

Estudio preliminar de ecotoxicidad y contaminación no puntual por nitrógeno y fósforo en cursos de agua superficial cercanos a feedlots

Preliminary study of Ecotoxicity and non-point source pollution by nitrogen and phosphorus in watercourses in the vicinity of feedlots

Estudo preliminar de Ecotoxicidade e poluição de origem não pontual por nitrogênio e fósforo em cursos de água nas imediações de feedlots

RECIBIDO: 7/4/2019 → APROBADO: 18/6/2019 ✉ dmiguez@latitud.org.uy

✉ MÍGUEZ, DIANA (1); BARUCH, DANIEL (2); SUÁREZ, GONZALO (2).

(1) LATITUD – FUNDACIÓN LATU, LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY (LATU), MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) FACULTAD DE VETERINARIA, ÁREA FARMACOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Los feedlots son establecimientos agropecuarios con un sistema intensivo de producción de carne que permite obtener en un menor tiempo la terminación de animales bovinos. Su sistema se basa en el encierro de los animales en corrales y en el aporte de alimentos balanceados en base a concentrados. El objetivo de este trabajo es caracterizar los cursos de agua ubicados en declive con respecto a las áreas donde se localizan los corrales de engorde, evaluando las concentraciones de nutrientes y los aportes de sólidos por medio de análisis fisicoquímicos, y analizando su ecotoxicidad a través de modelos de bioensayos. Para ello, se tomaron muestras de dos establecimientos en tres puntos diferentes de cada curso de agua: aguas arriba, próximo a los corrales de los feedlots, y aguas abajo de éstos. Este estudio no detectó niveles apreciables de toxicidad aguda para *Daphnia magna*. Sin embargo, se observaron niveles ligeramente tóxicos en ambos cursos de agua para *Vibrio fischeri* y para *Lactuca sativa* consistentes con efectos de bioestimulación. En los estudios fisicoquímicos se encontró que en ambos cursos de agua los niveles totales de fósforo excedieron los valores establecidos en el Decreto

253/79 (Uruguay, 1979), los cuales, si bien estaban presentes incluso aguas arriba, aumentaban aún más hacia abajo de los corrales.

PALABRAS CLAVE: Agua superficial, ecotoxicología, impacto ambiental, fósforo, eutrofización.

ABSTRACT

Feedlots are plots located in establishments on which bovine cattle is fattened for market by means of the use of concentrated foods. The objective of this work was to characterize watercourses located in decline with respect to the areas where fattening pens are located in terms of nutrient concentrations and of the inputs of solids, through physicochemical analyses, and with regard to ecotoxicity through models of bioassays. To do so, samples were taken from two establishments at three different points of each watercourse: upstream, in front of, and downstream the feedlots. This study did not detect appreciable levels of acute toxicity to *Daphnia magna* but mild levels of toxicity in both watercourses to *Vibrio fischeri* and *Lactuca sativa* consisting on biostimulatory effects. Through physicochemical studies, it was found that in both watercourses the total phosphorus levels exceeded the established values in Decree 253/79, which were present even upstream, but further increasing downstream to the corrals.

KEYWORDS: surface water, ecotoxicology, environmental impact, phosphorus, eutrophication.

RESUMO

Os confinamentos ou “feedlot” são estabelecimentos que dedicam à criação de bovinos por meio do uso de alimentos concentrados. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os cursos de água que estão em declínio em relação às áreas onde as canetas de engorda estão localizadas do ponto de vista das concentrações de nutrientes e das contribuições de sólidos por meio da análise físico-química e sua ecotoxicidade através de bioensaios modelo. Para isso, amostras foram retiradas de dois estabelecimentos em três diferentes pontos de cada curso de água: águas arriba, próximo aos locais dos confinamentos e abaixo deles. Este estudo não detecta níveis apreciáveis de toxicidade aguda em *Daphnia magna*. No entanto, níveis leves de toxicidade foram observados em ambos os cursos de água para *Vibrio fischeri* e *Lactuca sativa* consistentes com os efeitos da bioestimulação. Nos estudos físico-químicos verificou-se que em ambos os cursos de água os teores totais de fósforo ultrapassaram os valores estabelecidos no Decreto 253/79 (Uruguay, 1979), que, embora presente até mesmo a montante, aumentou ainda mais para baixo dos currais.

PALAVRAS-CHAVE: Águas superficiais, ecotoxicologia, impacto ambiental, fósforo, eutrofização.

INTRODUCCIÓN

Los grandes avances en la producción pecuaria que ha alcanzado Uruguay en los últimos años, tales como la trazabilidad del ganado, los récords de producción y de exportación de ganado en pie, conllevan la responsabilidad de cuidar y preservar el medio ambiente (MGAP, 2018). La contaminación del agua superficial y subterránea se encuentran entre los aspectos ambientales identificados como algunos de los puntos que se asocian a la actividad, generando la aparición de guías de manejo paliativas, tales como compactar la superficie para evitar la infiltración (MVOTMA, 2017a). Además, internacionalmente se considera que se debe incrementar el conocimiento de las características del agua de escorrentía de los corrales de ganado vacuno para diseñar prácticas de gestión efectivas para proteger la calidad del agua y disminuir los riesgos para la vida acuática, así como para el agua recreativa y potable (Rahman, et al., 2013).

Uno de los factores que ha permitido alcanzar estos niveles de producción son los sistemas intensivos de engorde a corral, con alimentación balanceada a base de concentrados (feedlot). Estos sistemas son fundamentales para el proceso de producción y el cumplimiento de las características específicas para ingresar en mercados internacionales más exigentes y con mayores precios de venta (cuotas HILTON y 481). La obligatoriedad de utilizar estos criterios se contempla en la Resolución #14/033 del Instituto Nacional de Carnes, para producción de carne de alta calidad a exportar a la Unión Europea, lo cual está de acuerdo a las exigencias establecidas en el correspondiente reglamento (Reglamento (UE) N° 593/2013) de fecha 21 de junio de 2013 (Uruguay, 2014), en tanto la cuota 481 está contemplada en el Reglamento de Ejecución de la Unión Europea (UE) N°481/2012 de 7 junio de 2012 (MGAP, 2017).

Un inconveniente de estos sistemas de producción intensiva (feedlot) es que producen grandes volúmenes de estiércol, orina y en ellos se pueden hallar residuos de productos veterinarios en pequeñas superficies (Hernández, 2011), los cuales, mediante infiltración en el terreno, por arrastre, escorrentías o lixiviación, pueden contaminar los suelos y las aguas superficiales y profundas, produciendo potencialmente efectos ambientales adversos (Álvarez, et al., 2011; Grünwaldt, et al., 2011; Rahman, et al., 2013).

Uno de los eventos de mayor notoriedad en los últimos años es la contaminación de la cuenca del Río Santa Lucía debido a una combinación de factores, como la falta de tratamiento de efluentes de tambos y el cultivo en zonas demasiado próximas a los cursos de agua, pero que también comprenden a los establecimientos de engorde a corral (Achkar, et al., 2012). A causa de esto, la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) monitorea numerosos cursos de agua. En particular, en el año 2009 el Banco Interamericano de Desarrollo (BID) financió un relevamiento de los establecimientos de engorde a corral, con el objetivo de conocer el desempeño ambiental que presentaban estos establecimientos, y determinó que la distancia a cursos de agua superficiales sería uno de los puntos críticos a evaluar (Apa y Del Campo, 2009).

Trabajos previos señalan a los desechos pecuarios entre los principales causantes de los procesos de eutrofización de los cursos de agua (Achkar, et al., 2012; Mazzeo, et al., 2010). En la eutrofización, un cuerpo de agua se vuelve abundante en nutrientes, produciéndose un desequilibrio en las cadenas tróficas del sistema. El fenómeno más frecuente es el hipercrecimiento de cianobacterias (Ansari, 2011).

En la legislación uruguaya existen varias normas referentes a protección ambiental, como la Ley N° 17283, en la cual se introduce el concepto de ecotoxicidad (Uruguay, 2000), el Decreto 178/2010 “Condiciones sanitarias y ambientales de los establecimientos de engorde a corral” (Uruguay, 2000) y en particular el Decreto 253/79 (Uruguay, 1979), que trata sobre contaminación de cuerpos de agua.

En este estudio se consideran como referencia los valores establecidos en el Decreto 253/79 (Uruguay, 1979), correspondientes a la clase 2a (“aguas destinadas al riego de hortalizas o plantas frutícolas u otros cultivos destinados al consumo humano en su forma natural, cuando éstas son usadas a través de sistemas de riego que provocan el mojado del producto”), ya que ambos cursos son utilizados como fuente de agua para riego, tanto en los establecimientos donde fue realizado este trabajo como en establecimientos cercanos.

Si bien la literatura reporta diferentes estudios acerca del impacto que presentan estos corrales de engorde en el medio ambiente (Rahman, et al., 2013; Achkar, et al., 2012; Apa y Del Campo, 2009), y hay antecedentes de publicaciones en Uruguay sobre la utilización de bioensayos para evaluar ecotoxicidad de efluentes industriales (Castro, et al., 2002), no se encontró bibliografía en la que se evaluara por estos medios las condiciones en las que se encuentran los cursos de agua ubicados en las cercanías de corrales de engorde.

Los bioensayos, empleando diferentes modelos de la escala trófica, permiten evaluar y predecir el nivel de impacto de estos compuestos sobre el ecosistema (Maciorowski, et al., 1983). Actualmente, la técnica de ecotoxicidad sobre *Vibrio fischeri* en sistema Microtox® se emplea en los laboratorios de contralor de Obras Sanitarias del Estado (OSE), en el departamento de Higiene Ambiental de la Intendencia de Montevideo (IM) y en la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) (protocolo 6159UY, 2017). Este ensayo se utiliza internacionalmente en toxicología acuática, control legal de descargas agrícolas, industriales y municipales, análisis de suelos, sedimentos y sustancias puras líquidas o lixiviados (Kaiser, 1991; American Public Health Association, et al., 1992; MVOTMA, 2017b). Hay profusa bibliografía sobre el uso de *Daphnia*, en especial *D. magna* y *D. pulex*, como bioindicadora debido a su alta sensibilidad, que permite evaluar la toxicidad de contaminantes ambientales en aguas y en otras matrices (Siciliano, et al., 2015).

El bioensayo con *Lactuca sativa* se ha utilizado para el monitoreo de la calidad de agua en los ecosistemas dulceacuícolas en forma integradora, incluyendo los puntos finales de fitotoxicidad, de germinación de semillas y la prueba de la elongación radical (Rodríguez Romero, et al., 2014).

Este estudio propone una metodología que se puede aplicar como parte de una evaluación de impacto ambiental, ya que permite combinar la evaluación ecotoxicológica del curso de agua con el estudio del aporte de nutrientes que se podría dar

por escorrentía desde fuentes no puntuales, incluyendo feedlots y otras actividades. Una completa evaluación de impacto ambiental en feedlots abarcaría muchos otros aspectos ambientales, pero siempre incluye los aportes de nutrientes y de sedimentos, la calidad del agua y las características de erosión del suelo (Davis y Watts, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Selección de los establecimientos

Esta investigación contó con el apoyo de la Asociación Uruguaya de Productores de Carne Intensiva Natural (AUPCIN), que brindó el acceso a establecimientos que cumplieran con determinadas características predefinidas para realizar el estudio:

- Permanencia de animales: los bovinos deberían permanecer dentro del corral a lo largo de todo el estudio.
- Presencia de un curso de agua: cercanía de un curso de agua continua en declive a los corrales.
- Accesibilidad: Autorización para ingreso y toma de muestras por parte del establecimiento, sin un compromiso con la difusión de los resultados finales de la producción.
- Antecedentes de estudios de impacto ambiental conducidos por DINAMA, que indicaran previamente los puntos válidos para el muestreo (comunicación personal del propietario).

Se estudiaron dos establecimientos de la cuenca del Río Negro afluentes al Arroyo Marincho (establecimiento A) y al Arroyo Grande del Sur (establecimiento B), ubicados en el departamento de Flores, y que contaban con las características necesarias para llevar a cabo esta investigación (Figura 1).



Figura 1. Mapa satelital de los establecimientos. En la izquierda el establecimiento A y a la derecha el establecimiento B. En color rojo se indican los corrales, el curso de agua en azul y los puntos de muestreo en amarillo: 1 aguas arriba; 2 frente al corral; 3 aguas abajo.

El establecimiento A contaba con cuatro corrales, dos de ellos se encontraban en producción, con una carga de 900 bovinos, mientras que el establecimiento B contaba con ocho corrales, de los cuales cuatro se encontraban con una dotación de 1500 bovinos. En ambos establecimientos se mantuvieron las condiciones durante todo este estudio.

b) Plan de muestreo

Los bovinos se encontraban en los corrales 30 días previos al comienzo del estudio. Los dos muestreos de los cursos de agua se realizaron con una diferencia de 30 días. Para cada uno de los cursos de agua bajo estudio, ubicados en las inmediaciones de los establecimientos de engorde a corral, se utilizaron tres puntos de muestreo establecidos previamente por la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) en estudios anteriores. Estos puntos fueron: aguas arriba del emprendimiento, aguas abajo del emprendimiento (ambos a aproximadamente 200 metros de los corrales) y frente al emprendimiento (Figura 1). La fecha del primer muestreo fue el 28/12/16 y la del segundo muestreo fue el 27/01/17. En ninguno de los casos se registraron precipitaciones (INUMET, 2019).

La obtención de las muestras se realizó por inmersión directa, por duplicado, utilizando recipientes de polietileno de alta densidad de 5 litros, sin dejar cámara de aire, de forma tal que se pudiese enviar a ambos laboratorios una muestra para su rápido procesamiento.

Las muestras se transportaron refrigeradas en un lapso menor a 6 horas al Laboratorio S&B Diagnósticos (Montevideo, Uruguay) y al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU, Montevideo, Uruguay). Luego fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis. El procedimiento se ajustó a la metodología descrita en la norma ISO 5667-16 (International Organization for Standardisation, 1998).

En todos los casos las muestras se procesaron con un lapso no mayor a 12 horas desde su obtención.

c) Análisis

c.1. Bioensayos

c.1.1. Test estático agudo (5 días), con semillas de *Lactuca sativa* var. *Buttercrunch*. En este estudio se comparó el crecimiento radicular de las semillas de lechuga expuestas a un tratamiento al 100% de la muestra y a un control negativo que consiste en agua dura reconstituída (APHA, 1992). La significación de las diferencias de crecimiento encontradas se realizó mediante la aplicación de un análisis de varianza ANOVA a dos vías y la realización de su correspondiente post-test (OECD, 1984; Ellis, 1985; Wang, 1987; Cheung, et al., 1989; Dutka, 1989; US EPA, 1989; Bowers, et al., 1997; American Public Health Association, 2012).

c.1.2. Test estático agudo (48 hs), *Daphnia magna*. Esta técnica consiste en preparar diluciones 1:2 seriadas de la matriz a estudiar, sembrar los microcrustáceos e incubarlos durante 48 hs. Luego se determina la mortalidad de los ejemplares y

se realiza un análisis estadístico (Lewis y Maki 1981; Goulden, 1982; Edley y Law, 1988; Dutka, 1989; Girling y Garforth, 1989; Gutiérrez, 1989; Elendt y Bias, 1990; US EPA, 1991; Klüttgen, et al., 1994; Castillo, 2004).

c.1.3. Test de toxicidad aguda Microtox®. Este método emplea como reactivo una cepa liofilizada de *Vibrio fischeri*, a una densidad de 10⁶ cél/mL (Agriculture Research Service Culture Collection (NRRL) como B-11177).

Para el análisis de las muestras, el protocolo utilizado fue el “81,9% screening test” (DINAMA 6159 UY). El diseño experimental se basa en la comparación de la emisión de luz de una alícuota de *V. fischeri* en un medio libre de toxicidad que consiste en una solución de NaCl al 2% en agua desionizada sin muestra (control), contra una alícuota de dicho microorganismo en la muestra a analizar.

Las diferencias de emisión de luz entre el control y las muestras se consideran significativas cuando los valores obtenidos son iguales o superiores a 17 Unidades Relativas de Luz (URL) (Environment Canada, 1992). Valores positivos superiores a 17 URL significan una reducción de la emisión de luz respecto al control por algún efecto tóxico sobre la vía metabólica. Valores negativos en la diferencia de emisión entre el control y las muestras indican un efecto de sobreexcitación del metabolismo bacteriano, con la consiguiente sobreproducción de luz. Dicho fenómeno puede considerarse tóxico cuando la diferencia es superior a 17 URL. Para medir la luminosidad se utiliza el fotómetro Microtox® modelo 500, que mide la luz remanente en una longitud de onda de 490 nm (MVOTMA, 2017b; Environment Canada, 1992; Environment Canada, 1999).

Para la realización de estos estudios se tuvieron en cuenta las normas de bioseguridad y las normas de control de calidad establecidas para la realización de trabajos en el Laboratorio S&B (MVOTMA, 2017b).

c.2. Análisis fisicoquímicos

Los análisis fisicoquímicos fueron realizados en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Estos estudios se consignan en la Tabla 1.

TABLA 1. Referencias bibliográficas para las técnicas fisicoquímicas utilizadas.

Parámetros	Referencia
Sólidos disueltos volátiles	APHA 2540E
Sólidos disueltos fijos	
Sólidos suspendidos fijos	
Sólidos suspendidos volátiles	
Sólidos fijos (mg/l)	APHA 2540E
Sólidos volátiles	
DBO5 (como O2)	ISO 5815-2-2003

Parámetros	Referencia
DQO (como O ₂)	ISO 15705
pH	PEC.PQAR.101 basado en APHA 4500 H
Conductividad	PEC.PQAR.112 basado en Norma ISO 7888-1985-05-15
Fósforo soluble (como P)	PEC.PQAR.113 basado en ISO 10304-1/2007
Nitratos (como N)	PEC.PQAR.114 basado en ISO 8467
Oxidabilidad (como O ₂)	PEC.PQAR.114 basado en ISO 8467
Amonio (como N)	PEC.PQAR.612 basado en APHA 4500 NH ₃ -D
Oxidabilidad (como O ₂)	PEC.PQAR.114 basado en ISO 8467
Amonio (como N)	PEC.PQAR.612 basado en APHA 4500 NH ₃ -D
Sólidos totales	PEC.PQAR003 basado en APHA 2540 B, 22 ^a ed, 2012
Sólidos totales disueltos	PEC.PQAR004 basado en APHA 2540C-1997
Sólidos suspendidos totales	PEC.PQAR006 basado en APHA 2540 D, 22 ^a ed, 2012
Nitrógeno total (como N)	PEC.PQAR606 basado en ISO 11905-2
Fósforo total (como P)	QuikChem method 31-115-01-03-D

d) Análisis estadístico

El sistema Microtox® procesa los datos obtenidos mediante el Software MicrotoxOmni. Los datos obtenidos de los modelos de *Daphnia magna* se analizaron por modelos no paramétricos o mediante un análisis Probit (Bliss, C.I., citado por Cochran y Finney, 1979) o de Spearman-Kärber (Spearman, 1908; Kärber, 1931), mientras que en el modelo de *Lactuca sativa* se presentan como la media y el desvío estándar, para luego comparar los resultados con el grupo control mediante un análisis de varianza y un post test. En todos los casos el nivel de significancia se estableció para un $P < 0,05$.

RESULTADOS

Bioensayos

Lactuca sativa: En ninguno de los muestreos, en cada establecimiento, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre muestras, pero sí se observó un leve efecto de bioestimulación respecto al control ($P < 0,05$).

Daphnia magna: En cuanto al ensayo agudo (48 hs) de *Daphnia magna*, cuyo punto final de evaluación es la mortalidad de los ejemplares, no se observó mortalidad

en los ejemplares expuestos a las distintas concentraciones estudiadas (10, 25, 50, 75 o 100%), para ninguno de los muestreos efectuados en ambos establecimientos.

Microtox®: En el primer muestreo, la única muestra que evidenció un efecto tóxico fue la obtenida frente al corral del establecimiento B. Mientras que en el segundo muestreo los efectos tóxicos se evidenciaron en todos los puntos del establecimiento A y aguas arriba del establecimiento B, aunque en ese muestreo no se obtuvieron resultados para la muestra enfrente al corral (Tabla 2).

TABLA 2. Ensayo ecotoxicológico con la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri* (sistema Microtox®).

Muestras	Ensayo Microtox	Establecimiento A			Establecimiento B		
		Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo
Primer muestreo	CE ₅₀ , 5 minutos	-13,98	-9,86	-11,24	-10,62	-24,15*	-8,49
	CE ₅₀ , 15 minutos	-14,72	-11,22	-11,87	-14,54	-25,27*	-14,39
Segundo muestreo	CE ₅₀ , 5 minutos	-5,6	-3,83	-8,83	-11,92	•	6,32
	CE ₅₀ , 15 minutos	-20,99*	-20,79*	-23,25*	-28,66*	•	-7,68

* Diferencias significativas • Valores afectados por turbidez.

CE₅₀: Concentración efectiva para reducir un 50% la luminiscencia con respecto al blanco.

Estudios fisicoquímicos

Del total de los análisis fisicoquímicos realizados a los cursos de agua (19), cinco están incluidos dentro de las exigencias del Decreto 253/79 (Uruguay, 1979) para la categoría 2a.

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos y los rangos de aceptación en aquellos parámetros que corresponden al Decreto 253/79 (Uruguay, 1979). En los parámetros que no se encuentran en el decreto se aclara NCD (no corresponde al decreto).

TABLA 3. Ensayos fisicoquímicos para el establecimiento A.

Parámetros	Establecimiento A						Rango de aceptación
	Primer muestreo			Segundo muestreo			
	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	
pH	8,33	8,22	7,64	7,86	7,96	8,30	Entre 6,5 y 9
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	490	512	502	639	947	853	NCD
Sólidos totales (mg/L)	372	393	344	530	712*	643	Máximo 700 mg/L
Sólidos fijos (mg/L)	271	242	219	397	577	510	NCD
Sólidos totales disueltos (mg/L)	368	386	334	523	701	637	NCD
Sólidos disueltos fijos (mg/L)	271	241	217	393	570	507	NCD
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	4,4	6,80	10,0	7,0	11,0	6,0	NCD
Sólidos suspendidos fijos (mg/L)	ND	1,2	2,4	4,2	7,0	3,8	NCD
Sólidos suspendidos volátiles (mg/L)	4,4	5,6	7,6	<3	4,0	<3	NCD
Oxidabilidad (mg/L)	10,8	10,1	10,8	11,4	4,71	3,46	NCD
DBO ₅ (mg/L)	0,9	<0,5	<0,5	1,8	2,4	1,6	Máximo 10 mg/L
DQO (mg/L)	20	24	19	35	<14	<14	NCD
Amonio (mg/L)	<0,02	ND	<0,02	0,15	0,16	0,1	NCD
Nitrógeno total (mg/L)	2,24	2,28	2,35	0,87	3,68	3,85	NCD

Establecimiento A							
Parámetros	Primer muestreo			Segundo muestreo			Rango de aceptación
	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	
Nitratos (mg/L)	1,41	1,51	1,55	<0,034	3,64	3,96	Máximo 10 mg/L, como N
Nitritos (mg/L)	0,068	0,067	0,065	ND	ND	ND	NCD
Fósforo soluble (mg/L)	0,57	0,57	0,56	0,23	0,11	0,2	NCD
Fósforo total (µg/L)	616*	645*	609*	367*	283*	442*	Máximo 25 µg/L

ND: no detectable. * Valores por encima de la normativa.

NCD: no corresponde al Decreto 253/79 (Uruguay, 1979)

TABLA 4. Ensayos fisicoquímicos obtenidos para el establecimiento B.

Establecimiento B							
Parámetros	Primer muestreo			Segundo muestreo			Rango de aceptación
	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	
pH	7,78	7,60	7,72	7,98	8,14	8,26	Entre 6,5 y 9,0
Conductividad (µS/cm)	498	468	484	565	616	666	NCD
Sólidos totales (mg/L)	378	393	347	401	454	486	Máximo 700 mg/L
Sólidos fijos (mg/L)	287	266	206	314	377	383	NCD
Sólidos totales disueltos (mg/L)	366	383	347	398	450	481	NCD
Sólidos disueltos fijos (mg/L)	281	264	206	313	376	380	NCD
Sólidos suspendidos totales (mg/L)	12,0	9,7	ND	3,0	4,5	5,7	NCD

Establecimiento B							
Parámetros	Primer muestreo			Segundo muestreo			Rango de aceptación
	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	Aguas arriba	Frente al corral	Aguas abajo	
Sólidos suspendidos fijos (mg/L)	6,0	2,1	ND	<3	ND	3,0	NCD
Sólidos suspendidos volátiles (mg/L)	6,0	7,6	ND	<3	4,2	<3	NCD
Oxidabilidad (mg/L)	10,89	8,4	8,79	2,6	6,29	5,72	NCD
DBO ₅ (mg/L)	1	<0,5	1,6	1,5	6,9	4,6	Máximo 10 mg/L
DQO (mg/L)	<14	<14	20	<14	30	27	NCD
Amonio (mg/L)	0,06	0,05	0,02	0,07	1	0,11	NCD
Nitrógeno total (mg/L)	3,07	3,75	4,13	1,41	1,68	1,17	NCD
Nitratos (mg/L)	2,57	2,82	3,04	1,37	0,15	0,18	Máximo 10 mg/L, como N
Nitritos (mg/L)	0,081	0,116	0,154	ND	ND	ND	NCD
Fósforo soluble (mg/L)	0,28	1,02	1,56	0,028	4,00	4,05	NCD
Fósforo total (µg/L)	343*	1080*	1700*	131*	4120*	4300*	Máximo 25 µg/L

ND: no detectable. * Valores por encima de la normativa. NCD: no corresponde al Decreto 253/79 (Uruguay, 1979)

DISCUSIÓN

Los bioensayos, a diferencia de los estudios fisicoquímicos, no evalúan los componentes de la matriz, ni sus variables físicas, sino que miden directamente la acción de la matriz sobre modelos biológicos. Se busca predecir el potencial efecto de la contaminación de esta matriz sobre el medioambiente de acuerdo a las recomendaciones internacionales (Environment Canada, 1999) y, análogamente a lo que se plantea en el Decreto 182/013 (Uruguay, 2013), empleando organismos que se encuentran en tres ambientes físicos: bacterioplanctónicos (*Vibrio fischeri*), zooplanctónicos (*Daphnia magna*), y terrestre (*Lactuca sativa*), pertenecen a tres niveles tróficos [*L. sativa*,

autotrófico; *D. magna*, consumidor primario, y *V. fischeri*, heterótrofo detritívoro (Spósito y Espínola, 2016)], y tres especies pertenecientes a distintos reinos. De este modo, la diferencia en respuestas de los organismos frente a los tóxicos es tenida en cuenta, ya que las especies elegidas tienen tres niveles de complejidad diferentes en su organización biológica (bacterias, crustáceos y plantas), lo cual disminuye la incertidumbre con respecto a usar un bioensayo único.

Si bien no se evidenciaron niveles de toxicidad con el modelo de *Daphnia magna*, se observó bioestimulación leve tanto con el ensayo de *Lactuca sativa*, como con el ensayo con *Vibrio fischeri* (Microtox®) que manifestó niveles leves de toxicidad ($\Delta URL < 30\%$ del total).

En el segundo muestreo del establecimiento B se presentó interferencia por turbiedad en uno de los triplicados del ensayo de Microtox®, por lo que se consideraron solamente resultados de las otras dos réplicas en el análisis estadístico de los datos.

Si bien no se produce franca toxicidad, la presencia de los valores negativos en el ensayo de *Vibrio fischeri* indica una estimulación del metabolismo bacteriano. Esta estimulación (bioestimulación del crecimiento denominada hormesis) puede deberse a la presencia de determinados nutrientes o sustancias moduladoras del metabolismo, que pueden afectar en esa forma a *L. sativa* (Agathokleous, 2018), pero no existen informes sobre si el fósforo en exceso puede ocasionar este efecto en *V. fischeri*. Además de los nutrientes, en las muestras podrían existir mezclas de compuestos orgánicos responsables de ese efecto, pero la determinación de la ocurrencia de estas últimas no estuvo en el alcance de este trabajo. Sin embargo, otros autores en estudios que expusieron a esta bacteria bioluminiscente a concentraciones bajas de productos farmacéuticos y de cosméticos observaron que en algunos casos se evidenciaban curvas de dosis-respuesta en forma de U invertida o de J y que 55% de ellos presentaban efectos estimulantes por debajo del punto de concentración cero (Ortiz de García, et al., 2016). También se ha visto que los antibióticos para uso humano y veterinario inducen hormesis en plantas (Agathokleous, et al., 2018). Es por eso que en investigaciones futuras se podría profundizar el estudio agregando determinaciones de residuos de antibióticos, ectoparasitarios y otros contaminantes emergentes y disruptores endócrinos, así como también evaluar la presencia de genes de resistencia bacteriana. Asimismo, sería interesante evaluar los efectos en otras especies, por ejemplo en peces.

Los sólidos totales superan el valor de la normativa frente al corral en el establecimiento A en el segundo muestreo. Según Sorensen et al. (1977), las concentraciones de sólidos suspendidos totales que pueden existir en los efluentes de feedlots contendrían desde 1000 a 13400 mg/L, o más, de sólidos suspendidos y otros contaminantes. Este mismo autor explica que a través de los sólidos suspendidos se puede producir el transporte de nutrientes, en especial fósforo, responsables de la eutrofización. También sostiene que es importante evaluar los aportes de sólidos disueltos totales fijos, ya que dan una idea de las sales minerales existentes, pero también la presencia de los sólidos disueltos volátiles, que aporta información sobre los componentes orgánicos (Sorensen, et al., 1977).

En cuanto a los niveles de fósforo total, estos se encontraban por encima de lo establecido en la normativa nacional (Decreto 253/79; Uruguay, 1979), incluso desde

aguas arriba a los establecimientos. Los valores de fósforo se vieron incrementados a medida que atravesaban los establecimientos (Tablas 3 y 4).

Estudios realizados en otras cuencas, Cuenca del Río Santa Lucía, por ejemplo, han demostrado que las áreas de manejo agrícola intensivo pueden tener valores de fósforo en el orden de los obtenidos en este estudio (Barreto, et al., 2017). A pesar de que las concentraciones de fósforo total fueron muy superiores a las admitidas por la normativa, en el momento de los muestreos no se apreciaban floraciones de algas, pero sería conveniente realizar un monitoreo con periodicidad estacional.

También se observó en ambos muestreos del establecimiento B un aumento muy marcado en las concentraciones relativas del fósforo soluble en las muestras frente al establecimiento y aguas abajo, respecto a los niveles obtenidos aguas arriba, comportamiento que se observó también en el establecimiento A pero no en la misma magnitud.

En cuanto a nitrógeno total y nitratos, en ambos establecimientos se observaron variaciones relativas de los valores obtenidos aguas arriba con los obtenidos frente al corral y aguas abajo, lo que deja planteada la hipótesis de que el aumento de estos podría deberse a un aporte de los corrales.

Cabe destacar que, en ninguno de los muestreos, los niveles de nitratos superaron lo establecido por la normativa nacional, a pesar de que existieron variaciones relativas en los diferentes puntos de muestreo.

Debido a que la matriz empleada para este estudio es una matriz dinámica (curso de agua continuo), habría que considerar el uso del suelo de la cuenca del Río Negro para tener en cuenta todas las fuentes posibles complementarias al sistema de feedlots (por ejemplo, de la agricultura). De todos modos, una hipótesis a considerar es que los efectos observados podrían ser causados por las actividades que se desarrollan alrededor del punto de muestreo en cuestión. Los feedlots relevados en este estudio realizan un manejo de sus efluentes que consiste en el retiro de la capa superficial de la tierra que queda en los corrales con retroexcavadoras luego de cumplido el ciclo productivo y el retiro de los animales del corral, permitiendo posteriormente proceder a realizar la fermentación en el terreno, por lo que es de esperar que se produzca el ingreso de los contaminantes por infiltración al terreno y escorrentía luego de precipitaciones.

Para poder afirmar estas hipótesis sería necesario realizar un estudio con mayor número de muestreos y más extendido en el tiempo para contar con un respaldo estadístico de los valores obtenidos, así como para correlacionar la intensidad de las precipitaciones con las concentraciones recibidas en el curso de agua.

Un estudio complementario podría ser el análisis de los sedimentos de estos arroyos, ya que en ellos precipitan elementos que reflejan de una forma estática el estado de situación (García, et al., 2017). Además, sería interesante investigar el agua subterránea, que brindaría información sobre los posibles efectos de contaminación de esta matriz.

CONCLUSIONES

En los estudios realizados con *Daphnia magna* no se detectaron niveles de toxicidad, mientras que con los modelos de *Lactuca sativa* y *Vibrio fischeri* se detectaron niveles de toxicidad leve en todos los puntos del muestreo. En cuanto a los parámetros físico-químicos, los cursos de agua previo al ingreso a los establecimientos ya se encontraban con niveles de fósforo total por encima de los establecidos en la normativa. No obstante, se pudo observar variaciones en las concentraciones relativas en los diferentes puntos de muestreo y establecimientos para las concentraciones de fósforo total, fósforo soluble, nitratos y nitrógeno total, a medida que el curso de agua avanza por los puntos de muestreo en ambos establecimientos, pero en forma más notoria en el establecimiento con mayor dotación de animales.

REFERENCIAS

- Achkar, M., Dominguez, A. y Pesce, F., 2012. *Cuenca del Santa Lucia, aportes para la discusión ciudadana*. Montevideo: Redes. [Consulta: 2 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.redes.org.uy/2012/12/12/cuenca-del-rio-santa-lucia-uruguay-aportes-para-la-discusion-ciudadana/>
- Agathokleous, E., 2018. Environmental hormesis, a fundamental non-monotonic biological phenomenon with implications in ecotoxicology and environmental safety. En: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, pp.1042–1053. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.003>
- Agathokleous, E., Mitsutoshi, K. y Calabrese, E.J., 2018. Human and veterinary antibiotics induce hormesis in plants: Scientific and regulatory issues and an environmental perspective. En: *Environment International*, 120, pp.489-495.
- Álvarez, A., D´Elía, M., Paris, M., Fasciolo, G. y Barbazza, C., 2011. Evaluación de la contaminación de acuíferos producida por actividades de saneamiento y re-uso de efluentes en el norte de la provincia de Mendoza. En: *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo*, 43(1), pp.19-39. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: http://revista.fca.uncu.edu.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=117:evaluacion-de-la-contaminacion-de-acuíferos-producida-por-actividades-de-saneamiento-y-re-uso-de-efluentes-en-el-norte-de-la-provincia-de-mendoza&catid=11:no-1-ano-2011&Itemid=16
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF), 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington: APHA.
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF), 1997. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington: APHA.
- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22ª ed. Washington: APHA. Standard Method 4500 CL, Approved 1997-Rev. 2011.

- Ansari, A.A., 2011. *Eutrophication: causes, consequences and control*. Berlín: Springer, Dordrecht, [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsebk&AN=371421&lang=es&site=eds-live>.
- Apa, M. y Del Campo, M., 2009. *Relevamiento del desempeño ambiental del sector engorde a corral*. Montevideo: BID. (Proyecto BID URU 07/12).
- Barreto, P., Dogliotti, S. y Perdomo, C., 2017. Surface water quality of intensive farming areas within the Santa Lucía River Basin of Uruguay. En: *Air, Soil and Water Research*, 10, pp.1–8
- Bowers, N., Pratt, J., Beeson, D. y Lewis, M., 1997. Comparative evaluation of soil toxicity using lettuce seeds and soil ciliates. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(2), pp.207-213. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160216>
- Castillo, G., ed., 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* [En línea]. México: IMTA, 2004. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.idrc.ca/en/book/ensayos-toxicologicos-y-metodos-de-evaluacion-de-calidad-de-aguas-estandarizacion>
- Castro Scarone, S., Míguez Caramés, D., Viana Matturro, F. y Espínola Moltedo, J.C., 2002. *Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay: informe final*. Montevideo: DINAMA, LATU, Facultad de Ciencias, IMM, IDRC.
- Cheung, Y.H., Wong, M.H y Tam, N.F.Y., 1989. Root and shoot elongation as an assessment of heavy metal toxicity and Zn equivalent value' of edible crops. En: *Hydrobiologia*, 188/189, pp.377-383.
- Cochran, William G. y Finney, D., 1979. Chester Ittner Bliss, 1899-1979. En: *Biometrics*, 35(4), pp.715–717. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: www.jstor.org/stable/2530102.
- Davis, R.J. y Watts, P.J., 2011. *Environmental sustainability assessment of the australian feedlot industry. Part F report: resource use and environmental impact assessment* [En línea]. Sydney: MLA. [Consulta: 17 de mayo 2019]. Disponible en: <https://www.mla.com.au/download/finalreports?itemId=735>
- Dutka, B., 1989. *Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments*. California: NWRI.
- Edley, M.T y Law, R., 1988. Evolution of life histories and yields in experimental population of *Daphnia magna*. En: *Biol. J. Limn. Soc.*, 34, pp.309-326.
- Elendt, B.P. y Bias, W.R., 1990. Trace nutrient deficiency in *daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. En: *Wat. Res.*, 24(9), pp.1157-1167.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. y Roberts, E.H., 1985. *Handbook of seed technology for genebanks. Vol.1 principles and methodology, international board of plant genetic resources*. Roma: IBPGR.
- Environment Canada, 1992. *Biological test method: toxicity test using luminescent bacteria. EPS 1/RM/24* [En línea]. Ottawa: Environment Canada. [Consulta: 02

- de marzo de 2019]. Disponible en: <http://publications.gc.ca/site/eng/9.579452/publication.html>
- Environment Canada, 1999. *Guidance document on application and interpretation of single-species tests un environmental toxicology. EPS 1/RM/34*. [En línea]. Ottawa: Enviroment Canada. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://publications.gc.ca/site/eng/9.579411/publication.html>
- García, J., Lercari, D., Araujo, B.F., Almeida, M.G. y Rezende, C.E., 2017. Total and extractable elemental composition of the intertidal estuarine biofilm of the Río de la Plata: Disentangling natural and anthropogenic influences. En: *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 187(5), pp.53-61.
- Girling, A.E., Garforth, B.M., 1989. Influence of variations in culture medium on the survival and reproduction of *Daphnia magna*. En: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42, pp.119-125.
- Goulden, C.E., Hendrickson, J.A., Comotto, R.M. y Johnson, K.L., 1982. *Procedures and recomendations for the culture and use of Daphnia in bioassay studies STP 766*. Filadelfia: ASTM. Doi: 10.1520/STP36715S
- Grünwaldt, E.G. y Guevara, J.C., 2011. Rentabilidad del engorde a corral de bovinos de carne en la provincia de Mendoza, Argentina. En: *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo*, 43(2), pp.21-34. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652011000200002
- Gutiérrez, L.E., 1989. *Procedimientos de evaluación tóxica de efluentes industriales líquidos utilizando Daphnia magna Straus (Cladóceras, Crustácea)*. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Hernández, A., 2011. Alternativas de gestión de efluentes y residuos sólidos en establecimientos de engorde a corral [En línea]. En: MVOTMA. *Jornada técnica: prevención de los impactos ambientales de establecimientos de engorde a corral*. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://mvotma.gub.uy/component/k2/item/10009793-jornadas-tecnicas-de-prevencion-de-impactos-ambientales-en-los-sistemas-de-engorde-a-corral>
- International Organization for Standarization, 1998. ISO 5667-16: *Water quality -- Sampling -- Part 16: Guidance on biotesting of samples*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standarization, 2002. ISO 15705: *Water quality. Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD). Small-scale sealed-tube method*. Ginebra: ISO.
- INUMET, Instituto Uruguayo de Meteorología, 2019. *Boletín pluviométrico* [En línea]. Montevideo: INUMET. [Consulta: 28 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.inumet.gub.uy/clima/recursos-hidricos/boletin-pluviometrico>.
- Kaiser, K., 1991. Photobacterium phosphorum toxicity data index. En: *Water Quality Research Journal of Canada*, 26(3), pp.361-431.
- Kärber, G., 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. En: *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162, pp.480-483.

- Klüttgen, B., Dülmer, U., Engels, M. y Ratte, H.T., 1994. ADam and artificial freshwater for the culture of zooplankton. En: *Water Research*, 28(3), pp.743-746.
- Lewis, M.A y Maki, A.W., 1981. Effects of water hardness and diet on productivity of daphnia magna strauss, in laboratory culture. En: *Hydrobiology*, 85, pp.175-179.
- Macirowski, A. F., Little, L. W., Raynor, L. F., Sims, Ronald, C. y Sims, J. L., 1983. Bioassays- procedures and results. En: *Water Pollution Control Federation*, 55(6), pp.801-816. [Consulta: 17 de junio de 2019]. Disponible en: https://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1063&context=bioeng_facpub
- Mazzeo, N., García-Rodríguez, Felipe, Rodríguez, Adriana, Méndez, Gustavo, Iglesias, Carlos, Inda, Hugo, Goyenola, Guillermo, García, Soledad, Fosalba, Claudia, Marroni, Soledad, Crisci, Carolina, del Puerto, Laura, Clemente, Juan, Pacheco, Juan Pablo, Carballo, Carmela, Kröger, Alejandra, Vianna, Mariana, Meerhoff, Mariana, Steffen, Manfred, Lagomarsino, Juan José, Masdeu, Malvina, Vidal, Nicolás, Teixeira de Mello, Franco, González Bergozoni, Iván y Diego Larrea, 2010. Fundamentos científicos: certezas e incertidumbres. En: Steffen, Manfred e Inda, Hugo, ed. *Bases técnicas para el manejo integrado de Laguna del Sauce y cuenca asociada* [En línea]. Cap. 5. Montevideo: Universidad de la República. pp. 31-52. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: http://www.saras-institute.org/images/publications/laguna_del_sauce.pdf
- MVOTMA. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2017a. *Guía de buenas prácticas ambientales y sanitarias de establecimientos de engorde de bovinos a corral* [En línea]. Montevideo: AUPCIN, INIA, MGAP, MVOTMA. [Consulta: 13 de mayo de 2019]. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/guia_de_buenas_practicas_ambientales_y_sanitarias_de_establecimientos_de_engorde_de_bovinos_a_corral.pdf
- MVOTMA. Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente, 2017b. *Manual para procedimientos analíticos para muestras ambientales. Técnica 6159UY* [En línea]. 3ra ed. Montevideo: MVOTMA. [Consulta: 02 de marzo de 2019] Disponible en: <https://www.mvotma.gub.uy/component/k2/item/10010852-toxicidad-aguda-en-fase-liquida-utilizando-vibrio-fischeri-basic-test-6159uy>
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development, 1984. *Terrestrial plants: growth test. Guideline for testing of chemicals N° 208* [En línea]. Paris: OECD. [Consulta: 02 de marzo de 2019] Disponible en: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test_9789264070066-en
- Ortiz de García, S., García-Encina, P.A. y Irusta-Mata, R., 2016. Dose-response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products. En: *Ecotoxicology*, 25(1), pp.141-162.
- Rahman, S., Scherer, T., Rahman, A. y Lang, J., 2013. *Water quality of runoff from beef cattle feedlots*. North Dakota: North Dakota State University. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://www.ag.ndsu.edu/publications/environment-natural-resources/water-quality-of-runoff-from-beef-cattle-feedlots>
- Rodríguez Romero, A., Robles Salazar, C., Ruíz Picos, R., López López, E., Sedeño Díaz, J. y Rodríguez Dorantes, A., 2014. Índices de germinación y elongación

- radical de *Lactuca sativa* en el biomonitoreo de la calidad del agua del río Chalma / Seed germination and root elongation test of *Lactuca sativa* for biomonitoring water quality of the Chalma river. En: *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(3), p.307-316.
- Siciliano, A., Gesuele, R., Pagano, G. y Guida, M., 2015. How daphnia (Cladocera) assays may be used as bioindicators of health effects? Mini review. En: *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, pp.4-6. doi: 10.4172/2332-2543.S1-005
- Sorensen, D., McCarthy, M., Middlebrooks, E. y Porcella, D., 1977. *Suspended and dissolved solids effects of freshwater biota. A review*. Washington: US EPA. (Ecological Research Series. EPA-600/3-77-042).
- Spearman, C., 1908. The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss's formulae. En: *British Journal of Psychology*, 2, pp.227-242.
- Spósito, M. y Espínola Moltedo, J.C., 2016. Evaluación in vitro del efecto tóxico de una formulación comercial de glifosato de amonio sobre cinco especies representantes de diferentes hábitats y niveles tróficos. En: *Innotec*, 12, pp. 48-53.
- Uruguay. Resolución 14/033, [s.d.]. *Diario Oficial*, 2 de junio de 2014, p.8.
- Uruguay. Decreto 182/2013, de 20 de junio de 2013. *Diario Oficial*, 27 de junio de 2013, p.1262.
- Uruguay. Decreto 178/2010, de 07 de junio de 2010. *Diario Oficial*, 17 de junio de 2010, p. 1146.
- Uruguay. Ley 17283/2000, de 28 de noviembre de 2000. *Diario Oficial*, 12 de diciembre de 2000, p.932.
- Uruguay. Decreto 253/1979, de 09 de mayo de 1979. *Diario Oficial*, 31 de mayo de 1979, p. 1473.
- US EPA, 1989. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites [En línea]. Washington: US EPA. [Consulta: 02 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/2000HUXX.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1986+Thru+1990&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C86thru90%5CTxt%5C00000007%5C2000HUXX.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>
- US EPA, 1991. *Methods for measuring the acute toxicity of effluent and receiving waters to freshwater and marine organisms*. 4th ed. Washington: US EPA.
- Wang, W., 1987. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. En: *Environmental Toxicology & Chemistry*, 6, pp.409-414. [Consulta: 20 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/etc.5620060509>