Tesis de Maestría



Predicción de la biodisponibilidad y bioacumulación de cadmio asociado a partículas de sedimentos

López, Ana Graciela

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Magister de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Ambientales de la Universidad de Buenos Aires



Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.



Cita tipo APA:

López, Ana Graciela. (2004). Predicción de la biodisponibilidad y bioacumulación de cadmio asociado a partículas de sedimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3753_Lopez



López, Ana Graciela. "Predicción de la biodisponibilidad y bioacumulación de cadmio asociado a partículas de sedimentos". Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3753_Lopez





Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Orientación: Tecnológica

AÑO 2004

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE "MAGISTER OF SCIENCE"

TESISTA: Licenciada Ana Graciela López

DIRECTORA: Doctora Noemí Verrengia Guerrero

3 2 € 3

PREDICCIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD Y BIOACUMULACIÓN DE CADMIO ASOCIADO A PARTÍCULAS DE SEDIMENTOS



ÍNDICE

| Pág | ina |
|---|------|
| 1 – RESUMEN | 4 |
| 2 – INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2.1 - Sistemas Acuáticos y Contaminación | 6 |
| 2.1.1 - Causas y Consecuencias | 6 |
| 2.1.2 - El agua potable y la Salud Pública | 8 |
| 2.1.3 - Subcompartimientos del sistema acuático | 9 |
| 2.2 - Contaminantes metálicos y su relación con los seres vivos | 11 |
| 2.2.1 -Algunos aspectos tóxicos del Cadmio | 15 |
| 2.3 - Especiación y Biodisponibilidad de elementos metálicos | 18 |
| 2.3.1 - Sustancias húmicas | 20 |
| 2.3.2 - Interacciones con partículas de sedimentos | 23 |
| 2.4 - Evaluación de contaminantes en sistemas acuáticos | |
| 2.5 - Objetivos del presente trabajo | 28 |
| 3 – MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 3.1- Materiales | 31 |
| 3.2 - Partículas seleccionadas | . 32 |
| 3.3 - Organismo seleccionado | . 33 |
| 3.4 - Estudios Toxicocinéticos | . 34 |
| 3.5 - Estudios de letalidad | . 35 |
| 3.6 - Bioensayos de acumulación | . 35 |
| 3.7 - Análisis de Cadmio | . 36 |
| 3.8 - Análisis estadístico | |
| 4 – RESULTADOS | . 38 |
| 4.1 Fetudios tovicocinéticos | 20 |

| 4.1.1 Estudios de absorción y acumulación39 |
|--|
| 4.1.2- Estudios de eliminación |
| 4.2 Estudios de letalidad40 |
| 4.2.1 Influencia de distintos niveles de Ácidos Húmicos (AH) en la |
| letalidad de L. variegatus por Cadmio40 |
| 4.2.2 Influencia de Espermidina en la letalidad de L. variegatus por Cadmio.42 |
| 4.3- Efecto de la presencia de Ácidos Húmicos (AH) en la bioacumulación de |
| Cadmio por L. variegatus43 |
| 4.4- Bioacumulación de Cadmio asociado a distintos sistemas de partículas 44 |
| 4.5- Valores de pH de las soluciones ensayadas 45 |
| 5 – DISCUSIÓN 46 |
| 6 – CONCLUSIONES 53 |
| 7 – RIRI IOGRAFÍA |

NOTAS

- 1.- Las tareas experimentales realizadas para este Trabajo de Tesis fueron apoyadas por subsidios de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT) y de la Agencia Nacional para la Programación Científica y Tecnológica (ANPCyT).
- 2.- Parte de los resultados obtenidos han sido difundidos a través de la siguiente presentación a Congreso:

Reunión de la Sociedad Argentina de Investigaciones y Biología Molecular (SAIB).

17-21 Noviembre, 2003. Ciudad de San Carlos de Bariloche, Río Negro, Argentina.

Comunicaciones en forma de póster. Resumen publicado en Biocell.

An experimental model to prevent Cadmium bioaccumulation by aquatic organisms.

A.G. López, L.A. Miño, N.R. Verrengia Guerrero.

y de un manuscrito enviado para su publicación:

• Toxicity of Cadmium to Lumbriculus variegatus: Influence of Humic Acids.

A.G. López, L.A. Miño, N.R. Verrengia Guerrero.

Journal: Environmental Chemistry.

1- RESUMEN

El objetivo del trabajo fue investigar la utilidad de partículas artificiales para diseñar un modelo experimental que permita estudiar y predecir la biodisponibilidad y bioacumulación del elemento Cadmio en organismos acuáticos. Dado que este modelo carece de materia orgánica, se utilizó como fuente de la misma un producto comercial de Acidos Húmicos. Se realizaron bioensayos estandarizados, en forma aguda (48 horas), utilizando como organismo experimental al oligoqueto de agua dulce Lumbriculus variegatus. Los organismos fueron expuestos a un nivel de 0,1 mg Cd/L, en sistemas conteniendo diversos tipos de partículas artificiales (resinas cromatográficas) y arena, en presencia o ausencia de una solución de Ácidos Húmicos (20 mg/L). Adicionalmente, también se caracterizaron algunos aspectos relacionados con los procesos toxicocinéticos del metal en la especie estudiada. Los resultados mostraron que estos organismos acumularon un nivel de 4,19 ± 0,47 mg Cd /g peso húmedo, cuando fueron expuestos en sistemas conteniendo agua solamente. La mayor incorporación del metal se verificó a través de la fase acuosa soluble, con ligero aumento si ésta contenía material húmico disuelto. La presencia de partículas artificiales, con y sin material húmico, provocó una disminución en la concentración del metal bioacumulado por los organismos, la cual sería consecuencia de la menor biodisponibilidad del Cadmio por resultar adsorbido en el material particulado. Algunas partículas artificiales exhibieron una gran tendencia a retener al elemento, impidiendo prácticamente su bioacumulación en los organismos, y podrían utilizarse en procesos de remediación química, especialmente en ambientes acuáticos contaminados o frente a descargas accidentales del metal.

2- INTRODUCCIÓN

2.1 - Sistemas Acuáticos y Contaminación

2.1.1 - Causas y Consecuencias

Los sistemas acuáticos ocupan el 75% aproximadamente de la superficie del planeta y han sido decisivos para el desarrollo y bienestar de la humanidad. Por ello, desde tiempos prehistóricos, la gran mayoría de los asentamientos se han localizado en las costas de ríos, mares y lagos, los cuales son fuente de alimentos y agua potable, medios de transporte y lugares de recreación. Sin embargo, con el correr de los siglos, estos sistemas han sido afectados gravemente por problemas de contaminación.

Entre las causas directas de contaminación de los sistemas acuáticos podemos mencionar (French, 1991; GESAMP, 1991):

- Explotación excesiva de recursos naturales.
- Actividades portuarias.
- Efluentes industriales con alto contenido de sustancias químicas.
- Efluentes urbanos con alto contenido de materia orgánica biodegradable y de nutrientes.
- Derrames accidentales de petróleo y otras sustancias tóxicas.

Entre las causas indirectas figuran (Eidt et al., 1989):

 Arrastre o volatilización de plaguicidas y herbicidas aplicados en áreas advacentes.

Escurrimiento de suelos por lluvia o aguas residuales.

Percolado vertical a napas subterráneas que transfieren las sustancias a las cuencas.

• Deposiciones húmedas o secas de contaminantes emitidos a la atmósfera.

Las consecuencias de estas actividades alcanzan una gran diversidad de efectos indeseados, entre ellas la degradación de los sistemas naturales, tales como erosión de costas, deterioro de arrecifes de coral, mortalidad masiva de peces o aparición de tumores en organismos acuáticos, crecimiento desmesurado de algas y fitoplancton, disminución de poblaciones y diversidad de especies. (GESAMP, 1991; Bucke, 1993).

Los organismos de las comunidades biológicas acuáticas son especialmente sensibles a la presencia de sustancias químicas contaminantes, pues las especies predominantes tienen ciclos de vida relativamente cortos y ciclos reproductivos muy frecuentes, que fácilmente se ven afectados por las perturbaciones que se verifican en el medio (Ford, 1989; Pratt, 1990).

El grado de contaminación y degradación del medio ambiente, con sus adversas consecuencias sobre los seres vivos, constituye uno de los temas que se debaten con mayor preocupación en diversos niveles de nuestra sociedad. Esto no surge simplemente como un hecho casual, más bien es la respuesta a una larga sucesión de accidentes y a la liberación indiscriminada de sustancias químicas peligrosas, que han provocado en muchos casos situaciones francamente alarmantes, varias de ellas catastróficas.

Algunos autores consideran que en los últimos tiempos, los problemas ambientales más serios se concentran en los países en vías de desarrollo (Shaw y Stroup, 1990a). Diversos reportes parecen confirmar esa aseveración. Ciudades como México, Río de Janeiro, Seúl o Nueva Delhi, encabezan las listas de mayor contaminación atmosférica (Mangla, 1988; Shaw y Stroup, 1990a; Mumme, 1991). Los sistemas acuáticos y terrestres de esos países también soportan una degradación progresiva debido a la explotación excesiva de sus recursos, al empleo indiscriminado de fertilizantes y plaguicidas, muchos de ellos altamente tóxicos, y a las descargas directas de diversos contaminantes (Gómez, 1988; Kabala, 1988; Mangla, 1988; Whelan, 1989; Nriagu, 1992). Estos hechos no implican que las naciones desarrolladas sean simplemente más virtuosas o carezcan de problemas. Tal vez su mayor ventaja consista en haberlos padecido, reconocido y en haber actuado con anterioridad. De hecho, estos países tienen sistemas legales y de control, tanto a nivel público como privado, más efectivos, que actúan con rapidez y en forma sostenida, a la vez que disponen de mayores recursos técnicos, institucionales y económicos (Shaw y Stroup, 1990a y b).

Paulatinamente la situación parece estar cambiando en los países en desarrollo, ya que algunos de ellos están encarando el reconocimiento de sus problemas ambientales, impulsando el desarrollo de programas de monitoreo de diversas sustancias químicas, entre otros estudios científicos. Simultáneamente, se están implementando normativas legales

más estrictas para controlar y regular las emisiones contaminantes (Whelan, 1988; Bojórquez-Tapia, 1989).

Nuestro país no ha sido ajeno, al impacto de la contaminación ambiental. Basta con observar las emisiones y descargas de numerosas industrias, o recordar los frecuentes casos de mortandad de peces en varios de nuestros sistemas acuáticos. La sociedad está atenta a eventos de esta índole y a las decisiones gubernamentales pertinentes.

2.1.2 - El agua potable y la Salud Pública

En la actualidad se considera que el agua es un recurso natural básico cuya calidad se debería proteger tanto por sus implicancias para la salud humana (Briscoe, 1993) como por sus consecuencias ambientales. Numerosas poblaciones, entre ellas la ciudad de Buenos Aires, obtienen el agua de bebida a partir de sistemas acuáticos. Diversas enfermedades pueden ser transmitidas por el crecimiento de microorganismos patógenos o por la presencia de sustancias químicas contaminantes. Diariamente miles de niños mueren de enfermedades prevenibles al beber aguas insalubres. Se calcula que aproximadamente dos tercios de la población de diversas naciones en desarrollo carece de aguas seguras. Esta situación se agrava ya que se estima que menos de un 2% de los residuos cloacales son tratados adecuadamente en América Latina (Viessman, 1990; Briscoe, 1993).

Las enfermedades ocasionadas por la presencia de sustancias químicas en los sistemas acuáticos se deben fundamentalmente a la ingesta de organismos contaminados obtenidos a partir de éstos. En general en estos casos se observan efectos crónicos aunque también se han registrado efectos agudos. A través del conocido fenómeno de bioacumulación, los distintos organismos acuáticos pueden llegar a adquirir niveles de contaminantes varios órdenes de magnitud más elevados que los que se registran en el cuerpo de agua, representando un riesgo para la salud de los consumidores (Rand, 1995). La bioacumulación de sustancias orgánicas tales como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas organoclorados, por citar los más relevantes, ha sido fehacientemente documentada en la literatura, así como también de diversos elementos metálicos (Rand, 1995; Verrengia Guerrero, 1995).

2.1.3 - Subcompartimientos del sistema acuático

Los distintos compartimientos ambientales, acuático, atmosférico y terrestre, constituyen sistemas heterogéneos, en los que a su vez se pueden distinguir varias fases o subcompartimientos en los cuales se distribuyen las sustancias químicas que se liberan al ambiente. En los sistemas acuáticos, quizás los más complejos, se reconocen:

- a) La fase acuosa soluble
- b) Los coloides
- c) El material en suspensión
- d) Los sedimentos del lecho
- e) Las superficies biológicas
- a) La definición de fase acuosa soluble es arbitraria y depende del sistema de fraccionamiento empleado, pero actualmente se acepta la convención de que se trata de la fracción obtenida luego de un proceso de filtración a través de un filtro de membrana de tamaño de poro igual a 0,45 μm (US EPA, 1971; Ashton y Chan, 1987). La distribución de los contaminantes en esta fase depende fundamentalmente de su solubilidad, considerando que en los cuerpos de agua de la naturaleza se presentan condiciones de gran variabilidad en la salinidad, fuerza iónica, pH, temperatura y composición.
- b) En cuanto a los coloides, en aguas naturales, se trata de partículas que derivan de microorganismos muertos y de surfactantes iónicos, como los detergentes. Su tamaño es variable, oscilando entre el micrón y el nanometro y la composición se considera integrada mayoritariamente por polímeros de proteínas y carbohidratos asociados a materiales arcillosos mayormente amorfos y algunos elementos metálicos. Se distinguen del material en suspensión por su tamaño y por un comportamiento característico de su composición (Witkowski et al., 1987). Las partículas coloidales se caracterizan por presentar una fase interior no polar, compuesta por hidrocarburos; una fase exterior iónica y una región de polaridad intermedia (Valsaraj y Thibodeaux, 1989). La importancia del material coloidal

reside en su capacidad para solubilizar contaminantes no polares o hidrofóbicos, que de otro modo serían poco solubles en el sistema acuoso, y que son disueltos en la fase interior del coloide. También puede ocurrir adsorción sobre la fase iónica externa u oclusión en la fase intermedia. Las especies iónicas de los metales pueden interaccionar con la fase externa (Pakalns y Farrar, 1977; Frenet, 1981). Los coloides permanecen distribuídos en la Fase Acuosa cuando ésta se separa por filtración por membrana de poro 0,45 µm, por lo que al analizar la concentración de un contaminante, se puede sobreestimar su valor en la fracción soluble de la muestra (Booij, 1993).

En sistemas acuáticos de alta salinidad, como estuarios o ambientes marinos, las partículas coloidales pueden precipitar debido a su alta carga superficial y la fuerza iónica del medio, depositándose en los sedimentos del lecho (Means y Wijayaratne, 1982).

c) y d) Sedimentos del lecho y material en suspensión:

Conceptualmente, el término sedimento describe una mezcla heterogénea de partículas disímiles. Estas partículas pueden ser transportadas por el cuerpo de agua (material particulado o en suspensión) o bien depositarse en los lechos. Por ello, algunos autores incluyen bajo el nombre de sedimentos tanto al material en suspensión como al que se deposita en los lechos, ya que las partículas en uno y otro caso tienen una composición básica similar (Bradford 1988; Förstner 1990). Sin embargo, en ocasiones es necesario limitar el término de sedimentos para caracterizar al material depositado en los lechos, por cuanto éste se distingue del material en suspensión durante los procesos de transformación y transporte.

e) En lo que respecta a las superficies biológicas, debemos mencionar que recién en los últimos años se tomó conocimiento de que las especies metálicas solubles y otros contaminantes pueden interaccionar con diversas superficies de los organismos acuáticos, sin que necesariamente se produzca la incorporación propiamente dicha. Estas interacciones pueden verificarse a través de las paredes celulares de algas, de microorganismos como bacterias y hongos y de membranas branquiales en organismos superiores (Mullen et al., 1989; Handy y Eddy, 1990; Simkiss, 1990; Brezonik et al., 1991; Mahan y Holcombe, 1992). Para la mayoría de los elementos metálicos, las evidencias hasta el presente sugieren que las interacciones transcurren a través de un mecanismo de

intercambio iónico (Brezonik et al., 1991; Mahan y Holcombe, 1992). Se ha demostrado en algunos casos, que intervendrían grupos carboxílicos o uniones a través de átomos de azufre o nitrógeno, dependiendo del metal en cuestión. En algunos casos podrían intervenir uniones covalente. (Mahan y Holcombe, 1992). Por lo tanto, está reconocida la importancia de las superficies biológicas en la distribución de una parte de los elementos metálicos en sistemas acuáticos y el esclarecimiento de estos fenómenos de superficie permitirá comprender no sólo los procesos de distribución de los metales en sistemas acuáticos sino también los mecanismos de toxicidad y acumulación de metales en la biota (Simkiss, 1990).

2.2 - Contaminantes metálicos y su relación con los seres vivos

Entre todos los materiales dispuestos en el planeta, incluyendo aquéllos de origen sintético, los metales sobresalen en múltiples aspectos, ocupando un lugar esencial e irremplazable. No en vano la mayor parte de los elementos de la tabla periódica son metálicos.

Es indudable que el descubrimiento del fuego, aunado con la capacidad para extraer y fundir los metales constituyeron dos poderosos pilares para el crecimiento y desarrollo de la humanidad. Primero, para el hombre primitivo y así sucesivamente hasta nuestros días. Con metales se construyeron y todavía se construyen en muchos casos, monedas, herramientas, obras de arte, artículos de joyería, imprentas, múltiples y variados utensilios domésticos, productos medicinales, diversos biocidas, edificios, puentes, vehículos de transporte (desde rudimentarios carruajes hasta naves espaciales).

Ahora bien, una de las características más relevantes que presentan los elementos metálicos es que resultan "inmutables", ya que no pueden ser creados ni destruidos. Por ello, una vez que son extraídos a partir de sus fuentes naturales, la cantidad total de elementos permanece siempre constante, aun cuando pueden sufrir cambios en cuanto a su especiación química mediante procesos biogénicos o antropogénicos (Waldichuk, 1974; Goyer, 1991). De este modo, con el constante aumento de su extracción para su empleo en los múltiples propósitos anteriormente mencionados, se incrementa en forma continua la

cantidad de metales disponibles en el ambiente. Por consiguiente, estos elementos frecuentemente están asociados con efectos tóxicos y con problemas de contaminación, resultando una de las sustancias químicas con mayor interés en Ecotoxicología.

La contaminación ambiental por metales trazas no es por cierto un fenómeno reciente y reconoce tanto fuentes naturales como de origen antropogénico, aunque éstas últimas han llegado a superar ampliamente a las primeras (Nriagu, 1990).

Hombres como Xenofón (430 – 355 a.C.) y Lucrecio (98-55 a.C.) documentaron emisiones nocivas de las minas de metales preciosos. Vitrivious (siglo I a.C.) habló de contaminación de las aguas y Plinio el Viejo (23 – 79 d.C.) observó que las emisiones de las fundiciones eran peligrosas para algunos animales (Nriagu, 1990), bastante tiempo antes que los términos de Ecotoxicología, medio ambiente o contaminación encabezaran las primeras planas de los diarios.

Un poco más cerca en la historia, durante el siglo XVI, se introducen los grandes equipos de fundición con los cuales la industria metalúrgica aumentó considerablemente su magnitud, importancia y desarrollo. Para fines del siglo XVII, con la revolución industrial, las emisiones de elementos metálicos liberados por industrias situadas en Gran Bretaña y Europa Central habían llegado a la Península de Escandinavia. La presencia de plomo en hielos de Groenlandia se calcula que data de fines del siglo XVIII (Nriagu, 1990).

La situación ha llegado a tal punto que desde hace algunos años se considera que el impacto ambiental de diversos elementos metálicos ha adquirido características globales (Nriagu, 1990; Hileman, 1992).

En base a numerosos trabajos se han podido establecer algunas estimaciones las cuales, si bien no son rigurosas, resultan altamente ilustrativas. En la Tabla 1 se detallan las principales fuentes naturales y cantidades de algunos elementos que se emiten a la atmósfera, según la recopilación de Nriagu y Pacina (1988). La actividad volcánica representa la mayor fuente natural de **Cadmio**, incluyendo la que se verifica en las profundidades de los océanos. Así, en suelos volcánicos se han registrado niveles de hasta 4,5 ppm del elemento, considerablemente mayores que el valor promedio de 0,4 ppm determinado para suelos no volcánicos (Menzer, 1991; WHO, 1992). Las partículas de suelos y polvos susceptibles de dispersarse por la acción de los vientos dan cuenta de la

principal emisión natural de Cobalto. En cambio, ambas fuentes contribuyen de forma similar en la emisión de elementos como Cromo, Cobre, Níquel, Plomo y Zinc.

Tabla 1. Emisiones atmosféricas a nivel mundial de elementos metálicos a partir de fuentes naturales (miles de toneladas por año)

| Metal | Partículas de suelo arrastradas por vientos | Spray marino | Volcanes | Incendio de bosques | Fuentes biogénicas | Total redondeado |
|---------|--|-----------------|----------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| Cadmio | 0,21 | 0,06 | 0,82 | 0,11 | 0,24 | 1,4 |
| Cobalto | 4,1 | 0,07 | 0,96 | 0,31 | 0,66 | 6,1 |
| Cobre | 8,0 | 3,6 | 9,4 | 3,8 | 3,3 | 28 |
| Cromo | 27 | 0,07 | 15 | 0,09 | 1,1 | 43 |
| Níquel | 11 | 1,3 | 14 | 2,3 | 0,73 | 29 |
| Plomo | 3,9 | 1,4 | 3,3 | 1,9 | 1,7 | 12 |
| Zinc | 19 | 0,44 | 9,6 | 7,6 | 8,1 | 45 |

Referencia: Nriagu y Pacina, 1988.

En la Tabla 2 se transcriben las estimaciones de las emisiones atmosféricas de elementos metálicos a partir de fuentes antropogénicas (Nriagu y Pacina, 1988). La actividad industrial, con sus diversos procesos contribuye en forma significativa a la emisión de los metales Cadmio, Cobre, Cromo y Zinc. Para Níquel, la fuente más relevante proviene de la combustión de combustibles fósiles para generar energía. Para la época del relevamiento, la mayor parte del Plomo provenía del empleo de naftas conteniendo derivados alquilados del metal, usados como antidetonantes.

Tabla 2. Emisiones atmosféricas a nivel mundial de elementos metálicos a partir de fuentes antropogénicas (miles de toneladas por año)

| Metal | Producción de energía | Minería | Motalurgia | Procesos de manufactura | *Usos comerciales | Incineración de residuos | Transporte | Total |
|-------|--------------------------|---------|------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|------------|-------|
| Cd | 0,79 | | 5,43 | 0,60 | - | 0,75 | - | 7,6 |
| Cu | 8,04 | 0,42 | 23,2 | 2,01 | - | 1,58 | - | 35 |
| Cr | 12,7 | | | 17,0 | - | 0,84 | - | 31 |
| Ni | 42,0 | 0,80 | 3,99 | 4,47 | - | 0,35 | - | 52 |
| Pb | 12,7 | 2,55 | 46,5 | 15,7 | 4,50 | 2,37 | 248 | 332 |
| Zn | 16,8 | 0,46 | 72,0 | 33,4 | 3,25 | 5,90 | - | 132 |

(*) Incluye usos agrícolas

Algunos elementos, como por ejemplo el Cadmio, Mercurio, Níquel, Oro, Platino y Plomo, tienen una gran importancia industrial y económica, pero carecen de función biológica conocida y en general presentan alta toxicidad (Beliles, 1975).

En cambio, el rol esencial que desempeñan otros metales, como el Cobalto, Cobre, Hierro, Manganeso, Molibdeno, Selenio y Zinc, ya sea como macronutrientes o elementos trazas, ha sido ampliamente reconocido (Beeby, 1991; Goyer, 1991). Prácticamente un tercio de las enzimas conocidas requieren de la presencia de iones metálicos para poder desempeñar correctamente sus funciones fisiológicas (Simkiss, 1979). Las metaloenzimas participan de una amplia gama de funciones vitales para la célula, como lo son el transporte de gases (casos de la hemoglobina y hemocianina), la respiración celular (a través de los citocromos), y el metabolismo energético, efectuando la transferencia de electrones (Simkiss, 1979). Por consiguiente, los organismos debieron desarrollar a lo largo de la evolución, mecanismos espécializados para controlar el ingreso y la regulación de esos elementos. La regulación queda garantizada, dentro de ciertos límites, mediante un balance entre los niveles de reserva y los destinados a la excreción. Algunos organismos han desarrollado sistemas efectivos que les permiten remover el exceso de metales, especialmente de los sitios más sensibles. Estos mecanismos les aseguran un mayor bienestar cuando los organismos quedan expuestos a niveles de concentración anormalmente elevados, que de otro modo desencadenarían efectos adversos. Idealmente, estos sistemas deberían ser capaces de diferenciar entre los elementos esenciales y aquellos que, aún en niveles mínimos, pueden ser tóxicos. Lamentablemente, en la práctica, no resultan ser lo suficientemente selectivos como para impedir que, bajo ciertas condiciones, los metales no esenciales se incorporen a través de las mismas vías de ingreso disponibles para la incorporación de elementos esenciales (Simkiss, 1979; Beeby, 1991). Estas interacciones son consecuencia de ciertas analogías químicas existentes entre ambos tipos de elementos, especialmente en relación con su capacidad para formar complejos de coordinación que promueven el ingreso, intervienen en la distribución, almacenamiento y/o excreción de los metales en los distintos tejidos del organismo (Beeby, 1991). Las analogías químicas dependen de la posición de los elementos en la Tabla Periódica. Así,

mientras la mayoría de los elementos esenciales se ubican en el 4º Período, los metales tóxicos de ocurrencia más frecuente se encuentran en el período 5º, los más hidrosolubles, y en el período 6º los más insolubles y a la vez los que resultan potencialmente más nocivos para los organismos (Beeby, 1991).

En resumen, la liberación y destino de elementos metálicos, especialmente los denominados "metales pesados", tiene considerable interés en sistemas acuáticos, pues se los considera contaminantes relevantes. Una serie de características justifica esta aseveración (GESAMP, 1991):

- se trata de sustancias persistentes.
- son capaces de inducir una amplia gama de efectos tóxicos.
- poseen un alto potencial de acumulación en las distintas poblaciones de la comunidad.

2.2.1. -Algunos aspectos tóxicos del Cadmio

El Cadmio es un elemento relativamente raro en la corteza terrestre. Se presenta generalmente asociado con minerales de Zinc y Plomo y es un subproducto de la minería y de la fundición de estos metales, que son fuentes importantes de contaminación ambiental. También pueden encontrarse trazas en el carbón mineral y el petróleo. La mayor parte del Cadmio utilizado se obtiene a partir de los minerales de Zinc.

El Cadmio se utiliza principalmente en electrorrecubrimiento o galvanización debido a que es altamente resistente a la corrosión, y las industrias que más lo emplean son las de autopartes, aviación, electrónica, de equipamiento marítimo y maquinaria industrial. También se usa como pigmento de color para pinturas y plásticos, y como material de cátodo para baterías de níquel-cadmio, en soldadura, en joyería, en elaboración de lámparas fluorescentes, semiconductores, y fabricación de fungicidas e insecticidas (Key et al., 1977)

Exposición a Cadmio: existen datos de países desarrollados que permiten estimar que la ingesta total diaria a partir de los alimentos, el agua y el aire es entre 10 y 40 µg por día. En las plantas, la captación es a partir del suelo, que lo recibe por precipitación desde el

aire; irrigación de agua contaminada, y fertilizantes. En el aire, el elemento es captado por los organismos en la respiración. El humo de cigarrillos es una importante fuente no ocupacional de Cadmio respirable: 1 cigarrillo aporta $0.1 - 0.2 \mu g$ inhalados siendo el nivel medio de Cadmio en sangre para sujetos no expuestos ocupacionalmente y no fumadores, variable entre $0.05 \text{ y } 0.50 \mu g$ /dl de sangre (Task Group, EHP, 1978).

<u>Toxicocinética</u>: la absorción en el tracto gastrointestinal es menor que en el sistema respiratorio. En general, la absorción gastrointestinal aumenta cuando la dieta es pobre en Calcio, Hierro y/o en proteínas, pero disminuye en presencia de Zinc.

El Cadmio es transportado en sangre por medio de los glóbulos rojos o por unión a proteínas plasmáticas de alto peso molecular, en particular la albúmina. Una fracción del Cadmio en sangre puede transportarse por medio de la metalotioneína. La acumulación se verifica principalmente en el hígado y en los riñones (50 a 75% de la carga corporal) (Fleischer et al., 1974) La vida media en el organismo se estima que es de alrededor de 30 años. El elemento es capaz de atravesar la barrera placentaria y llegar al feto de la madre expuesta, pero se acumula poco en leche (Nordberg et al., 1979).

Toxicidad:

- Aguda: puede ocurrir por ingestión de bebidas o alimentos muy contaminados, o por inhalación de humos que lo contienen. En este último caso se puede producir neumonitis aguda y edema de pulmón de origen químico.
- <u>Crónica</u>: por exposición a bajas concentraciones del elemento en tiempos prolongados. Puede conducir a enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfisema, así como a enfermedad crónica de los túbulos renales. También pueden afectarse los sistemas cardiovascular y esquelético.

La toxicidad renal se manifiesta por aumento del Cadmio en orina, proteinuria, aminoaciduria, glucosuria y disminución en la reabsorción de fosfato de los túbulos renales.

La acumulación de Cadmio en los riñones sin que se observe efecto tóxico es debida a la formación de un complejo con las metalotioneínas. Las metalotioneínas son proteínas termoestables, de bajo peso molecular (aproximadamente 6500) que se caracterizan por tener alrededor del 30% del aminoácido cisteína, y ausencia de aminoácidos aromáticos. La unión al metal es por puentes con los grupos tioles libres. Las metalotioneínas se encuentran presentes en casi todos los órganos. Sin embargo se encuentra una mayor concentración en el hígado, en particular luego de exposición reciente, y en los riñones, donde se acumulan en proporción a la cantidad de Cadmio. Se considera que el Cadmio unido a las metalotioneínas dentro de los tejidos no es tóxico, salvo cuando las concentraciones exceden el nivel crítico, en que se hacen tóxicas.

En casos clínicos de enfermedad ocupacional, se demostró que la glomerulopatía es progresiva e irreversible.

La toxicidad ósea se debe a que el Cadmio afecta al metabolismo del Calcio. En casos de neuropatía grave, puede haber cálculos renales y excreción excesiva de Calcio en orina, pero en casos crónicos se verifica una disminución de Calcio urinario. La pérdida de Calcio probablemente ocasiona los siguientes cambios en el esqueleto: osteomalacia, osteoporosis, dolor de huesos. La enfermedad Itai-Itai, caracterizada por deformidades óseas graves y neuropatía crónica, se encontró en mujeres de Japón antes y durante la Segunda Guerra Mundial. Se considera que deficiencias nutricionales y de vitamina D contribuyen a la toxicidad del Cadmio. (Shigematsu et al., 1979).

Carcinogenicidad: estudios epidemiológicos demostraron relación entre exposición ocupacional respiratoria y cáncer de pulmón y de próstata (Kjellstrom et al., 1979).

Indicadores biológicos: En personas de la población general hay excreción urinaria de Cadmio pequeña y constante, en su mayor parte unido a metalotioneína. Ante una exposición excesiva, puede no haber aumento en orina hasta que todos los sitios de unión disponibles estén saturados. Se considera que el aumento del metal en orina refleja exposición reciente y acumulación de Cadmio en los riñones. La medición de metalotioneínas en orina proporciona la misma información toxicológica que la medición de Cadmio, pero no plantea posibles problemas de contaminación externa. Para ello, se utilizan técnicas de radioinmunoensayo (Vandermallie et al., 1979; Garvey, 1984).

Tratamiento: El único tratamiento eficaz es la eliminación de la fuente de exposición. Como medida terapeútica básica, se suministra Zinc, Cobalto o Selenio en la dieta, a fin de favorecer la inducción de metalotioneínas y quelar al Cadmio libre, evitando así que interactúe con otras enzimas sulfhidrílicas, desencadenando efectos tóxicos.

2.3- Especiación y Biodisponibilidad de elementos metálicos

En sistemas acuáticos naturales, los elementos metálicos pueden presentarse bajo una amplia gama de formas químicas, según se detalla a continuación (Brezonik et al., 1991):

- Especies iónicas libres, generalmente hidratadas, en uno o varios estados de oxidación.
- Formando complejos con ligandos de naturaleza inorgánica.
- Formando complejos con ligandos de naturaleza orgánica.
- Adsorbidos sobre superficies de coloides, material en suspensión y/o sedimentos del lecho.
- Adsorbidos o absorbidos por la biota.

Las concentraciones de las distintas formas físico-químicas en que puede presentarse el metal en los sistemas acuáticos, o sea su <u>especiación</u>, dependen de las condiciones ambientales del sistema. Las especies estarán sujetas a un mayor o menor proceso de transporte, según se distribuyan en la fase acuosa o se asocien a los sedimentos del lecho. Los ligandos presentes en el medio, pueden favorecer la solubilización o, por el contrario, la precipitación de los metales. Todos los procesos mencionados condicionan el destino de los contaminantes metálicos en el sistema acuático (Brezonik et al., 1991; Florence et al., 1992).

Por otra parte, las especies químicas exhiben toxicidades muy diferentes en los organismos vivos, tal como se ejemplifica con el caso de las especies iónicas Cr III que son esenciales, mientras que la especie Cr VI es altamente tóxica (Goyer, 1991).

En Ecotoxicología, se denominan especies <u>biodisponibles</u> a aquellas que pueden ser incorporadas por la biota y producir eventualmente efectos nocivos.

Se considera que únicamente una proporción muy pequeña de los elementos metálicos se encuentra en la llamada fase acuosa soluble, generalmente como iones libres hidratados. Esta proporción puede aumentar frente a un incremento en la acidez del sistema o por interacciones con ligandos que conduzcan a la formación de complejos solubles. La mayor proporción está asociada a los sedimentos del lecho o al material en suspensión y una proporción intermedia se encuentra complejada con sustancias de origen natural o antropogénico (Marcus y Scout, 1990; Brezonik et al., 1991; Florence et al., 1992). Los principales **ligandos** capaces de reaccionar con los metales en los cuerpos de agua, propios del medio u originados en descargas, son (Neubecker y Allen, 1983; Florence et al., 1992):

- De naturaleza inorgánica: Cl⁻, HCO₃⁻, CO₃²-, F⁻, NO₃⁻, NH₃, NH₄⁺, OH⁻, PO₄³-, SO₄²-, SH⁻, S²-, CN⁻
- De naturaleza orgánica: sustancias húmicas, compuestos nitrogenados de origen proteico, compuestos sintéticos como el ácido nitriloacético (NTA) o el ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

Los Ácidos Húmicos constituyen entre el 50 y el 80% del contenido total de carbono orgánico disuelto en la fase acuosa (Abbt-Brown et al., 1989) y por ello se describrirán con mayor detalle en la próxima sección.

En el caso del Cadmio, las especies solubles en sistemas de aguas dulces se limitan al catión Cd²⁺ y a pequeñas cantidades de CdSO₄ y CdCl₂ o complejos con sustancias húmicas. A medida que la salinidad aumenta, la proporción de complejos con iones Cl⁻ también aumenta, a expensas de la disminución de iones libres. Las especies de fórmula general CdCl_x^(2-x) predominarán, en forma casi exclusiva, en los ambientes marinos típicos (GESAMP, 1984; Bewers, 1987).

Según diversos autores, se considera que las formas iónicas libres, en primer término, y los complejos inorgánicos, en segundo lugar, exhiben una mejor y más rápida biodisponibilidad. En cambio, los elementos complejados con sustancias orgánicas, de origen natural o sintético, no estarían rápida ni directamente disponibles para los organismos acuáticos (Brezonik et al., 1991). Para el Cadmio se realizaron diversas experiencias de laboratorio a fin de investigar su incorporación y toxicidad en diversas especies acuáticas, como fitoplancton, bacterias, algas, bivalvos y crustáceos. En estos

estudios se comprobó que la bioacumulación y los efectos tóxicos eran mayores cuando el elemento se presentaba como especies iónicas libres (Sunda y Lewis, 1978; Sunda y Gillispie, 1979; Jenkins y Sanders, 1986; Sunda et al., 1987).

2.3.1. - Sustancias húmicas

Las sustancias húmicas se producen como consecuencia de la descomposición de tejidos biológicos, especialmente vegetales, en ambientes terrestres y acuáticos (Ogner y Schnitzer, 1970; Josephson, 1982; Mizuike, 1987).

Los materiales orgánicos originales en los suelos son hidratos de carbono, proteínas y aminoácidos, grasas, aceites, resinas, alcoholes, ácidos y aldehídos, fenoles, taninos, lignina, enzimas y hormonas. El 60-80% de estas sustancias se descomponen por acción microbiana en alrededor de seis meses para formar el HUMUS o sustancias húmicas

Se define al Humus como el residuo resistente a la degradación, de origen vegetal, mayormente constituído por Carbono, Hidrógeno y Oxígeno. Es el componente orgánico más abundante, que mejora las propiedades físicas del suelo, intercambia nutrientes y constituye la reserva del Nitrógeno fijado.

El proceso de formación de las sustancias húmicas es complejo. Básicamente se trata de la degradación de lignina, de aparición de proteínas y fenoles por síntesis microbiana, otros fenoles de plantas y degradación de hidratos de carbono. Los principales grupos funcionales del material húmico son los siguientes:

```
-COOH
```

-R-OH

>C=O

-OCH3

-Ph-OH

-R-CH-NH-CO-NH-CRH-CO (N de heterociclo)

-NH2

-SO3H

La lignina es el precursor fundamental al aportar fenoles aromáticos. Las proteínas al degradarse aportan Nitrógeno. La relación N/C pasa de 1/100 en la biomasa de plantas frescas a 1/10 luego de la humificación (C orgánico → CO2 + Energía).

Dentro de este material pueden distinguirse tres fracciones, en base a su solubilidad en medio ácido o básico y a su peso molecular (Benson y Long, 1991):

- Ácidos Fúlvicos: solubles tanto en medio ácido como básico.
- Ácidos Húmicos, propiamente dichos: solubles en medio básico, insolubles en medio ácido, intercambian especies con el agua.
- Ácidos Húminos: insolubles en medio ácido o básico, se hallan solamente en suelos y sedimentos.

La estructura química de las sustancias húmicas no está aún totalmente caracterizada. El peso molecular puede oscilar entre 300 y 300.000 Da aproximadamente. Son macromoléculas polielectrolíticas. En general se los describe como polímeros aromáticos, con características ácidas e hidrofílicas, muy polares por la presencia de grupos carboxílicos, e hidroxilos fenólicos y/o alcohólicos (Josephson, 1982; Mizuike, 1987; Abbt-Braun et al., 1989). Estudios más recientes mostraron que en el núcleo predominan bencenos y alquilbencenos de cadenas lineales de entre 1 y 13 átomos de carbono (Schulten y Plage, 1991). Según la procedencia del material, hay gran variabilidad y se ha propuesto una estructura general como la que se muestra en la Figura 1.

El valor promedio de concentración en aguas naturales se considera que es de 1 a 6 mg/L (Benson y Long, 1991), pero en sistemas de pantanos o ciénagas ("aguas negras") puede alcanzar niveles de 50 a 70 mg/L.

Las sustancias húmicas pueden reaccionar con una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos. Entre los primeros, hay documentadas reacciones con compuestos hidrófobos, alcanos, ácidos grasos, dialquil-ftalatos o ésteres; plaguicidas como el DDT, organofosforados y carbamatos; hidrocarburos aromáticos policíclicos; bifenilos policlorados, etc. Entre los inorgánicos, se conocen reacciones con metales, con grupos nitrato, fosfato, silicato y sulfato, entre otros. Los complejos resultantes pueden presentar propiedades diferentes a las de las sustancias libres, por lo tanto sus efectos tóxicos también

pueden modificarse. Frente a algunos contaminantes se vieron tanto efectos de sinergismo como de antagonismo, dependiendo del tóxico, de la concentración y la fuente de material húmico (Stackhouse y Benson, 1988; Benson y Long, 1991; Steinberg, 1992; Lee et al., 1993).

Figura 1. Estructura química propuesta para las sustancias húmicas

(Según Schulten y Plage, 1991)

2.3.2. Interacciones con partículas de sedimentos

Ya anteriormente hemos señalado que la mayor proporción de los elementos metálicos presentes en sistemas acuáticos se encuentra asociada a los sedimentos. Por ello, es importante destacar que los contaminantes asociados a las partículas de sedimentos y del material en suspensión también pueden incorporarse a la biota, ya sea por contacto directo o por ingestión intencional o accidental durante el proceso de alimentación. Por consiguiente el concepto de biodisponibilidad se aplica igualmente para designar a la fracción de un contaminante asociado al sedimento, material en suspensión o presente en el agua de poro, que es susceptible de ser incorporado por los organismos. (Luoma, 1988; Landrum y Robbins, 1990; Marcus y Scott, 1990; Luoma y Carter, 1991).

En cuanto a la composición de las partículas de sedimentos, se puede distinguir una matriz, de origen mineral o biológico, sobre la cual se asocian diversos compuestos de naturaleza inorgánica u orgánica, que las recubren y pueden actuar como sustratos frente a las diversas sustancias químicas presentes en el sistema acuático.

Entre los compuestos inorgánicos más relevantes pueden citarse: arcillas minerales, cuarzo, feldespato, silicatos de aluminio amorfos, carbonatos, óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso (Bradford 1988; Lai 1988; Förstner 1990).

Los Ácidos Húmicos figuran entre los compuestos orgánicos más representativos (Rand 1995).

Las propiedades físico-químicas de las partículas de sedimentos quedan determinadas fundamentalmente por las características mineralógicas y químicas de los diversos componentes. Dichas propiedades condicionan, a su vez, los diversos procesos de interacción que pueden verificarse frente a la gran variedad de sustancias químicas contaminantes (Lai, 1988), los cuales se detallan a continuación:

- precipitación, coprecipitación o disolución
- oxidación y/o reducción
- adsorción y desorción
- intercambio iónico

- complejación
- crecimiento o inhibición del crecimiento de microorganismos

Se considera que las propiedades físicas de las partículas son las que exhiben mayor influencia en los procesos de adsorción, desorción, intercambio iónico, transporte y deposición. Específicamente entre dichas propiedades pueden considerarse:

- el tamaño de partícula
- su área superficial
- la densidad
- porosidad y carga superficial

De ellas, el tamaño de partícula constituye uno de los parámetros principales que controlan el transporte de los sedimentos, los procesos de adsorción y la transferencia de las sustancias químicas entre la fase acuosa y el material particulado (Lai, 1988; Förstner, 1990).

El tamaño de partícula está a su vez interrelacionado con el área superficial. Dicha propiedad aumenta al disminuir el tamaño de partícula y refleja también, en forma directa, la cantidad de sustratos disponibles para la adsorción de contaminantes (Lai, 1988).

Las superficies de las partículas de sedimentos se encuentran eléctricamente cargadas, como consecuencia de las cargas presentes en los distintos substratos que las recubren. Esta propiedad gobierna en gran medida los procesos de intercambio iónico, adsorción de iones y coagulación de los sedimentos (Lai, 1988).

Numerosas sustancias químicas orgánicas, especialmente aquellas con características hidrofóbicas, al igual que inorgánicas, particularmente elementos metálicos, exhiben una gran tendencia a asociarse con los diversos componentes presentes en las superficies de las partículas de sedimentos y material en suspensión (Bradford, 1988; Farrington, 1989).

Las sustancias orgánicas se asociarán preferentemente a los distintos componentes orgánicos naturales, dependiendo de la concentración y la naturaleza de éstos.

Por su parte, los elementos metálicos lo harán preferentemente a través de los óxidos de hierro y manganeso, los cuales presentan un alto grado de substitución isomórfica. Sin embargo, estos elementos también pueden asociarse con materia orgánica de bajo peso molecular, generalmente de origen biológico, que previamente haya sido adsorbida sobre los sustratos arcillosos o de óxidos metálicos. Se ha sugerido que al menos una parte de dicha materia orgánica, posee grupos carboxílicos o fenólicos disponibles para la unión con los metales (Förstner, 1990).

Esta asociación, que se verifica en casi todos los sistemas acuáticos, da como resultado una elevada concentración de contaminantes sobre las distintas partículas, considerablemente superior a la que se registra en la fase acuosa soluble (Horowitz, 1988). Por consiguiente, la distribución de contaminantes en sedimentos y en el material en suspensión constituye un proceso de fundamental importancia y esta intimamente ligado a las características fisicas, químicas, geológicas e hidrológicas de las cuencas (Bordalo Costa y Peneda, 1989; Marcus, 1989; Pardo et al., 1990). Frente a cambios en las condiciones ambientales, como por ejemplo modificaciones en el pH, la salinidad, el potencial de oxido-reducción, o por la presencia de compuestos quelantes, una proporción variable de los contaminantes inicialmente asociados a los sedimentos puede redisolverse pasando a la fase acuosa soluble o ingresando en la biota. Dicha proporción resulta aun muy dificil de evaluar, ya que depende de la composición básica de las partículas (Horowitz, 1988; Bordalo Costa y Peneda, 1989; Pardo et al., 1990).

De esta manera, los sedimentos y el material en suspensión desempeñan un doble rol dentro del ecosistema acuático (Baudo y Muntau, 1990; Landrum y Robbins, 1990):

- como atrapantes de numerosos tipos de sustancias químicas contaminantes, actuando así como principal depósito de acumulación.
- como fuentes potenciales de liberación de los contaminantes al medio.

Entre las partículas de sedimentos del lecho puede distinguirse también una fase acuosa, que se designa como agua de poro o agua intersticial. Esta fase tiene singular interés porque en ella se encuentran niveles de concentración de contaminantes mucho

mayores que los registrados en la columna de agua circundante. Estos niveles tan elevados surgen de la liberación o desorción de contaminantes a partir de las partículas de sedimentos (Giesy y Hoke, 1990; Landrum y Robbins, 1990).

2.4 - Evaluación de contaminantes en sistemas acuáticos

El impacto ambiental derivado de la presencia de sustancias químicas contaminantes en sistemas acuáticos puede efectuarse mediante monitoreo químico o biológico.

El monitoreo químico consiste en análisis de muestras de aguas y constituye uno de los métodos más usuales para caracterizar los distintos tipos de contaminantes y determinar sus niveles de concentración. Sin embargo, en los últimos años, han surgido serias dudas acerca de su eficacia. Recientemente se ha reportado que cientos de sustancias tóxicas presentes en ríos del Reino Unido pasan inadvertidas para las agencias de control de calidad de aguas (Pearce, 1998). Básicamente, se reconocen dos causas: por un lado, dichos análisis no llegan a abarcar todo el espectro de posibles sustancias tóxicas. No obstante, el problema más importante radica en que la gran mayoría de los contaminantes terminan asociados a las partículas de sedimentos, ya sea del material en suspensión como al depositado en los lechos. En el caso particular de los elementos metálicos, ya se ha mencionado que los niveles de concentración en sedimentos superan ampliamente a los que se registran en la fase acuosa soluble. Se podrían incluir entonces simultáneamente análisis de muestras de sedimentos, y de hecho se han realizado. Sin embargo, debido a la compleja naturaleza de estas interacciones se hace muy dificil evaluar y predecir la biodisponibilidad y potencial bioacumulación de contaminantes asociados a las partículas de sedimentos.

Por otra parte, los programas de monitoreo químico no permiten evaluar la biodisponibilidad y, por ende, la toxicidad de los contaminantes presentes en el medio acuático sobre las comunidades biológicas. Recordemos que en particular los organismos del bentos, pueden incorporar contaminantes no sólo a partir de la fase acuosa soluble, sino también a partir del material particulado. Por consiguiente, se recurre a programas de monitoreo biológico.

Los ensayos orientados a evaluar la toxicidad de los contaminantes asociados a partículas de sedimentos involucran la exposición de un dado organismo a una solución de la sustancia en presencia de dichas partículas en condiciones controladas de laboratorio (ASTM 1995). Durante la década de 1990 se verificó un creciente interés por el desarrollo de criterios de calidad de sedimentos por parte de las Agencias Ambientales de los países desarrollados (US EPA, 1994; ASTM, 1995).

Debido a la complejidad de las partículas naturales, el uso de sedimentos control representa una alternativa de gran utilidad para esclarecer el tipo de posibles interacciones y predecir la biodisponibilidad de contaminantes asociados al material particulado (Ingersoll, 1995). Una gran diversidad de formulaciones fueron propuestas, a partir de diversos tipos de arenas, barros y arcillas, entre otras matrices minerales (Suedel y Rogers, 1994; Taylor y Rodríguez, 1995; Kemble et al., 1999). Además de estos materiales naturales, otros autores han sugerido el uso de partículas artificiales como análogos de sedimentos acuáticos (Simkiss, 1995; Fleming et al., 1998). En particular, se ha recurrido al empleo de resinas usualmente destinadas a cromatografía. Estos materiales comerciales ofrecen varias ventajas, ya que su composición, tamaño de partícula, estructura y grupos funcionales están bien caracterizados y estandarizados por los fabricantes (Davies et al., 1999; Simkiss et al., 2000). Justamente estas propiedades son las que condicionan en mayor medida las interacciones partícula-contaminante. Sin embargo, este modelo experimental puede ser considerado muy simple, por carecer del contenido de materia orgánica normalmente presente en las partículas naturales (Fleming et al., 1998; Kemble et al., 1999). Para superar este inconveniente, se han formulado sedimentos controles que contienen materia orgánica derivada de distintas fuentes, tales como heces bovinas compostadas, turba, hojas vegetales, celulosa o Acidos Húmicos (US EPA, 1994; Kemble et al., 1999). Entre todos estos materiales, los Acidos Húmicos constituyen la fuente natural más importante de materia orgánica en los sedimentos de los sistemas acuáticos (Rand et al., 1995). Por otra parte, estas sustancias se pueden obtener como producto comercial. En virtud de estos antecedentes fue diseñado un modelo experimental que consiste en el empleo de partículas artificiales, específicamente resinas cromatográficas, adicionadas con material húmico, como fuente de materia orgánica. Este modelo ya ha sido utilizado para investigar la biodisponibilidad y bioacumulación de diversos contaminantes orgánicos en una especie de almeja de agua dulce (Verrengia Guerrero et al., 2001; Verrengia Guerrero et al., 2002).

2.5. Objetivos del presente trabajo

Los antecedentes anteriormente descriptos han permitido comprender la importancia de los sedimentos en el destino y en la toxicidad de los contaminantes asociados a partículas de sedimentos. Simultáneamente, se han puesto en evidencia las distintas dificultades que se plantean para investigar las interacciones entre los contaminantes y las partículas naturales, las cuales condicionan su toxicidad.

Por consiguiente, el objetivo general del presente trabajo consistió en el desarrollo de un modelo experimental orientado a esclarecer la biodisponibilidad y potencial bioacumulación del Cadmio, un reconocido contaminante metálico, de relevancia ambiental para nuestro país, según trabajos previos de monitoreo de campo sobre zonas costeras del Río de la Plata (Verrengia Guerrero, 1995). Dicho modelo experimental consistió en el empleo de partículas artificiales, específicamente de ciertas resinas cromatográficas, en presencia o ausencia de material húmico, como análogos de sedimentos naturales.

Para alcanzar este objetivo general, se efectuaron una serie de bioensayos utilizando una especie de oligoqueto de agua dulce, *Lumbriculus variegatus*, como organismo experimental, el cual ha sido reconocido como organismo bioindicador por las Agencias Ambientales de los Estados Unidos (Phipps et al., 1993; ASTM, 1995). Se trata de individuos hermafroditas, de agua dulce, en permanente contacto con los sedimentos superficiales. Por ello resultan sumamente aptos para reflejar el impacto de las descargas más recientes de sustancias químicas contaminantes. En condiciones naturales, *L. variegatus* se caracteriza por la ingestión de partículas de sedimentos a partir de las cuales es capaz de obtener su alimento. El proceso de ingestión de partículas en *L. variegatus* está condicionado a su tamaño y se considera que cuando éste es menor de 100 µm se puede verificar su incorporación.

El trabajo experimental involucró los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de algunos procesos toxicocinéticos del Cadmio en L. variegatus, en particular absorción y eliminación.
- Investigación de la toxicidad, biodisponibilidad y bioacumulación de Cadmio en L. variegatus por efecto de sustancias complejantes, con carga neta negativa (Ácidos Húmicos) o positiva (la poliamina espermidina).
- Investigación de la biodisponibilidad y bioacumulación de Cadmio en *L. variegatus* por efecto de la presencia de distintas partículas (arena pura y resinas cromatográficas) en presencia y en ausencia de material húmico.

Para ello, se realizaron bioensayos agudos, en general de 48 horas, exponiendo a los organismos a distintos niveles de Cadmio, de relevancia ambiental, en condiciones controladas de laboratorio, siguiendo protocolos estandarizados.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - Materiales

La solución patrón de Cadmio para los bioensayos contenía 1000 mg Cd/L y fue preparada a partir de la sal CdCl₂.2H₂O (Merck, Argentina) en agua destilada.

La solución patrón de Cadmio para los análisis por Absorción Atómica contenía 1000 mg Cd/L y fue obtenida como producto comercial certificado (Merck, Argentina). Las diluciones fueron preparadas en solución de ácido nítrico 1%, v/v.

Para todos los bioensayos se usó agua de red, la cual fue declorada por 24 horas y luego filtrada a través de una columna de carbón para eliminar cualquier materia orgánica disuelta. Los siguientes parámetros físico-químicos fueron registrados:

Como fuente de ácidos húmicos (AH) se empleó un producto comercial obtenido de Fluka Chemie AG, Suiza, (producto N° 53680). La composición informada por el fabricante fue:

Las concentraciones de Ácidos Húmicos seleccionadas fueron de 5; 20 y 60 mg AH/L. Dichas soluciones fueron preparadas disolviendo el material húmico en agua de red declorada y filtrada por columna de carbón. Previo a su uso, las soluciones fueron filtradas por papel de filtro para remover cualquier partícula remanente (Verrengia Guerrero et al., 2000). Se considera que un nivel de 6 mg/L es la concentración promedio de Ácidos Húmicos disueltos en cursos de aguas naturales (Benson y Long, 1991). El valor de 20 mg

AH/L, utilizado en los bioensayos conteniendo los distintos tipos de partículas, es más alto que aquél, pero está más relacionado al contenido usual de materia orgánica presente en los sedimentos naturales (Ingersoll, 1995).

La poliamina Espermidina fue obtenida de Sigma Aldrich, USA. Se trata de un policatión alifático cuya fórmula es: H₂N-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH₂.

Previo a su uso, todo el material de vidrio fue prelavado con solución de ácido nítrico 2 - 4% (v/v) en agua destilada, luego enjuagado con abundante agua destilada, y finalmente secado. El ácido nítrico concentrado, de grado pureza analítica, fue obtenido de Merck, Argentina.

3.2 - Partículas seleccionadas

Se utilizó arena marina comercial (Merck), previamente purificada con ácido, y calcinada a 900 °C. De esta manera se asegura que el material tenga un contenido de materia orgánica máximo de 0,05%.

Además, se utilizaron las siguientes resinas:

Dowex 1x 8400, intercambiadora de aniones (Sigma-Aldrich Company). Toyopearl Butyl 650M, resina diseñada para interacciones hidrofóbicas. Toyopearl Phenyl 650M, resina diseñada para interacciones hidrofóbicas. Toyopearl SP 650M, intercambiadora de cationes.

Todas las partículas Toyopearl fueron obtenidas de Fisher, Reino Unido.

La estructura del esqueleto de las partículas Dowex está constituída por un copolímero entrecruzado de estireno y divinilhenceno. Las partículas Toyopearl tienen en su esqueleto la misma estructura de polímeros de etilenglicol y metilmetacrilato. En la Tabla 3 se presentan los grupos funcionales y tamaños de partículas para cada material.

Tabla 3: Algunas características de las partículas utilizadas

| Tipo de partícula | Grupo funcional en el sitio activo | Tamaño de partícula |
|-------------------|---|------------------------|
| Arena | SiO ₂ | 100 - 300 μm |
| Dowex 1x8400 | 0-R'-NR ₃ | 60 μm |
| Toyopearl Phenyl | <u></u> | 40 μm |
| Toyopearl Butyl | O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ | 40 μm |
| Toyopearl SP | O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -SO ₃ | 40 μm |

Aunque algunos de los grupos funcionales presentes en dichas resinas no es probable que se encuentren en las partículas naturales, las partículas artificiales seleccionadas pueden reflejar algunas de las posibles interacciones que ocurren en el ambiente natural, como efectos de carga e interacciones hidrofóbicas. Los tamaños de partículas de las resinas estaban todos en el rango $40-60~\mu m$, asegurando que pueden ser ingeridos por los animales.

3.3 - Organismo seleccionado

Se utilizó una especie de oligoqueto acuático, *Lumbriculus variegatus*, inicialmente obtenido de los cultivos del Prof. K. Simkiss, Universidad de Reading, Reino Unido.

Una vez en el laboratorio, los organismos se cultivaron en peceras plásticas de 12 L, con aireación, y conteniendo trozos de toallas de papel (formando un lecho de 3 - 6 cm) en unos 8 L de agua declorada, Los cultivos se mantenían a una temperatura de 20 ± 2 °C y con un fotoperíodo artificial de 16/8 horas de luz/oscuridad. Los organismos se alimentaban con alimento para peces (TetraFin®, TetraWerke, Alemania) tres veces por semana. Para todos los bioensayos se utilizaron organismos adultos de 2.5 ± 0.5 cm de largo.

3.4 - Estudios Toxicocinéticos

- 1) En primer lugar se realizó un estudio de absorción de Cadmio por los organismos expuestos a distintas concentraciones del metal. Estos estudios tenían como objetivo determinar el tipo de curva dosis-respuesta en el entorno de la concentración de 0,1 ppm. Para ello, se realizaron bioensayos en agua declorada, sin partículas, exponiendo a los organismos a las siguientes concentraciones del metal: 0,025; 0,050; 0,100; 0,200; 0,300 y 0,500 mg Cd/L. Se utilizaron viales de 25 mL de capacidad, conteniendo 20,0 ml de cada solución de Cadmio y aproximadamente 10 organismos. Los ensayos tuvieron una duración de 48 horas de exposición al metal, y se realizaron en condiciones estáticas, sin aireación y sin alimentación, a una temperatura de 20 ± 2 °C. Al término de los bioensayos, los animales fueron transferidos a otros viales conteniendo 20,0 ml de agua declorada durante un período de depuración de 6 horas. Seguidamente, se determinaron los niveles de bioacumulación de Cadmio resultante. Por cada sistema se efectuaron 5 replicados como mínimo.
- 2) Posteriormente se realizó un estudio de eliminación de Cadmio por parte de los organismos, con el objeto de seleccionar el tiempo óptimo que asegurara la depuración del tracto intestinal sin que a la vez se verificara un importante proceso de eliminación, que condujera a una subestimación de los niveles de bioacumulación. Para estos estudios, diversas series de organismos fueron expuestos a un nivel de 0,1 mg Cd/L por 48 hs. Al término de estos tratamientos, una serie de organismos fue destinada al análisis de metal bioacumulado (t = 0). Las otras series se transfirieron a agua declorada por los siguientes

períodos: 6, 24 y 48 horas y luego se procedió al análisis de Cadmio acumulado. Las condiciones generales de los bioensayos fueron las mismas que descriptas en el punto 1).

3.5 - Estudios de letalidad

Aproximadamente 10 organismos se colocaron en viales de 25 mL de capacidad, conteniendo 20,0 mL de soluciones de Cadmio, con los siguientes niveles de concentración: 0,7; 1,0 y 1,3 mg Cd/L. Los viales se expusieron por diversos períodos: 48, 72 y 96 horas, registrando el número de organismos muertos. Los organismos fueron considerados muertos cuando presentaban nula movilidad y una intensa decoloración y/o fragmentación. Los ensayos se realizaron a distintos niveles de Ácidos Húmicos (AH), a saber: 0; 5; 20 y 60 mg AH/L. También se investigó el efecto sobre la letalidad de una solución 70 mg/L de la poliamina Espermidina. Estos estudios se efectuaron por triplicado, en condiciones estáticas, a una temperatura de 20 ± 2 °C, sin aireación y sin suministrar alimento.

3.6 - Bioensayos de acumulación

Se utilizaron viales de 25 mL de capacidad, conteniendo 20,0 ml de una solución de 0,1 mg Cd/L y aproximadamente 10 organismos. Los ensayos tuvieron una duración de 48 horas de exposición al metal, y se realizaron en condiciones estáticas, sin aireación y sin alimentación, a una temperatura de 20 ± 2 °C. Por cada sistema se efectuaron 8 replicados como mínimo.

En primer lugar, se efectuaron bioensayos para determinar la bioacumulación de Cadmio por L. variegatus, en organismos expuestos al metal en presencia de diversas soluciones conteniendo 0; 5; 20 y 60 mg AH/L, sin ningún tipo de partículas.

Se ensayaron luego las siguientes combinaciones de partículas, en presencia o ausencia de una solución de 20 mg/L de Ácidos Húmicos:

- arena sola 2,0 g
- resina Dowex 0,5g + arena 1,5 g
- resina Toyopearl Butyl 0,5g + arena 1,5 g

- resina Toyopearl Phenyl 0,5 g + arena 1,5 g
- resina Toyopearl SP 0,5 g + arena 1,5 g

Simultáneamente se realizaron bioensayos utilizaron organismos expuestos al metal en ausencia de partículas (sistemas de agua sola).

Luego los animales fueron transferidos a otros viales conteniendo 20,0 ml de agua declorada durante un período de 6 hs para realizar su depuración.

No se registró mortalidad en ninguna de estas exposiciones.

3.7 - Análisis de Cadmio

Al finalizar el proceso de depuración los organismos se transfirieron con pipetas plásticas a vidrios de reloj, enfriados a 0 °C para anestesiarlos. Los organismos se secaron suavemente con papel de filtro y se pesaron, para luego ser colocados en tubos de borosilocato, graduados, de 10 ml, a los cuales se adicionaron unos 0,5 - 1 ml de ácido nítrico concentrado. La digestión de la materia orgánica se efectuó por calentamiento de los tubos en baño de agua a 100 °C por 4 - 6 horas. Cada 10 tubos como mínimo se realizó simultáneamente un blanco de reactivos. Una vez finalizado este proceso de digestión, los tubos se diluyeron con ácido nítrico al 1% (v/v) hasta un volumen final de 3,5 - 5 mL.

A continuación se determinó el Cadmio acumulado en los organismos por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, Modelo AA545), mediante la directa atomización de las soluciones en una llama de aire-acetileno, operando a $\lambda=228,8$ nm y con una lámpara de Deuterio para corregir el ruido de fondo. La cuantificación se obtuvo a partir de una curva de calibración realizada con la solución patrón de Cadmio. Los valores blanco fueron despreciables. Los valores de Cadmio determinados en los tejidos de los organismos control estuvieron por debajo de 0,2 μ g/g.

Los resultados de bioacumulación se expresaron en µg de Cadmio por gramo de peso húmedo de organismos.

3.8 - Análisis estadístico

Los análisis de correlación y regresión se realizaron utilizando el programa Excel® (Microsoft, USA).

La letalidad se estimó a través del parámetro de concentración letal para el 50 % de los organismos (CL₅₀), o sea el nivel de concentración de Cadmio que producía mortalidad en el 50% de la población. Los valores fueron calculados utilizando el Programa de Análisis Probit de US EPA.

Los datos fueron evaluados estadísticamente aplicando análisis de varianza (ANOVA) para estudiar las diferencias entre tratamientos (Sokal and Rohlf, 1997). Los análisis poblacionales de muestras fueron realizados comparando los niveles de Cadmio en organismos mantenidos en sistemas con agua sola y con los diferentes tipos de partículas, con y sin Ácidos Húmicos. Para investigar las diferencias entre los tratamientos se usó el método de Scheffé (Sokal and Rohlf, 1997). Todos los resultados fueron considerados significativos al nivel p < 0,05.

4 - RESULTADOS

4.1. - Estudios toxicocinéticos

4.1.1.- Estudios de absorción y acumulación

En la Figura 2 se presentan los niveles de Cadmio acumulados por L.variegatus frente a distintos niveles de exposición durante 48 hs., en sistemas de agua declorada, sin partículas, y con 6 hs. de depuración. Los datos presentaron una correlación altamente significativa, con un coeficiente de correlación $r^2 = 0,9972$. Aplicando análisis de regresión se comprueba un aumento linear del Cadmio acumulado frente al aumento de concentración en las soluciones, con una regresión altamente significativa ($R^2 = 0,9905$) en el rango de trabajo seleccionado (desde 0,025 hasta 0,500 mg/L de Cd). Por tanto, no se alcanzó un estado estacionario, es decir que los organismos bioacumularon al metal en función de los niveles disponibles en la fase acuosa.

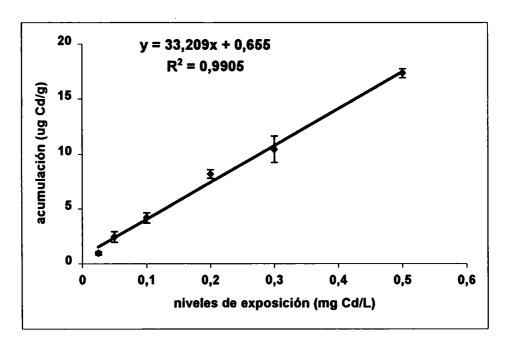


Fig.2. Valores de Cadmio bioacumulado por *L. variegatus* frente a distintos niveles de exposición del metal en soluciones conteniendo solamente agua. Los datos del metal bioacumulado se expresan como valores medios ± desviación estándar.

4.1.2- Estudios de eliminación

En la Figura 3 se presentan los niveles de Cadmio acumulados por L variegatus frente a distintos períodos de depuración, en experiencias realizadas a un nivel de exposición de 0,1 mgCd /L, durante 48 hs y sin partículas. Los resultados indican que no se registraron diferencias significativas en la bioacumulación en función de los tiempos de depuración ensayados (p > 0,05). Por consiguiente para el resto de los bioensayos, la depuración de realizó siempre por un período de 6 hs, siguiendo sugerencias de literatura (Mount et al, 1999).

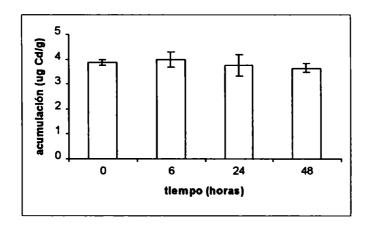


Fig.3. Valores de Cadmio bioacumulados por *L. variegatus* expuestos por 48 hs a 0,1 mg Cd/L y luego depurados por distintos tiempos. Los datos se expresan como valores medios ± desviación estándar.

4.2.- Estudios de letalidad

4.2.1.- Influencia de distintos niveles de Ácidos Húmicos (AH) en la letalidad de L. variegatus por Cadmio

Para investigar el efecto de distintos niveles de Ácidos Húmicos sobre la mortalidad por Cadmio en *L. variegatus*, se ensayaron distintas concentraciones del metal (0,7; 1,0 y 1,3 mg/L) en presencia de concentraciones variables de Ácidos Húmicos (AH): 0; 5; 20, y 60

mgAH/L .En todos los casos, los organismos se depuraron por 6 hs. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de Concentración Letal para Lumbriculus variegatus expuestos en forma aguda a soluciones de Cd y distintos niveles de Ácidos Húmicos.

| Concentración | Concentración de Acidos Húmicos | | | | |
|---------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|------------|--|
| Cd (mg Cd/L) | | | | | |
| | 0 mg/l | 5 mg/l | 20 mg/l | 60 mg/l | |
| Tiempo 48 hs | | | | | |
| 0,7 | 100% vivos (√) | 100% vivos | 100% vivos | 100% vivos | |
| 1,0 | CL ₅₀ | CL ₅₀ | 100% vivos (↓) | 100% vivos | |
| 1,3 | CL ₁₀₀ | CL ₁₀₀ | CL ₅₀ | 100% vivos | |
| Tiempo 72 hs | | | | | |
| 0,7 | 100% vivos(↓↓) | 100% vivos(↓↓) | 100% vivos (↓) | 100% vivos | |
| 1,0 | CL ₁₀₀ | CL ₁₀₀ | CL ₂₅ | 100% vivos | |
| 1,3 | | | CL ₁₀₀ | 100% vivos | |
| Tiempo 96 hs | | | | | |
| 0,7 | CL ₂₅ | 100% vivos(↓↓↓) | 100% vivos(↓↓) | 100% vivos | |
| 1,0 | | | CL ₅₀ | 100% vivos | |
| 1,3 | | | | 100% vivos | |

^(↓) individuos con escasa movilidad.

En primer lugar, se determinaron los valores de concentración letal para el 50% de la población (CL_{50}) en sistemas conteniendo agua declorada únicamente. El valor resultante fue de 1,0 \pm 0,3 mg Cd/L para 48 hs de exposición. Para 72 hs y 96 hs, los valores estuvieron acotados en el intervalo 0,7 < CL_{50} < 1,0 mg Cd/L.

En presencia de una solución de 5 mg AH/L, esos valores no resultaron ser significativamente modificados (p > 0.05).

En presencia de una solución de 20 mg AH/L, el valor de CL_{50} (48 hs) = 1,3 ± 0,2 mg Cd/L, un poco mayor que en los sistemas conteniendo 0 y 5 mg AH/L. Tras un tratamiento de 72 hs, el valor estuvo acotado en el rango 1,0 < CL_{50} < 1,3 mg Cd/L. A las 96 hs, el valor de CL_{50} = 1,0 ± 0,3 mg Cd/L.

^(↓↓) individuos con escasa movilidad y decoloración incipiente.

^{(\}lambda \lambda \rangle) individuos con muy escasa movilidad y practicamente decoloridos.

Como era de esperar, los niveles de concentración letal tienden a disminuir a medida que transcurre el tiempo de exposición.

En cambio, en los sistemas que contenían una solución de 60 mg AH/L, no se registró mortalidad a ninguna de las concentraciones de Cadmio ensayadas.

En resumen, estos estudios demostraron que a medida que aumentaba la concentración de material húmico, en niveles mayores a 5 mg AH/L, la toxicidad del metal tendía a disminuir.

4.2.2.- Influencia de Espermidina en la letalidad de L. variegatus por Cadmio

El efecto de una dada concentración de espermidina (70 mg/L) en la mortalidad de los oligoquetos expuestos a Cadmio se investigó de manera similar al estudio anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Valores de Concentración Letal para L. variegatus expuestos en forma aguda a soluciones de Cd en presencia y ausencia de 70 mg Espermidina /L.

| mg Cd/L | 0 mg/L Espermidina | 70 mg/L Espermidina |
|--------------|--------------------|---------------------|
| Tiempo 48 hs | | |
| 0,7 | 100% vivos | 100% vivos |
| 1,0 | CL ₂₅ | 100% vivos |
| 1,3 | CL ₇₅ | 100% vivos |
| Tiempo 72 hs | | |
| 0,7 | 100% vivos (↓) | 100% vivos |
| 1,0 | CL ₇₅ | 100% vivos |
| 1,3 | CL ₁₀₀ | 100% vivos |
| Tiempo 96 hs | | |
| 0,7 | 100% vivos (↓↓) | 100% vivos |
| 1,0 | CL ₁₀₀ | 100% vivos |
| 1,3 | | 100% vivos |

^(↓) individuos con escasa movilidad.

Nuevamente el valor de $CL_{50} = 1.0 \pm 0.3$ mg Cd/L para 48 hs de exposición, en organismos expuestos en agua solamente. Para 72 hs y 96 hs, los valores estuvieron acotados en el intervalo $0.7 < CL_{50} < 1.0$ mg Cd/L. En cambio, no se registró mortalidad en

^(↓↓) individuos con escasa movilidad y decoloración incipiente.

los tratamientos con espermidina a ninguno de los tiempos y concentraciones en estudio. Los datos indican que al nivel de espermidina seleccionado, su presencia disminuyó la letalidad del Cadmio en *L. variegatus*, al igual que lo observado con las mayores concentraciones de Ácidos Húmicos.

4.3- Efecto de la presencia de Ácidos Húmicos (AH) en la bioacumulación de Cadmio por L. variegatus

Se expusieron los organismos a un nivel de 0,1 mg Cd / L en presencia de distintos niveles de Ácidos Húmicos: 0; 5; 20 y 60 mg/L. Las experiencias se realizaron con tiempo de exposición de 48 horas y 6 horas de depuración. En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos. Los valores se expresan en porcentaje respecto al valor observado en ausencia de material húmico.

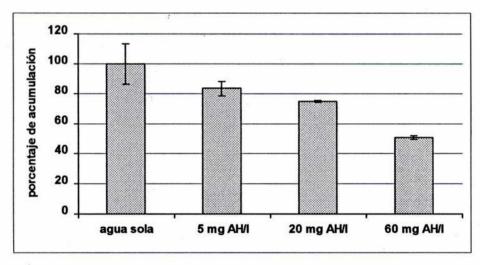


Fig. 4: Porcentaje de acumulación de Cd en *L. variegatus* tratados con 0,1 mg Cd /L y distintas concentraciones de AH por 48 hs y luego depurados por 6 hs.

En los sistemas conteniendo 0 y 5 mg AH/L no se observaron diferencias significativas en la bioacumulación del metal (p > 0,05). En cambio, cuando los niveles de Ácidos Húmicos aumentaron (20 y 60 mg/L) se observó una disminución significativa en la concentración de Cadmio bioacumulado, con respecto a los organismos expuestos al metal

en ausencia de material húmico (p < 0,05). La menor bioacumulación se encontró al mayor nivel de material húmico.

4.4- Bioacumulación de Cadmio asociado a distintos sistemas de partículas

En la Figura 5 se observan los resultados de bioacumulación de Cadmio en sistemas conteniendo las distintas partículas ensayadas, en presencia o ausencia de una solución de 20 mg/L de Ácidos Húmicos.

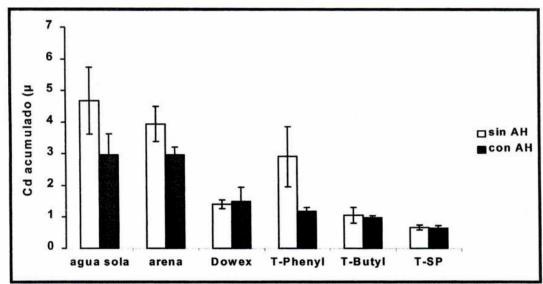


Fig.5: Bioacumulación de Cd por *L.variegatus* tratados con 0,1 mg Cd/L por 48 hs, depurados por 6 hs, en sistemas conteniendo sólo agua o distintos tipos de partículas, en presencia o ausencia de Ácidos Húmicos.

Los datos se expresan como valores medios ± desviación estándar.

La mayor incorporación del metal se produjo a través de la fase acuosa soluble, siendo menor cuando ésta contenía una solución de 20 mg/L de AH, tal como se describió en el punto anterior.

En presencia de arena pura, hubo una acumulación ligeramente menor (84%), pero en presencia de arena y Ácidos Húmicos la acumulación fue aún menor, alcanzando aproximadamente un 50%.

En ausencia de Ácidos Húmicos, todos los sistemas de partículas artificiales promovieron valores menores significativamente en la incorporación de Cadmio, con respecto al sistema conteniendo solamente agua: 62% para Toyopearl Phenyl, 30% para Dowex, 22% para Toyopearl Butyl y 14% para Toyopearl SP.

En presencia de material húmico y partículas artificiales, los resultados no se modificaron significativamente respecto a los mismos sistemas en ausencia de Ácidos Húmicos, salvo para el caso de Toyopearl Phenyl, donde se observó una marcada disminución de bioacumulación por efecto de la presencia del material húmico.

4.5- Valores de pH de las soluciones en estudio

Finalmente, en la Tabla 6 se presentan los valores de pH de las soluciones de Cadmio y las distintas partículas en estudio, en ausencia de material húmico. Los valores indican que el pH del medio no se modificó significativamente, salvo en el caso del sistema conteniendo partículas Dowex. En dicho sistema, se verificó un ligero pero significativo descenso del pH (p < 0.05). En cada caso, los valores de pH no fueron afectados por la presencia simultánea del material húmico.

Tabla 6. Valores de pH de los sistemas ensayados

| Sistema de Partículas | pH sin AH | pH con AH |
|-----------------------|---------------|---------------|
| Arena | 7.0 ± 0.1 | 7.0 ± 0.1 |
| Dowex 1x8400 | 6.5 ± 0.2 | 6.5 ± 0.2 |
| Toyopearl Phenyl | 7.0 ± 0.2 | 7.0 ± 0.2 |
| Toyopearl Butyl | 7.0 ± 0.2 | 7.0 ± 0.2 |
| Toyopearl SP | 6.9 ± 0.1 | 6.9 ± 0.1 |

5 - DISCUSIÓN

La incorporación de Cadmio en *L. variegatus* resultó directamente proporcional a la concentración nominal del metal presente en las soluciones de los bioensayos, dentro del rango de concentraciones estudiado. Por lo tanto, no se alcanzó un estado estacionario para el oligoqueto, en las condiciones de trabajo seleccionadas.

Cuando se analizan niveles de contaminantes en estudios de bioacumulación, se recomienda un proceso de **depuración** o purga, el cual se realiza mediante la transferencia de los organismos a un medio de agua pura, luego del tratamiento (Rand, 1995). Generalmente, el tiempo de depuración es de 24 horas para la mayoría de los organismos acuáticos, incluyendo a *L. variegatus* (Ankley et al., 1991; Phipps et al., 1993). El objetivo de este procedimiento es evitar una sobreestimación en la carga corporal de contaminantes durante los estudios de acumulación. Una proporción variable de la sustancia puede estar simplemente adsorbida sobre la superficie corporal y/o transitoriamente presente en el tracto digestivo, sin haber sido aún completamente absorbida por el organismo. (Depledge and Rainbow, 1990; Rand, 1995). Sin embargo, se ha argumentado que un período de 24 horas puede ser demasiado largo para ciertos invertebrados como *L. variegatus*, pues una proporción importante del contaminante puede haber sido ya eliminada de los tejidos (Kukkonen and Landrum, 1994). Mount et al. (1999) consideran que para esta especie de oligoqueto, un período de depuración de 6 horas sería suficiente para la mayoría de las sustancias químicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos realizados con un tiempo de hasta 48 horas de depuración, se comprobó que el Cadmio acumulado por *L.variegatus* se elimina muy lentamente en ese período y que la carga total corporal puede ser adecuadamente determinada tanto tras 6 como 24 horas de depuración. La lenta eliminación de Cadmio es un hecho muy bien documentado en la literatura, y justamente por ello este metal exhibe una gran capacidad de bioacumulación (WHO, 1992, Verrengia Guerrero, 1995, Rainbow, 2002).

De los estudios de letalidad se comprobó que, tanto determinadas concentraciones de Ácidos Húmicos (aquéllas de 20 y 60 mg/L), como el nivel de Espermidina seleccionado, disminuyeron la toxicidad del Cadmio en *L.variegatus*. Por su parte, los estudios de bioacumulación realizados con distintos niveles de Ácidos Húmicos, demostraron que la acumulación del metal en *L. variegatus* disminuía a medida que aumentaba el nivel de Ácidos Húmicos en la solución.

Interpretando simultáneamente los resultados de los estudios de letalidad y de acumulación en presencia de material húmico, es posible deducir que la menor toxicidad del Cadmio en sistemas que contienen mayores concentraciones de Ácidos Húmicos puede ser atribuida a una menor incorporación y acumulación del metal por *L. variegatus*. Se considera que las concentraciones de metal disuelto, especialmente las especies libres del metal, reflejan mucho mejor la fracción disponible para su ingreso en los organismos acuáticos (Campbell et al., 1995, Lussier et al., 1999). Por consiguiente, los resultados obtenidos sugieren que las especies libres Cd²⁺ disminuyen en aquellos sistemas con mayor concentración de material húmico, debido a la formación de complejos con los grupos cargados negativamente, mediante interacciones electrostáticas. Aunque estos complejos permanezcan en solución, la biodisponibilidad del metal decrece, y por lo tanto, su bioacumulación y toxicidad.

Esta hipótesis concuerda con la teoría del modelo de actividad de iones libres (MAIL) (Morel, 1983), la cual atribuye una mayor relevancia a las especies metálicas libres como determinantes de los procesos de incorporación y acumulación de metales en organismos acuáticos.

Según la literatura, varios autores han reportado que la toxicidad y/o acumulación de Cadmio disminuye al aumentar la concentración de ligandos orgánicos tales como los Ácidos Húmicos, confirmando las predicciones del MAIL (Verrengia Guerrero, 1995; Van Ginneken et al., 2001). Sin embargo, también se han reportado resultados dispares, según los cuales los Ácidos Húmicos han aumentado, disminuido, o incluso no han modificado la bioacumulación y/o toxicidad del Cadmio (Stackhouse et al., 1988; Penttinen et al., 1998; Verrengia Guerrero et al., 2000). Puede haber muchas explicaciones para estos resultados aparentemente contradictorios. En algunos casos, se puede atribuir al nivel de

concentración de Ácidos Húmicos, a su origen, a los tiempos de tratamiento empleados y a la dureza del agua (Stackhouse y Benson, 1988, Penttinen et al., 1998, Verrengia Guerrero et al., 2000). Además, las características de las interacciones entre Ácidos Húmicos y metales aún no están bien definidas, y probablemente dependen de las características físico-químicas de la fase acuosa.

Por otra parte, también puede haber factores biológicos involucrados. En el caso del crustáceo Daphnia magna se encontró un aumento en la incorporación de Cadmio cuando los organismos se exponían en un agua natural rica en material húmico, respecto de un medio con pobre contenido (Penttinen et al., 1995). Por lo tanto no se puede asumir que para todas las especies acuáticas habrá menos Cadmio biodisponible por formación de complejos. Podría suceder que algunos organismos tengan la capacidad de disociar los complejos y absorber a los elementos metálicos en sus tractos digestivos. Como puede apreciarse, se requieren más estudios para dilucidar estos aspectos.

La Espermidina es una poliamina natural, presente en la mayoría de los organismos, que cumple funciones vitales para las células, tales como asistir a la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, estabilizar macromoléculas y estructuras celulares, y participar en la diferenciación celular. Se comporta como un policatión alifático, pues sus grupos amino terminales están totalmente protonados al pH fisiológico, teniendo la capacidad de establecer enlaces tipo puente de hidrógeno con muchas moléculas. Esta poliamina también puede formar complejos de coordinación con cationes inorgánicos, como es el caso de la especie Cd²⁺. Los complejos resultantes disminuirían la incorporación y la toxicidad del metal en los organismos.

En los sistemas que contenían los distintos tipos de partículas en ausencia de material húmico, los resultados demuestran que en todos los casos se indujo una disminución en la acumulación de Cadmio en L. variegatus, respecto a la incorporación observada en el medio conteniendo sólo agua. Considerando los sistemas con partículas libres de material húmico, la mayor acumulación se encontró en el sistema de arena, seguido en orden

decreciente por la resina neutra Toyopearl Phenyl, el intercambiador aniónico Dowex, la resina neutra Toyopearl Butyl y finalmente el intercambiador catiónico Toyopearl SP.

Cuando se compara la acumulación resultante entre el sistema conteniendo solamente agua y los sistemas con partículas, los resultados deben ser interpretados teniendo en cuenta tanto las características físico-químicas del medio, como la biología del organismo utilizado como modelo experimental.

El oligoqueto *L. variegatus* es un organismo que en condiciones naturales habita en las capas superficiales de los sedimentos. Por consiguiente, en el sistema que contenía agua solamente los organismos pudieron presentar un comportamiento anómalo. En ausencia de material particulado, los organismos fueron incapaces de encontrar algún substrato para enterrarse, de este modo pudieron estar mucho más móviles y estresados. Estas condiciones pudieron promover un mayor incremento en la bioacumulación, tal como fue observado por Davies et al. (1999) en otra especie de organismo residente en sedimentos.

Respecto de la acumulación observada en agua solamente, el sistema de arena pura promovió un valor ligeramente menor en la acumulación (84%), que no resultó ser estadísticamente significativo (p > 0,05). Debido al tamaño de las partículas de arena (100-300 μm) éstas eran demasiado grandes como para ser incorporadas por los organismos. La ligera disminución en la bioacumulación de Cadmio, podría atribuirse al simple hecho de que este sistema ofrecía un ambiente más natural para los oliquetos. Además por tratarse de arena pura, libre de otros componentes, no sería de esperar que este material pudiera interactuar con las especies de Cd²⁺.

La resina Dowex (intercambiadora de aniones) tiene grupos funcionales con cargas positivas, por lo tanto es de esperar que éstos no exhiban ninguna atracción por las especies de Cd²⁺. Sin embargo, debe destacarse que estas partículas promovieron un ligero descenso en el pH del medio. Como consecuencia de ello, los organismos presentaron un marcado comportamiento de repulsión, manteniéndose alejados de la superficie de las partículas. Dicho comportamiento pudo inducir una menor bioacumulación.

Las tres resinas Toyopearl (T-Phenyl, T-Butyl y T- SP) tienen el mismo esqueleto estructural, consistente en polímeros de etilenglicol y metilmetacrilato, por lo tanto las

diferencias en la bioacumulación serían atribuidas a los distintos grupos funcionales presentes en sus respectivos sitios activos.

Aunque ambas resinas Toyopearl Phenyl y Toyopearl Butyl son neutras, los resultados de bioacumulación fueron curiosamente significativamente diferentes entre ellos (p < 0,05). Las partículas de Toyopearl Phenyl indujeron una acumulación de Cadmio similar a la observada en el sistema de arena pura. Por la naturaleza neutra de los grupos funcionales no sería de esperar que estas resinas pudieran interaccionar con las especies iónicas de Cd²⁺. No obstante, si recordamos las estructuras, los grupos funcionales (fenilo y butilo, en cada caso) están ligados al esqueleto mediante un átomo de oxígeno. Por consiguiente, es posible asumir que dicho átomo de oxígeno esté en condiciones de establecer algún tipo de interacción electrostática con los iones Cd²⁺ cuando liga a un grupo butilo. De esta forma, las partículas de Toyopearl Butyl pudieron adsorber especies libres de Cd²⁺, disminuyendo la biodisponibilidad, y por ende la bioacumulación, del metal. Por otra parte, estas interacciones electrostáticas no tendrían lugar en presencia de un anillo aromático como sustituyente.

En el caso de la resina Toyopearl SP, al ser un intercambiador de cationes, se puede asumir que se establecieron interacciones iónicas con las especies libres de Cd^{2+} , disminuyendo la biodisponibilidad del metal. Estas interacciones son usualmente fuertes, de modo tal que aunque los oligoquetos pudieran incorporar las partículas en el tracto digestivo, el elemento no se disoció de la resina. En consecuencia este sistema promovió la menor acumulación de Cadmio en L. variegatus.

A continuación se analizarán los resultados de acumulación obtenidos en los sistemas de partículas en presencia de Ácidos Húmicos. En todos los sistemas, la concentración total de material particulado fue de 100 g/L (2 g de partículas en 20 mL de solución), comparativamente mucho mayor al nivel de concentración de material húmico (20 mg/L). Considerando estos niveles, el material particulado tendría la mayor influencia para condicionar la biodisponiblidad del Cadmio en los distintos sistemas. Tal parece ser el caso en presencia de las resinas Dowex, Toyopearl Butyl y Toyopearl SP, frente a las cuales la biodisponiblidad y bioacumulación del metal no resultaron ser significativamente

modificadas por la presencia o ausencia de material húmico. En cambio, para los sistemas conteniendo arena pura y partículas Toyopearl Phenyl, la presencia de Ácidos Húmicos disminuyó la bioacumulación de Cadmio en *L. variegatus*. Por un lado, estas partículas no indujeron ningún efecto de estrés en los organismos. Además, frente a estas partículas el Cadmio no habría encontrado ningún sitio definido con capacidad para interactuar con éstas, según fue discutido anteriormente. Por consiguiente, en estos casos la presencia de materia orgánica pudo resultar un factor determinante para la asociación del metal. Las interacciones pudieron establecerse entre las especies libres de Cd²⁺ y los grupos negativamente cargados que se encuentran en los Ácidos Húmicos. Como consecuencia, disminuyó la biodisponibilidad y por ende la bioacumulación del metal, tal como fue observado experimentalmente.

6 - CONCLUSIONES

- 1) Se caracterizaron, mediante bioensayos agudos, algunos de los procesos toxicocinéticos relacionados con la incorporación de Cadmio en *L. variegatus*.
- 2) Las concentraciones más altas de Ácidos Húmicos (20 y 60 mg AH/L) promovieron una disminución en la letalidad de *L. variegatus* por efecto de Cadmio. Un nivel de 70 mg/L de Espermidina produjo el mismo efecto. En el caso de los sistemas conteniendo material húmico, la menor letalidad se correlacionó positivamente con una disminución en los niveles de metal bioacumulado por los oligoquetos.
- 3) Los resultados demostraron que la mayor incorporación del metal en L. variegatus se verificó en el sistema conteniendo solamente agua.
- 4) En ausencia de Ácidos Húmicos, todos los sistemas de partículas artificiales promovieron menores valores en la incorporación de Cd, respecto del agua sola, con diferencias significativas: 62% en el caso de Toyopearl Phenyl, 30% para Dowex, 22% para Toyopearl Butyl, y 14% para Toyopearl SP.
- 5) En los sistemas de partículas artificiales, la incorporación del metal no se modificó por efecto de la presencia de Ácidos Húmicos, excepto en el caso de la resina Toyopearl Phenyl, para la que se observó una marcada disminución en la acumulación.
- 6) Por efecto de la presencia de partículas artificiales, el Cadmio se adsorbería sobre las partículas, en mayor o menor proporción dependiendo de los grupos funcionales involucrados. Como consecuencia, se verifica una menor concentración del metal en la fase acuosa soluble. El metal adsorbido sobre las partículas no sería capaz de ser absorbido en el tracto digestivo de los organismos en estudio y por ello se registra una menor bioacumulación.

- 7) Los resultados de bioacumulación de Cadmio en el sistema de partículas Toyopearl Phenyl sin material húmico y el sistema de arena y Ácidos Húmicos, no presentaron diferencias significativas entre sí. Considerando al sistema de arena material húmico como el más asimilable a los sedimentos de los cuerpos y cursos de agua naturales, las partículas Toyopearl Phenyl podrían constituir un modelo experimental muy apto para predecir la biodisponibilidad y la potencial bioacumulación del metal en *L.variegatus*.
- 8) Finalmente, si bien todas las partículas artificiales estudiadas, promovieron una disminución en los niveles de Cadmio bioacumulados por los oligoquetos, las resinas Toyopearl Butyl y Toyopearl SP indujeron los mayores descensos. Por consiguiente, ambas partículas podrían tener importantes aplicaciones en procesos de remediación química in situ, tanto de cursos de aguas altamente contaminados, o bien frente a descargas accidentales, conteniendo altos niveles del metal.

7 - BIBLIOGRAFÍA

- 1. Abbt-Brown, G.; Frimmel, F.H. y Schulten, H.R. (1989). Water Res. 23:1579-1591.
- 2. Amdur, M.O.; Doull, J. y Klaassen, C.D., (1991) (editores). "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons"; 4th Edition. Pergamon Press, New York.
- 3. Ankley, G.T.; Phipps, G.L.; Leonard, E.N.; Benoit, D.A.; Mattson, V.R.; Kosian, P.A.; Cotter, A.M.; Dierkes, J.R.; Hansen, D.J., y Mahony, J.D. (1991). *Environ. Toxicol. Chem.* 10:1299-1307.
- 4. Ashton, A. y Chan, R. (1987). Analyst 112:841-844.
- 5. ASTM (1995). American Society for Testing and Materials. Annual Book of ASTM Standards, vol.11.05, E 1393-94, pp.802-834.
- 6. Baudo, R. y Muntau, H. (1990). En "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; Baudo, R. y Muntau, H., editores. Lewis Publishers, pp. 1-14.
- 7. Beeby, A. (1991). En "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; Newman, M. y McIntosh, A. editores. Lewis Publishers, pp.65-90.
- 8. Beliles, R.P. (1975). En "Toxicology: The Basic Science of Poisons"; Casarett, L. y Doull, J., editores. Macmillan Publishing, New York; pp.454-502.
- 9. Bengtsson, B. (1988). Ambio 17:356
- 10. Benson, W.H. y Long, S.F. (1991). Ecotoxicol. Environ. Saf. 21:301-307.
- 11. Bewers, J.M.; Barry, P.J. y MacGregor, D.J. (1987). En "Cadmium in the Aquatic Environment"; Nriagu, J.O. y Sprague, J.B., editores. John Wiley & Sons, pp. 1-18.
- 12. Bojórquez-Tapia, L.A. (1989). Environ. Manage. 13:545-551.
- 13. Booij, K. (1993). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50:205-211.
- 14. Bordalo Costa, M.M. y Peneda, M.C. (1989). Environ. Technol. Lett. 10:697-705.
- 15. Bradford, W.L. y Horowitz, A.J. (1988). (editores). En "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, 75 p.
- 16. Brezonik, P.L.; King, S.O. y Mach, C.E. (1991). En "Metal Ecotoxicology: Consepts & Applications"; Newman, M.C. y McIntosh, A.W., editores. Lewis Publishers, pp.1-32.
- 17. Briscoe, J. (1993). Environment 35:7-37.
- 18. Bucke, D. (1993). Parasitology 106:S25-S37.
- 19. Campbell, P. (1995). En "Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems", Tesier, A y Turner, D.R., editores. John Wiley & Sons, U.K. pp.45-102.
- 20. Cattogio, J. (1990). Revista Ciencia Hoy, vol.90.
- 21. Depledge, M. y Rainbow, P.S. (1990). Comp. Biochem. Physiol. 97 C:1-7.
- 22. Eidt, D.C.; Hollebone, J.E.; Lockhart, W.L.; Kingsbury, P.D.; Gadsby, M.C. y Ernst, W.R. (1989). En: "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; Nriagu, J.O. y Lakshminarayana, J.S.S., editores. John Wiley & Sons, pp.245-283.
- 23. Farrington, J.W. (1989). En "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; Levin, S.; Harwell, M.A.; Kelly, J.R. y Kimball, K.D., editores. Springer-Verlag New York, pp.279-350.
- 24. Fleischer, M. et al. (1974). "Environmental Impact of Cadmium: A Review by the Panel on Hazardous Trace Substances". Environmental Health Perspectives, 7: 253-323.

- 25. Florence, T.M.; Morrison, G.M. y Stauber, J.L. (1992). Sci. Total Environ. 125:1-13.
- Ford, J. (1989). <u>En</u> "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; Levin, S.;
 Harwell, M.A.; Kelly, J.R. y Kimball, K.D., editores. Springer-Verlag New York,
 pp. 99-144.
- 27. Förstner, U. (1990). En "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; Baudo, R. y Muntau, H., editores. Lewis Publishers, pp.61-105.
- 28. French, D.P. (1991). <u>En</u> "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Fourteenth Volume", ASTM STP 1124; Mayes, M.A. y Barron, M.G., editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp.35-47.
- 29. Frenet, M. (1981). Water Res. 15:1343-1350.
- 30. GESAMP (1984). Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. "Review of Potentially Harmful Substances: Cadmium, Lead, and Tin". World Health Organization. Reports and Studies (22), 114p.
- 31. GESAMP (1991). Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. "Statement of the Intergovernmental Meeting of Experts on Land Based Sources of Marine Pollution". World Health Organization. Reports and Studies (32), 171p.
- 32. Giesy, J.P.Jr. y Hoke, R.A.. (1990). <u>En</u> "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; Baudo, R. y Muntau, H., editores. Lewis Publishers, pp.265-348.
- 33. Gómez, E.D. (1988). Ambio 17:166-169.
- 34. Goreu, T.J. y de Mello, W.Z. (1988). Ambio 17: 275-280.
- 35. Goyer, R.A. (1991). En "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons"; Amdur, M.O.; Doull, J. y Klaassen, C.D., editores; 4th Edition. Pergamon Press, New York, pp.623-680.
- 36. Graedel, T.E. y Crutzen, P.J. (1989). Investigación y Ciencia 158:22-31.
- 37. Handy, R.D. y Eddy, F.B. (1990). Functional Ecology 4:385-392.
- 38. Hileman, B. (1992). Chemical & Enginnering News 70:7-14.
- 39. Horowitz, A.J. (1988). En "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, pp.7-22.
- 40. Ingersoll, C.G., (1995). En "Fundamentals of Aquatic Toxicology". Rand, G.M. editor, 2nd edition, Francis & Taylor, London, pp.231-255.
- 41. Jenkins, K.D. y Sanders, B.M. (1986). Environ. Health Perspect. 65:205-210.
- 42. Josephson, J. (1982). Environ. Sci. Technol. 16:20-24.
- 43. Kabala, S.J. (1988). Ambio 17:323-329.
- 44. Kesten, E.M. (1990). Acta Bioquim. Clin. Latinoam. 24:53-60.
- 45. Key, M.M., ed. et al., (1977). "Occupational Diseases: A Guide to their Recognition". Rev.ed. Washington: U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service Center for Disease Control, NIOSH. Publication N°77-181.
- 46. Kjellstrom, T.; Friberg, L. y Rhamster, B. (1979). "Mortality and Cancer Morbidity among Cadmium Exposed Workers". Environmental Health Perspectives, 28: 199-204.
- 47. Kukkonen, J. y Landrum, P.F. (1994). Environ. Toxicol. Chem. 13:1457-1468.
- 48. Ladonin, D.V. y Margolina, S.E. (1997). Euras. Soil Sci. 30:710.
- 49. Lai, T.M. (1988). En "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, pp.56-64.

- Landrum, P.F. y Robbins, J.A. (1990). En "Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants"; Baudo, R. y Muntau, H., editores. Lewis Publishers, pp.237-363.
- 51. Lee, S.K.; Freitag, D.; Steinberg, C.; Kettrup, A. y Kim, Y.H. (1993). Water Res. 27:199-204.
- 52. Levin, S.A.; Harwell, M.A.; Nelly, J.R. y Kimball, K.D. (1989).). En "Ecotoxicology: Problems and Approaches"; Levin, S.; Harwell, M.A.; Kelly, J.R. y Kimball, K.D., editores. Springer-Verlag New York, pp. 1-9.
- 53. Lövgren, L. y Sjöberg, S. (1989). Water Res. 23:327-332.
- 54. Luoma, S.N. (1988). En "The Role of Sediments in the Chemistry of Aquatic Systems"; US Geological Survey, Circular 969, pp.32-56.
- 55. Luoma, S.N. y Carter, J.L. (1991). En "Metal Ecotoxicology: Concepts & Applications"; Newman, M. y McIntosh, A., editores .Lewis Publishers, pp.261-300.
- 56. Lussier, S.M.; Boothman, W.S.; Poucher, S.; Champlin, D. y Helmstetten, A. (1999). Environ. Contam. Chem. 18:5.
- 57. Mahan, C.A. y Holcombe, J.A. (1992). Anal. Chem. 64:1933-1939.
- 58. Mangla, B. (1988). Ambio 17:350-351.
- 59. Marcus, J.M. y Scott, G.I. (1990). En "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Thirteenth Volume", ASTM STP 1096; Landis, W. y van der Schalie, W.H., editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp.110-122.
- 60. Marcus, W.A. (1989). Environ. Manage. 13:703-713.
- 61. Means, J.C. y Wijayaratne, R. (1982). Science 215:968-970.
- 62. Menzer, R.E. (1991). En "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons"; Amdur, M.O.; Doull, J. y Klaassen, C.D., editores; 4th Edition. Pergamon Press, New York.pp.872-902.
- 63. Mizuike, A. (1987). Pure & Appl. Chem. 59:555-564.
- 64. Mohnen, V.A. (1988). Scientific American 259:30-38.
- 65. Morel, F.M.M. (1983). En "Principles of Aquatic Chemistry", Wiley-Interscience, New York.
- 66. Mount D.R.; Dawson, T.D.y Burkhar, L.P. (1999). Environ. Toxicol. Chem. 18:1244-1249.
- 67. Mullen, M.D.; Wolf, D.C.; Ferris, F.G.; Beveridge, T.J.; Flewming, C.A. y Bailey, G.W. (1989). Appl. Environ. Microbiol. 55:3143-3149.
- 68. Mumme, S.P. (1991). Environment 33:7-29.
- 69. Neubecker, T.A. y Allen, H.E. (1983). Water Res. 17:1-14.
- 70. Nordberg, G.I. y Kjellstrom, T.(1979). "Metabolic Model for Cadmium in Man". Environmental Health Perspectives. 28: 211-217.
- 71. Nriagu, J.O. (1990). Environment 32:7-32.
- 72. Nriagu, J.O. (1992). Sci. Total Environ. 121:1-37.
- 73. Nriagu, J.O. y Pacyna, J.M. (1988). *Nature* 333:134-140.
- 74. Ogner, G v Schnitzer, M. (1970). Science 170:317-318.
- 75. Pakains, P. y Farrar, Y.J. (1977). Water Res. 11:145-151.
- 76. Pardo, R.; Barrado, E.; Pérez, L. y Vega, M. (1990). Water Res. 24:373-379.
- 77. Pearce F. (1998). Sci Total Environ 210/211:385-394.
- 78. Penttinen, S.; Kostamo, A. y Kukkonen, J.V.K. (1998). Environ. Toxicol. Chem. 17:2498.

- 79. Penttinen, S; Kukkonen, J.V.K. y Oikari, A. (1995). Ecotoxicol. Environ. Saf. 30:72.
- 80. Phipps, G.L.; Ankley, D.A.; Benoit, D.A. y Mattson, V.R. (1993). Environ. Toxicol. Chem. 12:269.
- 81. Pratt, J.R. (1990). En "Aquatic Toxicology and Risk Assessment: Thirteenth Volume", ASTM STP 1096; Landis, W. y van der Schalie, W.H., editores. American Society for Testing and Materials, Philadelphia; pp.16-26.
- 82. Rainbow, P.S. (2002). Environ. Poll. 120:497.
- 83. Rand, G.M.; Wells, P.G. y McCarty, L.S. (1995). En "Fundamentals of Aquatic Toxicology", Rand, G.M. editor, Francis & Taylor, London, pp.3-67.
- 84. Regier, H.A. (1989). En "Aquatic Toxicology and Water Quality Management"; Nriagu, J.O. y Lakshminarayana, J.S.S., editores. John Wiley & Sons, pp.1-6.
- 85. Rockwell, R.C. y Moss, R.H. (1992). Environment 34:12-39.
- 86. Rosencranz, A. (1988). Ambio 17:336-341.
- 87. Sarokin, D. y Schulkin, J. (1992^a). Environ. Sci. Technol. 26:1694-1701.
- 88. Schaeffer, D.J. (1991). Ecotoxicol. Environ. Saf. 22:225-239.
- 89. Schulten, H.R. y Plage, B. (1991). Naturwissenschaften 78:311-312.
- 90. Shaw, J.S. y Stroup, R.L. (1990a). Internat. Health Develop. Winter 90:17-19.
- 91. Shaw, J.S. y Stroup, R.L. (1990b). Ibid..pp. 20-24.
- 92. Shigematsu, I.; Minowa, M.; Yoshida, T. y Miyamoto, K. (1979). "Recent Results of Health Examination on the General Population in Cadmium Polluted and Control Areas in Japan". Environmental Health Perspectives, 28: 205-210.
- 93. Simkiss, K. (1979). Endeavour New Series 3:2-6.
- 94. Simkiss, K. (1990). Functional Ecology 4:303-308.
- 95. Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1997). En "Biometry. The principles and Paractise of Statistics in Biological Research". 3th Edition, W.H. Freeman, New York
- 96. Stackhouse, R.A. y Benson, W.H. (1988). Aquatic Toxicology 13:99-108.
- 97. Steinberg, C.E.W.; Sturm, A.; Kelbel, J.; Kyu Lee, S.; Hertkorn, N.; Freitag, D. y Kettrup, A.A. (1992). *Acta Hydrochim. Hydrobiol*. 20:326-332.
- 98. Sunda, W.G. y Gillispie, P.A. (1979). J. Mar. Res. 37:761-777.
- 99. Sunda, W.G. y Lewis, J.M. (1978). Limnol. Oceanogr. 23:870-876.
- 100. Sunda, W.G.; Cross, F.A.; Engel, D.W. y Hanson, P.J. (1987). En "Physiological Responses of Marine Organisms to Environmental Stresses"; Dorigan, J.V. y Harrison, F.L., editores. Department of Energy, USA, DOE/ER-0317, pp.451-478.
- 101. Task Group on Metal Interaction, Factors Influencing Metabolism and Toxicity of Metals. (1978). Environmental Health Perspectives, 25: 3-41.
- 102. Turner, M.D.; Marsh, D.O.; Smith, J.C.; Inglis, J.B. y Clarkson, T.W. (1980). Arch. Environ. Health 35:367-378.
- 103. US EPA (1971) United States Environmental Protection Agency. "Methods of Chemical Analysis of Water and Wastes". Cincinnati, Ohio.
- 104. Valsaraj, M. y Thibodeaux, C. (1989). Water Res. 23:183-189.
- 105. Van Ginneken, L.; Verboets, L. y Blusa, R. (2001). Aq. Toxicol. 52:13.
- 106. Verrengia Guerrero, N.R. (1995). "Contaminantes Metálicos en el Río de la Plata: Monitoreo del sistema acuático y estudio de algunos efectos tóxicos en moluscos bivalvos por medio de bioensayos". Tesis doctoral, Fac. Cs. Exactas y Nat. UBA.
- 107. Verrengia Guerrero, N.R.; Taylor, M.G.; Davies, N.A.; Lawrence, M.A.M.; Edwards, P.A.; Simkiss, K y Wider, E.A. (2002). *Environ. Poll.* 117:523.
- 108. Viessman, W. (1990). Environment 32:11-35.

- 109. Waldichuk, M. (1974). En: "Pollution and Physiology of Marine Organisms", Vernberg, F.J. y Vernberg, W.M., editores. Academis Press, New York, pp.1-57.
- 110. Whelan, T. (1988). Ambio 17:72-75.
- 111. Whelan, T. (1989). Ambio 18:302-304.
- 112. WHO (1992). "Environmental Health Criteria for Cadmium".
- 113. Witkowski, P.J.; Smith, J.A.; Fusillo, T.V. y Chiou, C.T. (1987) (editores). En "A review of surface-Water Sediment Fraction and their Interactions with Persistent Mammade Organic Compounds". US Geological Survey, Circular 993.