2005) recolectaron individuos de varias especies de cladóceros en zonas con altas y bajas concentraciones de cobre. Las especies recolectadas fueron cultivadas en el laboratorio y luego expuestas al cobre. Las especies más tolerantes fueron aquellas de mayor tamaño entre las recolectadas en las zonas con mayor concentración de cobre. Un mayor tamaño puede determinar una menor dosis. Así podemos explicar porque solo las poblaciones de algunas especies y no todas, pudieron volverse tolerantes en los hábitats oligotróficos.

En el presente trabajo, la presión selectiva de los metales podría explicar la heterogeneidad de los puntajes de las especies en la parte superior de la curva SSD (Figura 2-2 B); la cual contrasta con la mayor homogeneidad en los puntajes de las especies en la parte inferior o más sensible de la curva. Chapman *et al.* (1982) trabajando con especies de *Oligochaeta*, determinaron mayores LC_{50} s para metales en especies de hábitats oligotróficos en comparación con los determinados en especies de hábitats eutróficos.

Esto fue explicado por la ausencia de materia orgánica en los hábitats oligotróficos (Rodríguez y Reynoldson, 2011). Sin embargo, las LC_{50} s de las especies de hábitats eutróficos fueron muy homogéneos, mientras que las LC_{50} de las especies de hábitats oligotróficos que fueron altamente variables (Chapman *et al.*, 1982). Esto parece indicar que los individuos tolerantes son seleccionados en los hábitats oligotróficos, pero no todos los seleccionados presentan el mismo nivel de tolerancia.

Los resultados de Bossuyt *et al.* (2005) permiten tratar de explicar la relativa homogeneidad en las respuestas de las especies sensibles al cobre. Estos autores también recolectaron individuos de varias especies de cladóceros de zonas con diferentes concentraciones de metales. Sin embargo, en esta oportunidad, midieron la materia orgánica presente en el agua. Nuevamente, cultivaron los individuos colectados en el laboratorio y los expusieron al cobre. Los individuos colectados en las zonas con mayor cantidad de materia orgánica fueron los más sensibles y no hubo diferencias entre las especies. Esto parece mostrar que la presencia de materia orgánica impidió la selección de individuos tolerantes, lo cual no modificó la respuesta sensible al cobre de las poblaciones de las especies de zonas eutrofizadas.

En el presente trabajo, las especies de la familia Unionidae también mostraron una relativa homogeneidad en su sensibilidad al cobre, porque todas ellas resultaron afectadas a concentraciones menores que HC_{50} Figura 2-8. Estas especies son bivalvos que filtran materia orgánica para alimentarse, pero un exceso de esta puede “colmatarse” sus aparatos filtradores (Bazzanti *et al.*, 2012). Esto es coherente con su puntaje intermedio que les asigna el método BMWP (Paisley *et al.*, 2014). Su sensibilidad al cobre se puede explicar porque la materia orgánica que toleran sin “colmatarse” es suficiente para protegerlos de los metales. Pequeñas cantidades de materia orgánica han aumentado los valores de LC_{50} de bivalvos, aún los estadios más sensibles de su ciclo de vida (Gillis *et al.*, 2010). La relativa homogeneidad en la sensibilidad también puede ser explicada por la materia orgánica que evitó la presión selectiva de los metales sobre los individuos de las poblaciones.

No podemos descartar que la resistencia a los metales haya sido seleccionada en un ancestro común y heredada por las especies relacionadas. Este parece ser el caso de las especies que forman la familia Chironomidae, en las cuales la tolerancia al zinc tuvo correlato en las relaciones filogenéticas entre las especies (Carew *et al.*, 2011). En concordancia con esto, las especies de la familia Chironomidae del presente trabajo resultaron mayormente tolerantes al cobre a pesar de su bajo puntaje BMWP (Figura 2-4).

Ewell *et al.* (1986) analizaron la sensibilidad al cobre de varias especies de macroinvertebrados en condiciones comparables, algunos de estos macroinvertebrados pertenecen de los mismos géneros que las especies analizadas en el presente trabajo *Asellus intermedius* fue la especie más tolerante en Ewell *et al.* (1986), mientras que *Asellus aquaticus* lo fue para el presente trabajo, en el cual otra especie del mismo género *Asellus meridianus* resultó afectada a una concentración mayor que HC₇₅ (Figura 2-2 B). Además, una especie del género *Dugesia* resultó más tolerante que las especies de los géneros *Gammarus* y *Helisoma* (Ewell *et al.*, 1986) en forma similar a lo que se pudo registrar en el presente trabajo (Figura 2-2 B). Esto sugiere la relación entre la filogenia y la sensibilidad al cobre puede estar muy extendida.

Conclusiones

Familias y especies con el mismo puntaje BMWP presentaron diferente sensibilidad al cobre, indicando de esta manera, la falta de relación entre el puntaje BMWP y la sensibilidad al cobre.

Especies de una misma familia presentaron diferente sensibilidad al cobre, la excepción fue representada por las familias Chironomidae y en mayor representación por la familia Unionidae. En las especies de estas familias puede llegar a existir una relación entre la filogenia y la sensibilidad al cobre. La evaluación de esta hipótesis dependería de la disponibilidad de información genética comparable para las especies de estas familias.

Los bioensayos realizados con especies estándares, pueden traer precisión a los “endpoints” determinados en ellos. Sin embargo, es necesario un número mayor de especies en los bioensayos, para describir el gradiente de sensibilidades a las sustancias tóxicas que puede existir en la naturaleza.

Respecto al BMWP, no se encontraron muchas especies sensibles (especies de hábitats oligotróficos). Y respecto a los organismos de hábitats eutróficos fue difícil su clasificación, ya que la subclase Oligochaeta, es clasificada según el BMWP como organismos de hábitats eutróficos y los resultados indicaron que esta subclase también fue encontrada en hábitats oligotróficos.

Es importante en futuros trabajos incluir la historia de vida de los organismos, y la preferencia de estos a diferentes hábitats (lóticos o lénticos), para así encontrar la influencia del hábitat en la sensibilidad de los organismos al cobre).

Bibliografía

Adams, W., Blust, R., Dwyer, R., Mount, D., Nordheim, E., Rodriguez, P. H., & Spry, D. (2020). Bioavailability Assessment of Metals in Freshwater Environments: A Historical Review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(1), 48–59. <https://doi.org/10.1002/etc.4558>

Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). (2008). Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment. Retrieved from https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r10_en.pdf/bb902be7-a503-4ab7-9036-d866b8ddce69

Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA). (2017). Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.7a: Endpoint specific guidance (ECHA-17-G-18-EN). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2823/337352>

Bazzanti, Marcello, Mastrantuono, L., & Pilotto, F. (2017). Depth-related response of macroinvertebrates to the reversal of eutrophication in a Mediterranean lake: Implications for ecological assessment. *Science of the Total Environment*, 579, 456–465. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.073>

Bazzanti, Marcelo, Mastrantuono, L., & Solimini, A. G. (2012). Selecting macroinvertebrate taxa and metrics to assess eutrophication in different depth zones of Mediterranean lakes. *Fundam. Appl. Limnol*, 180/2, 133–143. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2012/0200>

Bossuyt, B. T. A., & Janssen, C. R. (2005). Copper toxicity to different field-collected cladoceran species: intra- and inter-species sensitivity. *Environmental Pollution*, 136(1), 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.11.023>

Bossuyt, B. T. A., Muysen, B. T. A., & Janssen, C. R. (2005). Relevance of generic and site-specific species sensitivity distributions in the current risk assessment procedures for copper and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(2), 470. <https://doi.org/10.1897/03-067r.1>

Carew, M. E., Miller, A. D., & Hoffmann, A. A. (2011). Phylogenetic signals and ecotoxicological responses: potential implications for aquatic biomonitoring. *Ecotoxicology*, 20(3), 595–606. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0615-3>

Chamberlain, S. A., & Szöcs, E. (2013). taxize: taxonomic search and retrieval in R. *F1000Research*, 2, 2. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-191.v2>

Chapman, P. M., Farrell, M. A., & Brinkhurst, R. O. (1982). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 47–67. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X\(82\)90005-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(82)90005-4)

Comber, S. D. W., Merrington, G., Sturdy, L., Delbeke, K., & van Assche, F. (2008). Copper and zinc water quality standards under the EU Water Framework Directive: The use of a tiered approach to estimate the levels of failure. *Science of The Total Environment*, 403(1-3), 12–22., 403(1–3), 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.017>

Environmental Protection Agency (EPA). (2005). Washington, DC, EPA/600/X-05/027.
Ewell, W. S., Gorsuch, J. W., Kringle, R. O., Robillard, K. A., & Spiegel, R. C. (1986). Simultaneous evaluation of the acute effects of chemicals on seven aquatic species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5(9), 831–840. <https://doi.org/10.1002/etc.5620050908>

Gillis, P. L., McGeer, J. C., Mackie, G. L., Wilkie, M. P., & Ackerman, J. D. (2010). The effect of natural dissolved organic carbon on the acute toxicity of copper to larval

- freshwater mussels (glochidia). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(11), 2519–2528. <https://doi.org/10.1002/etc.299>
- Kooijman, S. A. L. M. (1987). A safety factor for LC50 values allowing for differences in sensitivity among species. *Water Research*, 21(3), 269–276. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90205-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90205-3)
- Metcalf-Smith, J (1994). Biological water-quality assessment of rivers: use of macroinvertebrate communities. *The Rivers Handbook: Hydrological and Ecological Principles*, 144–170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444313871.ch8>
- Paisley, M. ., Trigg, D. ., & Walley, W (2014).). Revision of the biological monitoring working party (BMWP) score system: derivation of present-only and abundance- related scores from field data. *River Res. Applic*, 30(7), 887–904. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1002/rra.2686>
- Posthuma, L., Suter, G. W., & Traas, T. P. (2001). *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Boca Raton: CRC press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781420032314>
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLOS ONE*, 10(12), e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rodriguez, P., & Reynoldson, T. B. (2011). Appendices. In *The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes* (pp. 225–261). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1718-3_7
- Rogevich, E. C., Hoang, T. C., & Rand, G. M. (2008). The Effects of Water Quality and Age on the Acute Toxicity of Copper to the Florida Apple Snail, *Pomacea paludosa*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), 690–696. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9106-1>
- Ryan, A. C., Tomasso, J. R., & Klaine, S. J. (2009). Influence of pH, hardness, dissolved

organic carbon concentration, and dissolved organic matter source on the acute toxicity of copper to *Daphnia magna* in soft waters: implications for the biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(8), 1663. <https://doi.org/10.1897/08-361.1>

Schutten, G., Hong, C. C., & Leeper, T. (2016). ReadODS: read and write ODS files. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=readODS>

Technical Guidance for Deriving Environmental Quality Standards (TGD). (2011). *Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC)*. <https://doi.org/10.2779/43816>

Thorley, J., & Schwarz, C. (2018). ssdtools: An R package to fit Species Sensitivity Distributions. *Journal of Open Source Software*, 3(31), 1082. <https://doi.org/10.21105/joss.01082>

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2020). ecotox knowledgebase. Retrieved from <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T., Takahashi, K., Wilke, C., & Woo, K. (2018). Ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. Retrieved from <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/>

Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2018). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package versión 0.7.6. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=dplyr>