



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA INDIVIDUAL Y EN
MEZCLA DE SULFATO DE COBRE, DICROMATO DE
POTASIO Y CLORURO DE CADMIO SOBRE UN
BIOINDICADOR FITOPLANCTÓNICO**

TESIS

Para obtener el título de:

Químico Farmacobiólogo

Presentada por:

Zaida Irazú Téllez Pérez

Dirigida por:

D.C. María Carmen Bartolomé Camacho

Morelia, Michoacán junio 2019

AGRADECIMEINTOS

Quiero agradecerle a la persona más importante en mi vida, **mi heroína y maravillosa mamá**, por darme la fuerza cuando yo ya no podía seguir adelante, la sabiduría y las herramientas para cumplir uno de mis sueños. Por siempre apoyarme, escucharme y darme consejos. Por darme valores y siempre guiarme por el buen camino, por toda la paciencia que has tenido conmigo, por creer en mí y seguir luchando por mí cuando yo me daba por vencida, el camino nunca fue fácil pero hoy estamos aquí, logrando metas. No me alcanzaría la vida para agradecerte todo lo que has hecho por mí, por todo tu amor, eres mi más grande ejemplo a seguir. **TE AMO MUCHO Y MUCHAS GRACIAS.**

A mis tíos Alicia y José, por cuidar de mí aun en la distancia, por escuchar mis sueños y mis problemas, por apoyarme, les agradezco de todo corazón, son como unos papás para mí.

A mi asesora, Dra. Carmen Bartolomé, por darme una oportunidad, por guiarme, por su apoyo y consejos para la elaboración de esta tesis. Aprendí mucho de usted, como persona y como profesional, y estoy segura que a lo largo de mi vida todas las enseñanzas que me ha dado las aplicaré en mi vida, es un ángel. ¡Gracias!

A M.C. Alondra Cortés, por todos los consejos que me has dado, por enseñarme siempre cosas nuevas, por las risas y los llantos y todo tu apoyo. Desde mi corazón, gracias.

A mis maravillosas amigas Brendalí, Alondra, Paulina y Atziri, por todas las pláticas en las madrugadas, por todo el apoyo que me han dado a lo largo de todos estos años, por crecer conmigo, por las risas interminables, los consejos, las desveladas, por sacarme de mi burbuja, por luchar a mi lado en todas mis batallas, por estar en las buenas y más que nada en las malas y peores. Se han convertido en mi familia, mis hermanas. No tengo palabras para expresarles lo mucho que las quiero y les agradezco todo.

A mis amiguitos de la facultad, Vane, Jesús, Gerardo, Rebe, Yara, Daniel, Diana, Katy y Lupita. También a mis amigos de la orientación: Tere, Francisco, Edgar, Zaid y Sergio, porque sin ustedes estos 5 años de la universidad hubieran sido muy aburridos, gracias por enseñarme tanto, porque ustedes me recordaron la fuerza que tengo para salir adelante y por el gran equipo que formamos para terminar la carrera, por todos los “algo tranqui” y por abrirme sus corazones. GRACIAS a todos ustedes, sin ustedes me hubiera vuelto loca. Y aunque nuestros caminos son diferentes, fue un placer coincidir con todos ustedes.

A mi querida D. por desvelarte conmigo estudiando y escuchando mis monólogos, por darme tanto amor. Estoy segura que pronto te daré el patio más grande del mundo para que puedas correr y jugar todo lo que tú quieras. Siempre en mi corazón, mi hermosa D.

A Diosito, por darme la fuerza, la sabiduría y el valor en cada tope de mi vida.

A todas estas hermosas personas que están en mi vida, GRACIAS...

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a todos los esfuerzo, sacrificios y amor que ha dado **mi mamá** por sacarme adelante. Este logro es tuyo y mío. Sin ti, nada de esto sería posible. Por enseñarme a ser una mujer con sueños y metas y por enseñarme a creer en la bondad, las cosas buenas y los buenos sentimientos.

A mi mamá Amelia, siempre en mi corazón, eres mi ángel.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
GLOSARIO	VIII
RESUMEN	XIII
ABSTRAC	XIV
1.INTRODUCCIÓN	1
2.MARCO TEÓRICO	4
2.1 Contaminación del agua.....	6
2.1.1 Contaminación del agua por la mezcla de compuestos metálicos	9
2.2 Metales cobre, cadmio y cromo, y sus compuestos sulfato de cobre, dicromato de potasio y cloruro de cadmio importancia en toxicidad acuática	11
2.2.1 Cobre	14
2.2.2 Sulfato de cobre (CuSO ₄)	16
2.2.3 Mecanismo de acción tóxica	18
2.2.4 Cromo	20
2.2.5 Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)	21
2.2.6 Mecanismo de acción toxica	23
2.2.7 Cadmio	25
2.2.8 Cloruro de cadmio (CdCl ₂)	27
2.2.9 Mecanismo de acción tóxica	27
2.3 BIOENSAYOS.....	30
2.4 BIOINDICADORES	34
2.4.1 El fitoplancton	36
2.4.2 Microalgas verdes	39
2.4.3 <i>Scenedesmus intermedius</i>	45
3. HIPÓTESIS	47
4. JUTIFICACIÓN	47
5. OBJETIVOS	49
5.1 Objetivo General	49
5.2 Objetivos específicos.....	49
6.MATERIAL Y MÉTODOS	50

6.1 Sustancias de ensayo.....	50
6.2 Material biológico	50
6.3 Ensayos de inhibición de crecimiento.....	50
6.4 Determinación de volumen celular.....	51
7. ANÁLISIS DE DATOS	52
7.1 Análisis estadístico para la obtención de $CI_{50(6d)}$ Y $NOEC_{(6d)}$	52
7.2 Determinación de las interacciones de las combinaciones de los productos químicos	52
7.3 Determinación de diferencias morfológicas en volumen celular	53
8. RESULTADOS	54
8.1 Respuesta de sulfato de cobre ($CuSO_4$), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y cloruro de cadmio ($CdCl_2$) sobre <i>Scenedesmus intermedius</i>	54
8.2 Respuesta de la mezcla de sulfato de cobre ($CuSO_4$), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y cloruro de cadmio ($CdCl_2$) sobre <i>Scenedesmus intermedius</i>	55
8.3 Análisis de morfología celular de <i>Scenedesmus intermedius</i>	61
9. DISCUSIÓN	66
10. CONCLUSIONES	79
11. RECOMENDACIONES	80
12. BIBLIOGRAFÍA	81

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. USO DE LOS METALES EN LA INDUSTRIA (GALINDO, 2016).....	10
TABLA 2. TIPOS DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN DEL COBRE (US EPA, 2019).	15
TABLA 3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL CuSO_4	16
TABLA 4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	22
TABLA 5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL CdCl_2	27
TABLA 6. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE BIOENSAYOS EN EL LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE SUSTANCIAS QUÍMICAS (RAMÍREZ & MENDOZA, 2008).	32
TABLA 7. TIPO DE CLOROFILA PRESENTE EN MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS (MIAZEK ET AL., 2015)	41
TABLA 8. TAXONOMÍA DE SCENEDESMUS	45
TABLA 9. MODELO GEOMÉTRICO PROLATE SPHEROID PARA LA DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN CELULAR EN SCENEDESMUS INTERMEDIUS (HILLEBRAND ET AL., 1999; SUN & LIU, 2003).	53
TABLA 10. VALORES DE LA IC_{50} Y NOEC DE LOS XENOBIÓTICOS SOBRE SCENEDESMUS INTERMEDIUS A 6D DE EXPOSICIÓN	55
TABLA 11. VALORES DEL ÍNDICE DE COMBINACIÓN (IC) DE LAS MEZCLAS BINARIAS DE LOS	56
TABLA 12. COMPARACIÓN ENTRE MEZCLAS CON RESPECTO A LA MEZCLA DE LAS 3 SALES METÁLICAS	58
TABLA 13. COMPARACIÓN DEL BIOVOLUMEN CALCULADO PARA LA 6D- NOEC Y LA $\text{IC}_{50(6D)}$ DE LOS XENOBIÓTICOS SOBRE S. INTERMEDIUS	61
TABLA 14. IC_{50} DE COBRE ANTE LA EXPOSICIÓN DE DIFERENTES ESPECIES.....	69
TABLA 15. IC_{50} DE CROMO ANTE LA EXPOSICIÓN DE DIFERENTES ESPECIES.....	71
TABLA 16. CI_{50} DE CADMIO EXPUESTO A DIFERENTES ESPECIES	73
TABLA 17. EFECTOS DE LAS MEZCLAS DE COMPUESTOS EXPUESTOS A DIFERENTES BIOINDICADORES.....	76

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. FA-LOG IC. EFECTOS DE LAS MEZCLAS BINARIAS DE PRODUCTOS QUÍMICOS EN EL ÍNDICE DE COMBINACIÓN (IC). (A) Y (B), REPRESENTAN LA COMBINACIÓN DEL CLORURO DE CADMIO CON DICROMATO DE POTASIO Y SULFATO DE COBRE. (C), REPRESENTA LA COMBINACIÓN DE DICROMATO DE POTASIO CON SULFATO DE COBRE. (D), REPRESENTA EL EFECTO DE LA MEZCLA DE LOS TRES PRODUCTOS QUÍMICOS EN EL ÍNDICE DE COMBINACIÓN.	57
GRÁFICA 2. EFECTO MEDIO DE LA MEZCLA BINARIA DE LOS XENOBIÓTICOS SOBRE SCENEDESMUS INTERMEDIUS. A) Y B), EFECTO DE LA MEZCLA BINARIA DE CdCl_2 CON $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Y CuSO_4 RESPECTIVAMENTE, COMPARADOS CON LA RESPUESTA INDIVIDUAL DE LOS XENOBIÓTICOS. C), EFECTO DE LA MEZCLA BINARIA DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{CuSO}_4$ COMPARADO CON LA RESPUESTA INDIVIDUAL DE LOS XENOBIÓTICOS. D), EFECTO DE LA MEZCLA DE LOS TRES XENOBIÓTICOS COMPARÁNDOLO CON LA RESPUESTA INDIVIDUAL DE ESTOS.	60
GRÁFICA 3. DIFERENCIAS ENTRE EL BIOVOLUMEN DE LAS CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $\text{NOEC}_{(6D)}$ DE LOS TRES XENOBIÓTICOS DE MANERA INDIVIDUAL Y EN COMBO.	62
GRÁFICA 4. DIFERENCIAS ENTRE EL BIOVOLUMEN DE LAS CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $\text{IC}_{50(6D)}$ DE LOS TRES XENOBIÓTICOS DE MANERA INDIVIDUAL Y EN COMBO.	62
GRÁFICA 5. DIFERENCIAS ENTRE EL BIOVOLUMEN DE LAS CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $\text{NOEC}_{(6D)}$ Y $\text{IC}_{50(6D)}$ DEL COMBO DE LOS XENOBIÓTICOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO DEL AGUA (BARCELÓ & LÓPEZ, 2012).....	7
FIGURA 2. UBICACIÓN DE LOS METALES EN LA TABLA PERIÓDICA.	11
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CuSO_4	16
FIGURA 4. FORMA COMERCIAL DE CuSO_4 (MERCK).....	17
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	22
FIGURA 6. FORMA COMERCIAL DEL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (FERMONT).....	22
FIGURA 7. INDUCCIÓN DE ROS EN LAS CÉLULAS CAUSADO POR METALES PESADOS (PINTO ET AL., 2003).	24
FIGURA 8. EXCLUSIÓN COMPETITIVA. CRECIMIENTO DE POBLACIONES DE <i>PARAMECIUM</i> (P. AURELIA Y P. CAUDATA) EN CULTIVOS SEPARADOS (A) Y CULTIVOS COMBINADOS (B) (HERNÁNDEZ, 2015).....	38
FIGURA 9. CADENA TRÓFICA.	39
FIGURA 10. EJEMPLOS COMUNES DE FORMAS ESTÁNDAR PARA EL CÁLCULO DE BIOVOLUMEN DE MICROALGAS (BELLINGER & SIGEE, 2015)	43
FIGURA 11. MECANISMO Y DIFERENTES GRUPOS FUNCIONALES QUE PARTICIPAN EN LA BIOSORCIÓN DE IONES METÁLICOS EN MICROALGAS (SH^- , COO^- , OH^- , PO_4^{3-} , ETC.) (ZERAATKAR ET AL., 2016).....	44
FIGURA 12. COLONIA DE <i>SCENEDESMUS INTERMEDIUS</i>	45
FIGURA 13. <i>SCENEDESMUS SP.</i> (BELLINGER & SIGEE, 2015).	46
FIGURA 14. POLIGONOGRAMA PARA LOS TRES XENOBIÓTICOS EN LA MEZCLA EN IC_{50} SOBRE <i>SCENEDESMUS INTERMEDIUS</i> . FA CORRESPONDIENTE AL EFECTO DE (A) 0.50%, (B) 10%, (C) 25%, (D) 50%, (F) 75%, (G) 95% Y (H) 100%.....	59
FIGURA 15. CÉLULA CONTROL DE <i>SCENEDESMUS INTERMEDIUS</i>	63
FIGURA 16. B), CÉLULA DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTA A LA $\text{IC}_{50(6D)}$ DE CuSO_4 . C), CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $\text{NOEC}_{(6D)}$ DE CuSO_4	63
FIGURA 17. D), CÉLULA DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTA A LA $\text{IC}_{50(6D)}$ DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. E), CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $\text{NOEC}_{(6D)}$ DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	63
FIGURA 18. F), CÉLULA DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTA A LA $\text{IC}_{50(6D)}$ DE CdCl_2 . G), CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $\text{NOEC}_{(6D)}$ DE CdCl_2	64

FIGURA 19. H), CÉLULA DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTA A LA $IC_{50(6D)}$ DEL COMBO DE LOS TRES XENOBIÓTICOS. I), CÉLULAS DE <i>S. INTERMEDIUS</i> EXPUESTAS A LA $NOEC_{(6D)}$ DEL COMBO DE LOS TRES XENOBIÓTICOS.....	64
---	----

ABREVIATURAS

CI₅₀: Inhibición de crecimiento al 50%.

EPA: Agencia de Protección Ambiental (Environmental Protection Agency).

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration).

GSH: Glutatión

IC: Índice de Combinación.

ISO: Organización Internacional de Normalización (International Standardization Organization).

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry).

LMP: Límite máximo permisible.

LOEC: Concentración del efecto más bajo observado (No observed effect concentration).

NOEC: Concentración sin efecto observado.

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (Organization for Economic Cooperation and Development).

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

SEMARNAT: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

Si: *Scenedesmus intermedius*.

WHO: Organización Mundial de la Salud (OMS).

GLOSARIO

Absorción (biológica): Proceso de entrada o transporte, activo o pasivo, de una sustancia al interior de un organismo; puede tener lugar a través de diferentes vías.

Acumulación: Sucesivas retenciones de una sustancia por un organismo diana, un órgano o una parte del medio ambiente, que conducen a un aumento de la cantidad o la concentración de la sustancia en los mismos.

Adición: La respuesta a una combinación de dos o más productos químicos es la suma aritmética de las respuestas individuales esperadas.

Antagonismo disposicional: se produce cuando el ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) de una sustancia química se altera de forma que la concentración y/o la duración de la sustancia en el órgano diana se ven disminuidos.

Antagonismo funcional: se produce cuando dos productos químicos se contrarrestan entre sí produciendo efectos opuestos sobre la misma función fisiológica.

Antagonismo químico: reacción entre dos compuestos que generan un producto menos tóxico.

Antagonismo receptorial: ocurre cuando dos sustancias se unen al mismo receptor produciendo un efecto menor que cuando son administrados de forma individual, o una antagoniza la acción del otro.

Antagonismo: La respuesta a una combinación de dos o más productos químicos es menor que la suma de las respuestas individuales esperadas.

Biodisponibilidad: Proporción de la dosis que una sustancia absorbida por cualquier vía alcanza en la circulación sistemática.

Bioensayo: Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etc.) mediante la

medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada.

Biomagnificación: Secuencia de procesos que conducen a aumentar la concentración de una sustancia en un organismo con respecto a la del medio que lo ha aportado. Acumulándose de forma creciente a lo largo de la cadena trófica. Se suele aplicar más a los ecosistemas más que a los individuos.

Biotransformación: Reacciones que convierten los tóxicos en especies químicas distintas que pueden ser menos o más tóxicas que el compuesto original.

Cadena trófica: 1. Secuencia de transferencia de materia y energía en forma de alimento de organismo en organismo en niveles tróficos ascendentes o descendentes (WHO, 1979). 2. Serie de organismos que se alimentan unos de otros, en cuya sucesión se transmiten y concentran, entre otras, sustancias tóxicas.

Cenobio: Colonia de algas cuyas células proceden de la bipartición de una inicial y cuya forma es determinada y constante para cada especie.

Concentración efectiva (CE): Proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto en un sistema dado; la CE₅₀ es la concentración que causa el 50% del efecto máximo.

Concentración inhibitoria media (CI₅₀): Concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que inhiba el crecimiento a la mitad en la cantidad de organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas.

Concentración inhibitoria: Concentración de tóxico que inhibe un proceso biológico, tal como la reproducción en un determinado porcentaje.

Concentración sin efecto observado (NOEC): Máxima concentración en términos del porcentaje, a la cual los organismos de ensayo son expuestos y no causa un efecto adverso determinado bajo condiciones idénticas a las de exposición.

Concentración: Cantidad de una sustancia, expresada en peso o en moles (S), por unidad de peso o volumen del medio en que se encuentra ($C = S \text{ Kg}^{-1}$; $C = S \text{ L}^{-1}$). Puede expresarse como porcentaje (riqueza). No es sinónimo de dosis.

Contaminante: 1. Agente microbiano indebidamente presente en un medio. 2. Impureza menor presente en una sustancia. 3. Material extraño inadvertidamente añadido a una muestra antes o durante el análisis químico o biológico. 4. Componentes indeseables en el medio ambiente.

Curva concentración-respuesta, (Dosis-Respuesta): Gráfico que relaciona la concentración de la exposición y la proporción de individuos de la población que manifiesta un efecto determinado.

Dosis tóxica: Proporción de una sustancia que produce intoxicación sin que llegue a ser letal.

Dosis: Cantidad de la sustancia administrada o absorbida (dosis interna) a un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24h.

Ecosistema acuático: Es la unidad funcional básica de interacción de los organismos vivos entre sí y de estos con el ambiente acuático en un espacio y tiempo determinado.

Efecto: Cambio biológico, tanto en organismos individuales como a niveles superiores de organización; se relaciona con la exposición a un xenobiótico.

Efluente: Fluido procedente de una instalación industrial.

Ensayo de toxicidad aguda: Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto periodo después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24 h.

Ensayo de toxicidad: Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y bajo condiciones definidas.

Ensayos: 1. En toxicología analítica: análisis cualitativo o cuantitativo por aplicación de métodos establecidos y la comparación de los resultados con estándares previstos. 2. En toxicología experimental: evaluación de los efectos tóxicos potenciales de las sustancias mediante su aplicación, a diferentes dosis, a organismos apropiados o sistemas biológicos por vías adecuadas de exposición o administración.

Evaluación del riesgo: Establecimiento de las relaciones cualitativas y cuantitativas entre riesgos y beneficios, a través de un complejo proceso de determinación de los peligros identificados y estimados para aquellos organismos o poblaciones que puedan ser afectados.

Exposición: Es el contacto de un agente químico, físico o biológico a una concentración determinada y durante un intervalo de tiempo.

Hormesis: 1. Es un fenómeno de relación entre la dosis y la respuesta, caracterizada por estimulación a bajas dosis e inhibición con altas dosis, ha sido frecuentemente observada en estudios adecuadamente diseñados, y es ampliamente generalizable como independiente de los agentes fisicoquímicos, el modelo biológico y el objetivo de evaluación. 2. Respuesta adaptativa caracterizada por una dosis-respuesta bifásica (activación-inhibición) que puede ser, o bien directamente inducida, dependiendo del rango y amplitud del estímulo, o bien el resultado de procesos biológicos compensatorios que aparecen después de una disrupción en la homeostasis celular o del organismo.

Índices de toxicidad: Expresan los resultados de diferentes ensayos de toxicidad como un único valor numérico que clasifica a la muestra.

Límite máximo permisible (LMP): Valor o rango asignado a un parámetro, el cual no debe ser excedido en la descarga de aguas residuales.

Peligro: Posibilidad de que un agente produzca efectos dañinos, a causa de sus propiedades específicas y a las circunstancias y grado de la exposición.

Riesgo: Probabilidad de que se produzcan efectos adversos o daños por exposición a un agente tóxico, a causa de las propiedades inherentes del mismo y a las circunstancias o grados de la exposición.

Sinergismo: Efecto que se produce cuando los efectos de la combinación de dos productos químicos son mucho mayores que la suma matemática de sus efectos en forma individual.

Toxicidad aguda: Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 d) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 h.

Toxicidad crónica. Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos consecuentes a una exposición prolongada (semanas, meses o años). Los efectos pueden aparecer durante la exposición o después de interrumpida.

Toxicidad. Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetida), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Tóxico: Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales.

Xenobiótico: En sentido estricto, cualquier sustancia que interactúa con un organismo y que no es uno de sus componentes naturales (sustancia exógena). Es decir, son sustancias sintetizadas químicamente produciendo un efecto adverso sobre el organismo.

RESUMEN

Los procesos antropogénicos aumentan continuamente la cantidad de metales en el ambiente, especialmente en los ecosistemas acuáticos. Los metales son uno de los agentes tóxicos más persistentes en el medio ambiente pudiendo biocumularse y biomagnificarse a través de la cadena trófica y, finalmente, implicar un riesgo para el hombre; sin embargo, la exposición a estos no suele ser individual y aparece en mezcla, siendo este aún un campo poco estudiado dentro de las sustancias químicas. En este trabajo se determinó el efecto tóxico del sulfato de cobre, cloruro de cadmio y del dicromato de potasio de manera individual y en mezcla sobre el crecimiento del bioindicador: la microalga verde *Scenedesmus intermedius* (Si). Los valores obtenidos de la IC₅₀ a los 6 días de exposición mostraron que el compuesto que presentó mayor toxicidad de manera individual fue el CdCl₂ con una IC₅₀ de 0.13mg/L (0.033-0.32), seguido por el CuSO₄ con una IC₅₀ de 0.71 mg/L (0.22-1.05), y por último el K₂Cr₂O₇ con una IC₅₀ de 1.19 mg/L (0.58-2.25). En el estudio de mezclas binarias la respuesta de CdCl₂/CuSO₄ a concentraciones bajas presentó una respuesta antagónica (IC=2.26) pero a concentraciones altas la respuesta fue sinérgica (IC=0.18); mientras que las respuestas de las mezclas de CdCl₂/K₂Cr₂O₇ y K₂Cr₂O₇/CuSO₄ se tradujeron en un antagonismo de diferentes magnitudes con un IC=15.47-2.26 y IC=26.60-2.26 respectivamente. Un análisis posterior realizado para valorar el volumen celular en células expuestas a las concentraciones de 6d-NOEC indicaron que el CuSO₄ y el CdCl₂ no mostraron cambios con respecto a control, pero K₂Cr₂O₇ y la mezcla de los tres xenobióticos presentaron cambios significativos en su volumen con respecto a control. Sin embargo, la exposición de las células de Si a la IC_{50(6d)} indicó que hubo cambios significativos en su volumen con respecto a control para K₂Cr₂O₇, CdCl₂ y el combo de los tres xenobióticos, mientras que para CuSO₄ no hubo alteración en su volumen.

Palabras clave: Cobre, Cadmio, Cromo, inhibición de crecimiento, *Scenedesmus intermedius*, mezclas de metales, volumen celular.

ABSTRAC

Anthropogenic processes continuously increase the amount of metals in the environment, especially in aquatic ecosystems. Metals are one of the most persistent toxic agents in the environment and can bioaccumulate and biomagnify through the trophic chain and, finally, involve a risk for humans; However, exposure to these is not usually individual and appears in a mixture, this being still a little studied field within the chemical substances. In this work the toxic effect of copper sulfate, cadmium chloride and potassium dichromate was determined individually and in a mixture on the growth of the bioindicator: the green microalgae *Scenedesmus intermedius* (Si). The values obtained from the IC₅₀ at 6 days of exposure showed that the compound with the highest individual toxicity was CdCl₂ with an IC₅₀ of 0.13mg/L (0.033-0.32), followed by CuSO₄ with an IC₅₀ of 0.71 mg/L (0.22-1.05), and finally K₂Cr₂O₇ with an IC₅₀ of 1.19 mg/L (0.58-2.25). In the study of binary mixtures the response of CdCl₂/CuSO₄ at low concentrations presented an antagonistic response (CI=2.26) but at high concentrations the response was synergistic (CI=0.18); whereas the responses of the mixtures of CdCl₂/K₂Cr₂O₇ and K₂Cr₂O₇/CuSO₄ resulted in an antagonism of different magnitudes with an IC=15.47-2.26 and IC=26.60-2.26 respectively. A subsequent analysis to assess cell volume in cells exposed to 6d-NOEC concentrations indicated that CuSO₄ and CdCl₂ showed no changes with respect to control, but K₂Cr₂O₇ and the mixture of the three xenobiotics presented significant changes in their volume with regarding control. However, the exposure of the Si cells to the IC_{50(6d)} indicated that there were significant changes in their volume with respect to control for K₂Cr₂O₇, CdCl₂ and the combo of the three xenobiotics, while for CuSO₄ there was no alteration in its volume.

Key words: Copper, Cadmium, Chromium, growth inhibition, *Scenedesmus intermedius*, metal mixtures, cell volume.

1.INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico, el crecimiento demográfico, la industrialización y el uso de nuevos métodos de agricultura son factores que contribuyen a que entren en el ambiente, de manera continua, cantidades crecientes de un gran número de sustancias químicas, sintéticas y naturales, cuyas interacciones y efectos adversos en general, no se conocen o aún no existe información suficiente (Albert, 2013). Cuando las formas de materia o energía son de tal clase que los seres vivos o el ambiente abiótico los pueden asimilar, eliminar o transformar continuamente, se puede considerar que existe una situación estable. Sin embargo, los efectos adversos ocurren cuando las sustancias no pueden eliminarse fácilmente del ecosistema y exceden las concentraciones traza, o bien, porque solo pueden pasar sin cambios de un ecosistema a otro, lo que da como resultado una acumulación excesiva en un punto final (Turk et al., 2004).

Se ha encontrado que los contaminantes, en especial los metales pesados, son peligrosos para todo el ecosistema. Por un lado, se encuentra que los elementos metálicos son esenciales para la vida, un ejemplo de ello es, el hierro en la hemoglobina, pero estos resultan tóxicos cuando la concentración excede los límites traza pudiéndose incorporar a organismos vivos (plantas, animales y humanos) por vía del alimento y a través del agua dependiendo de su movilidad en dichos medios (Lucho et al., 2005; Ferrer, 2003). Otro aspecto, es que los metales pesados son persistentes en el medio ambiente, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser degradados por microorganismos, y tienen la capacidad de biocumularse y por lo tanto biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica (Gallego et al., 2007).

Por lo tanto, es importante determinar el nivel de riesgo ambiental de los metales pesados sobre diversos representantes de los ecosistemas utilizando bioensayos ecotoxicológicos (Iannacone et al., 1999; Arkhipchuk et al., 2000). En los ecosistemas acuáticos la mayoría de las evaluaciones de la toxicidad de metales en organismos acuáticos se centran en la exposición de forma individual de estos, sin embargo, las exposiciones ambientales reales se producen como mezclas de

metales (Newton, 2015) o cualquier otro tóxico que se encuentre en el ambiente, sea orgánico o inorgánico. De tal manera que, las técnicas de evaluación de riesgos para contaminantes que afectan estos ecosistemas ya no deben restringirse a tóxicos individuales y, en su lugar, se deben considerar los efectos combinados (sean antagónicos, aditivos o sinérgicos), que resultan de las exposiciones químicas múltiples (Backhaus et al., 2003; Cortés et al., 2018).

En este contexto, la toxicología acuática proporciona herramientas que ayudan a la detección y control de descargas de residuos peligrosos. Una de ellas es el análisis detallado de las propiedades físicas y químicas de los contaminantes, lo cual permite en algunos casos, evaluar el grado de riesgo que presenta para los organismos acuáticos y de esta forma hacer predicciones con un alto grado de confiabilidad. Sin embargo, la caracterización química de los contaminantes es bastante compleja y costosa, por lo cual se contempla el uso de pruebas biológicas como complemento de los análisis fisicoquímicos (Gómez et al., 2001). Estas pruebas ayudan a evaluar la calidad de los efluentes y de esta forma prevenir o alertar sobre riesgos en el ecosistema (Blaise et al., 1997; Persoone et al., 2003).

En ecotoxicología se utilizan bioensayos que proporcionan información para la evaluación del riesgo e investigan los efectos y mecanismos de acción de nuevas sustancias químicas. Además, se usan modelos ecotoxicológicos para la detección, control y monitorización de la presencia de contaminantes en el agua, el suelo, residuos, etc. (Repetto et al., 2001).

Actualmente se utilizan diferentes especies de organismos acuáticos y terrestre de varios niveles filogenéticos como “indicadores” para determinar los efectos tóxicos de contaminantes vertidos o liberados en el ecosistema, aunque no es aconsejable realizar bioensayos con un sólo grupo de organismos o con sólo una especie para emitir un diagnóstico en caso de contaminación hídrica (Blaise et al., 1997; Castillo et al., 2000). Lo indicado es utilizar una “batería” de bioensayos que incluya organismos que representan distintos niveles tróficos (descomponedores, productores y consumidores), de esta forma, se pueden evaluar procesos de biomagnificación en la cadena alimenticia y extrapolar los datos experimentales de

las pruebas de toxicidad a los efectos del ecosistema. En la legislación de varios países como Estados Unidos, Canadá y los de la Comunidad Europea, se han incluido los ensayos con organismos vivos para cuantificar el grado de toxicidad de efluentes industriales, aguas residuales y/o residuos sólidos, para determinar los límites de descarga y los efectos tóxicos sobre la biota (Persoone et al., 2003; Arensberg et al., 1995). Estos bioensayos han sido estandarizados por organizaciones internacionales de regulación y control (CEE, ASTM, ISO, WHO, USEPA) que los utilizan en la evaluación de la carga tóxica de vertimientos al medio acuático (López, 2009).

En base a esto, determinar la respuesta tóxica de los compuestos metálicos de forma individual y en mezcla utilizando bioensayos con bioindicadores, nos puede brindar fiabilidad de resultados y una buena relación entre el costo-eficacia de los bioensayos ecotoxicológicos, además de aportar información ecotoxicológica que permita conocer el tipo de interacción que ocurre entre metales, generando una mejor predicción de los efectos sobre los organismos acuáticos que habitan dichos ecosistemas. Por ello, en esta investigación se propuso determinar el efecto tóxico del sulfato de cobre, cloruro de cadmio y del dicromato de potasio de manera individual y en mezcla sobre el crecimiento del bioindicador, la microalga verde *Scenedesmus intermedius* (Si), un buen representante del primer nivel trófico y productor primario.

2.MARCO TEÓRICO

A la acumulación de materia o energía en un sistema dado se le conoce como contaminación. Por lo tanto, las sustancias que exceden las concentraciones naturales en un sistema y le generan daño, son contaminantes tóxicos (Jaramillo J., 2008). El problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable ya a principios del siglo XIX y cabe añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta (Barceló & López, 2012, 2012).

Los problemas graves en el ambiente aparecen cuando la contaminación se extiende en el tiempo y en el espacio, es decir, cuando el número y la clase de los sistemas o sustratos contaminados aumentan y permanecen así por períodos prolongados. Siendo así, como se rompe entonces el equilibrio ecológico y aparecen los efectos adversos (Jaramillo J. et al., 2008).

Según la naturaleza del agente contaminante suele distinguirse entre contaminación biológica, contaminación física y contaminación química (Jaramillo J. et al., 2008). Dependiendo del medio en que se acumulen los contaminantes, se puede hablar de contaminación del aire, suelo y agua; y en cada caso presenta características propias que requieren medidas de prevención (Alloway et al., 1997; Bautista, 1999).

El término “contaminación atmosférica” hace referencia a sustancias que ocasionan daños directos sobre animales, plantas y personas; es decir, ejercen un efecto local o regional (Spiro & Stigliani, 2004). Los contaminantes emitidos hacia la atmosfera son producidos de manera antropogénica o son de naturaleza biogénica (contaminantes naturales) generados por diversas fuentes. A demás, estos contaminantes se pueden encontrar en forma gaseosa, líquida o sólida. Por lo tanto, en la atmosfera existen polvos, materia en partículas, aerosoles, vapor, neblinas, etc. (Jaramillo J. et al., 2008). Los contaminantes más comunes son el monóxido de carbono, dióxido de azufre, los cloroflucarbonos y los óxidos de nitrógeno

producidos por la industria y los gases producidos en la combustión de los vehículos (Alfaro, 1999).

La contaminación del suelo se da por la incorporación de elementos extraños en el suelo, de tal forma que, estos generan un efecto nocivo para los organismos presentes en él y sus consumidores. Entre los contaminantes del suelo más significativos se encuentran los hidrocarburos como el petróleo y sus derivados, los metales pesados frecuentes en baterías, los herbicidas y plaguicidas generalmente rociados a los cultivos industriales y monocultivos y organoclorados producidos por la industria. Esta contaminación puede afectar a la salud de forma directa y entrar en contacto con fuentes de agua potable (San Juan, 2010).

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias (Barceló & López, 2012). Por lo que los impactos como la contaminación inducen a cambios en la estructura de las comunidades, la función biológica de los sistemas acuáticos y de los propios organismos que habitan en los sistemas acuáticos, afectando su ciclo de vida, crecimiento y su condición reproductiva (Vázquez et al., 2006).

Una de las medidas para la conservación del ecosistema implica, evaluar los efectos sobre la biota que los habita y desarrollar normas de gestión adecuadas en base a los niveles guía determinados en campo y laboratorios (Baudouin & Scoppa, 1974). De esta manera, empresas productoras y fabricantes de productos químicos editan hojas de datos de seguridad de estos productos, cuyo fin fundamental es transmitir los conocimientos de los datos ecotoxicológicos, indispensables en cuanto a precauciones de manipulación y vertido de residuos (Riva, 1991).

2.1 Contaminación del agua

Se entiende por contaminación de agua a la introducción de un exceso de materia o energía en la hidrósfera, la cual genera un deterioro en la calidad del agua (Jaramillo J. et al., 2008). La contaminación del agua se produce por vertimientos de origen industrial o municipal, residuos agrícolas, drenajes de minas y lixiviados de rellenos sanitarios los cuales son liberados al medio ambiente sin ningún control o por fuentes difusas a través de la erosión. Estas fuentes de contaminación pueden contener sustancias potencialmente tóxicas para la biota acuática deteriorando las condiciones en que sobreviven plantas y animales, con respecto a cambios en su reproducción, desarrollo, comportamiento o supervivencia. Adicionalmente, las transformaciones o interacciones que se pueden presentar entre las sustancias tóxicas y con ligandos orgánicos e inorgánicos pueden producir fenómenos de complejación o especiación, aumentando o disminuyendo la toxicidad por medio de efectos de sinergismo, antagonismo o aditividad (Gómez et al., 2001)

La contaminación de los cuerpos de agua continentales constituyen un serio problema que afecta las actividades productivas poniendo en riesgo la cantidad y calidad del agua que se destina, inclusive, para el servicio urbano (Torres B. et al., 2007).

Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de las sequías y el cambio climático (Alaee M, 2003).

La aparición de elementos “no deseables” y tóxicos, y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tienen su origen en el denominado

“ciclo del agua” (**Figura 1**). En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que incluyen las urbanas, industriales y las de origen agrícola. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural (si existe) que experimentan (Barceló & López, 2012).

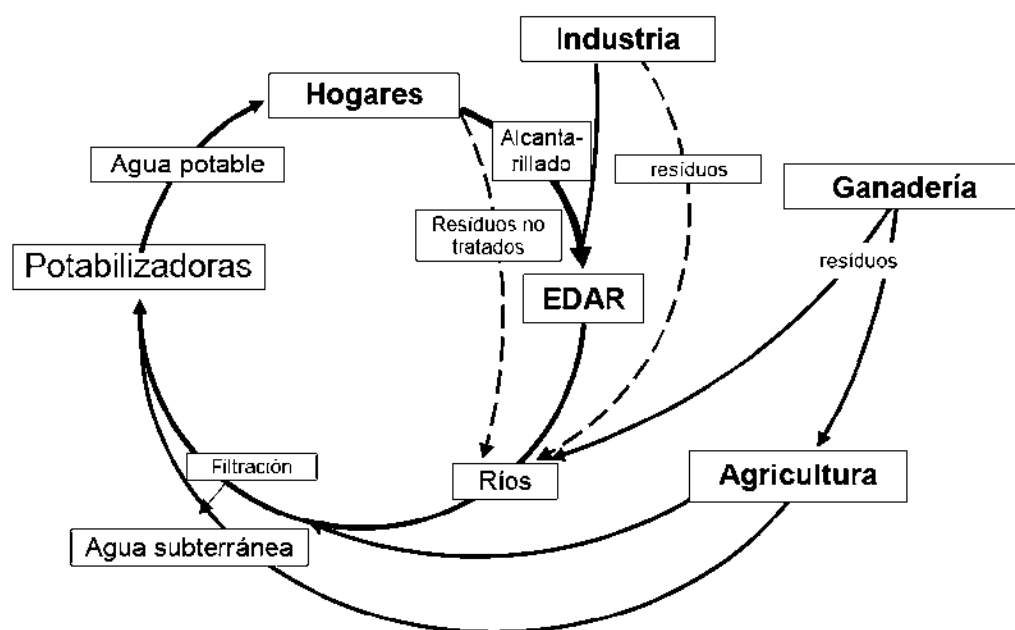


Figura 1. Ciclo del agua (Barceló & López, 2012).

Spiro y Stigliani (2004), mencionan que en relación con la calidad del agua, existen dos principales fuentes de contaminantes por los cuales pueden introducirse a la hidrósfera:

- Las fuentes puntuales, son tuberías que descargan directamente en los cuerpos de agua naturales, tales como descargas de plantas de tratamiento de agua, descargas municipales, descargas industriales, plantas hidroeléctricas, etc.

- Las fuentes no puntuales, introducen contaminantes en las aguas naturales a través de escurrimientos.

En la actualidad, el problema más serio proviene de las fuentes no puntuales, ya que estas incluyen emisiones procedentes de vehículos, escorrentía agrícola y urbana que descarga mediante el arrastre por el agua de lluvia, compuestos orgánicos y metales a los ríos y lagos (Spiro & Stigliani, 2004). Sin embargo, las descargas de fuentes no puntuales, por lo general, son más difíciles de identificar y regular (Jaramillo J. et al., 2008).

Los efectos que la contaminación química del agua produce son múltiples; entre los más importantes cabe destacar:

- Acción tóxica y cancerígena
- Incidencia sobre la producción de alimentos
- Limitación del uso del agua con fines recreativos
- Reducción de las posibilidades de su uso industrial y agropecuario

Los riesgos que siguen a la contaminación del agua son difíciles de precisar, ya que muchas veces las dosis tóxicas sobre las cuales se trabaja son muy pequeñas, y el problema aún se complica más por la presencia simultánea de diversos contaminantes (Barceló & López, 2012).

La actual decadencia de la calidad ambiental aunado al sin número de compuestos y mezclas a las que están expuestos los sistemas biológicos del planeta, crea la necesidad de determinar el impacto biológico en los diferentes niveles que se pueden presentar (Romero & Cantú, 2004).

2.1.1 Contaminación del agua por la mezcla de compuestos metálicos

Existe una relación muy estrecha entre la evolución de la biosfera y los elementos de la tabla periódica, en realidad, todos los organismos, desde sus primeras etapas evolutivas han aprovechado las propiedades químicas de muchos iones metálicos por el desarrollo de sus funciones bioquímicas esenciales. A consecuencia de esto, estos elementos metálicos, aún en pequeñas concentraciones son imprescindibles para el desarrollo de sus funciones vitales (Spiro & Stigliani, 2004).

Los sedimentos son un componente ecológicamente importante en el hábitat acuático, y es un reservorio natural de contaminación (Chapman, 1989). La existencia de estos sedimentos es debido, tanto a los vertidos incontrolados desde industrias, como a la utilización de productos químicos que van a parar a los sedimentos una vez que son transportados desde zonas agrícolas por las aguas (Hondal et al., 2003).

Por lo tanto, la contaminación de los cuerpos de agua radica en la eutrofización, que es causada por la liberación de compuestos orgánicos e inorgánicos al medio (Hernández & Labbé, 2014), siendo depositados y concentrados en los sedimentos acuáticos. De esta manera, pueden ser un componente seguro de contaminantes de entrada que progresivamente va aumentando con la contaminación acumulada desde fuentes crónicas y de contaminantes retenidos vario tiempo atrás (Hondal et al., 2003).

En la actualidad, la exposición a elementos metálicos se produce de forma específica por un gran número de actividades industriales y actividades agrícolas que implica la manipulación de metales (**Tabla 1**); pero, además, la población en general, entra en contacto con ellos a través del agua, los alimentos y el ambiente donde su presencia se ha incrementado por la intervención de la actividad humana sobre los ciclos hidrogeológicos (Ferrer, 2003).

Tabla 1. Uso de los metales en la industria (Galindo, 2016).

INDUSTRIA	METAL	FUNCIÓN
Pinturas	Hg, Zn, Pb, Cr, Cd , Co, Ni	Materia prima para pinturas
Textil	Zn, Pb, Cr, Cd , Ni	Materia prima para pinturas
Galvanizados	Zn, Pb, Cr, Cu , Ni	Materia prima para pinturas
Papelera	Zn, Pb, Cd	Materia prima para el proceso
Industria gráfica	Pb, Cd	Materia prima para los tintes
Plásticos	Cr , Ni, As	Aditivo catalizador
Curtidos y pieles	Zn, Pb, Cr	Aditivo catalizador

Sin embargo, actualmente tenemos una compresión mecánica limitada de por qué algunas especies son sensibles a los contaminantes y otras son tolerables. Para proteger a los organismos que habitan estos ecosistemas, se han establecido normas y/o regulaciones ambientales basadas en concentraciones totales y disueltas máximas de los elementos metálicos en forma individual, sin considerar el papel que juegan los factores ambientales (Gaete & Chávez, 2008). De esta manera, las pautas de calidad del agua para metales se derivan cada vez más de las distribuciones de sensibilidad de especies. Tanto los factores abióticos: como el pH, la salinidad, etc. y los factores bióticos: como la vía de captación, el tamaño, la edad del organismo y los procesos internos de desintoxicación, pueden influir en la tolerancia de los compuestos metálicos (Levy et al., 2007). Otro factor que puede afectar la toxicidad individual de un contaminante metálico es la presencia de otros contaminantes, debido a las interacciones que ocurren en mezcla (sinérgica, antagónica y aditiva) (Faust et al., 2003; Ren et al., 2004).

Debido a esto, en los últimos años ha habido un creciente interés por los estudios de las interacciones entre los compuestos metálicos, que permita predecir su impacto sobre los organismos que habitan los ecosistemas acuáticos (Gramatica et al., 2001, Barata et al., 2006; Gaete & Chávez, 2008).

2.2 Metales cobre, cadmio y cromo, y sus compuestos sulfato de cobre, dicromato de potasio y cloruro de cadmio importancia en toxicidad acuática

El contenido de los metales en la corteza terrestre es inferior a 0.1% y, en general, se encuentran en los minerales, rocas, suelo y agua, a concentraciones usualmente bajas. Sin embargo, las actividades antropogénicas han aumentado sus concentraciones en el ambiente (Jaramillo J. et al., 2008).

Se llama metales a los elementos químicos situados a la izquierda y centro de la tabla periódica (**Figura 2**). Se clasifican en metales alcalinos y alcalinotérreos de grupos I y II A, los metales de transición en los grupos III y IV A. En estos grupos se encuentran metales muy relevantes desde el punto de vista toxicológico (Ferrer, 2003).

Metales Alcalinos		La Tabla Periódica																Gases Nobles			
Alcalinoterreos		Metales de transición										Halogenos						Grupo Principal			
1 1A	2 2A	3 3B	4 4B	5 5B	6 6B	7 7B	8 8B	9 9B	10 10B	11 1B	12 2B	13 3A	14 4A	15 5A	16 6A	17 7A	18 8A				
1 H 1.00794	2 He 4.00260	3 Li 6.941	4 Be 9.01218	5 B 10.811	6 C 12.011	7 N 14.0067	8 O 15.9994	9 F 18.9984	10 Ne 20.1797	11 Na 22.9898	12 Mg 24.3050	13 Al 26.9815	14 Si 28.0855	15 P 30.9738	16 S 32.066	17 Cl 35.4527	18 Ar 39.948				
19 K 39.0983	20 Ca 40.078	21 Sc 44.9559	22 Ti 47.88	23 V 50.9415	24 Cr 51.9961	25 Mn 54.9381	26 Fe 55.847	27 Co 58.9332	28 Ni 58.693	29 Cu 63.546	30 Zn 65.39	31 Ga 69.723	32 Ge 72.61	33 As 74.9216	34 Se 78.96	35 Br 79.904	36 Kr 83.80				
37 Rb 85.4678	38 Sr 87.62	39 Y 88.9059	40 Zr 91.224	41 Nb 92.9064	42 Mo 95.94	43 Tc (98)	44 Ru 101.07	45 Rh 102.906	46 Pd 106.42	47 Ag 107.868	48 Cd 112.411	49 In 114.818	50 Sn 118.710	51 Sb 121.757	52 Te 127.60	53 I 126.904	54 Xe 131.29				
55 Cs 132.905	56 Ba 137.327	57 *La 138.906	72 Hf 178.49	73 Ta 180.948	74 W 183.84	75 Re 186.207	76 Os 190.23	77 Ir 192.22	78 Pt 195.08	79 Au 196.967	80 Hg 200.59	81 Tl 204.383	82 Pb 207.2	83 Bi 208.980	84 Po (209)	85 At (210)	86 Rn (222)				
87 Fr (223)	88 Ra 226.025	89 *Ac 227.028	104 Rf (261)	105 Db (262)	106 Sg (263)	107 Bh (262)	108 Hs (265)	109 Mt (266)	110 (269)	111 (272)	112 (272)	114 (287)	116 (289)	118 (293)	119 (293)	120 (293)	121 (293)				
*Lanthanide series																					
†Actinide series																					
Grupo Principal		Lantanidos y Actínidos																			
		58 Ce 140.115	59 Pr 140.908	60 Nd 144.24	61 Pm (145)	62 Sm 150.36	63 Eu 151.965	64 Gd 157.25	65 Tb 158.925	66 Dy 162.50	67 Ho 164.930	68 Er 167.26	69 Tm 168.934	70 Yb 173.04	71 Lu 174.967	72 (175)	73 (175)				
		90 Th 232.038	91 Pa 231.036	92 U 238.029	93 Np 237.048	94 Pu (244)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (260)	104 (260)	105 (260)				

Figura 2. Ubicación de los metales en la Tabla Periódica.

Sus características químicas se basan en su estructura electrónica que condiciona las preferencias de enlace en que predominan el enlace metálico, que se establece entre átomos del mismo elemento. Así los elementos metálicos dan lugar a diferentes tipos de compuestos (Ferrer, 2003):

- Metales en estado elemental
- Compuestos inorgánicos: halogenuros, hidroxilos, oxoácidos.
- Compuestos orgánicos: alquilos, acetos, fenilos.

La actividad humana, el desarrollo de la industria y los procesos naturales de la Tierra llevan a la liberación de numerosos metales (Fe, Zn, Cu, Cd, Cr, Ni, Hg, Pb, La, Li, V), metaloides (As, Te) y nanopartículas metálicas (Ag, Pt, TiO₂, ZnO, CeO₂, NiO, BaTiO₃, Y₂O₃, Al₂O₃), aunque pueden actuar como factores estresantes o moduladores para el crecimiento y metabolismos de diversos organismos (Miazek et al., 2015).

El término de “metal pesado” hace referencia a cualquier elemento metálico que tenga una densidad relativamente alta y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Los ejemplos de metales pesados o algunos metaloides, incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb), entre otros (Prieto et al., 2009).

Los metales pesados también se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre. No obstante, estos no pueden ser degradados o destruidos fácilmente de forma natural o biológica ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos (Abollino et al., 2002). Si bien, los metales pesados tienen una actividad tóxica reconocida a concentraciones altas, los organismos vivos tienen necesidad vital de alguno de ellos, ya que son necesarios para diversas funciones fisiológicas (Prieto et al., 2009). Un ejemplo de ello son los metales como el cobre (Cu) y el zinc (Zn) que son esenciales para la vida, mientras que otros como el plomo (Pb) y el mercurio (Hg) no tienen una función bioquímica útil (Pinto et al., 2003).

En el ambiente natural, los organismos que viven en sitios con contaminación crónica, están expuestos a bajas concentraciones de metales durante largos períodos. En otros casos, los organismos pueden exponerse bruscamente a altos niveles de metales al caer un contaminante en las aguas costeras (Pinto et al., 2003).

La toxicidad de los metales depende tanto del estado de oxidación y la forma (como catión o anión), su tendencia a formar complejos con ligandos (Langmuir, et al., 2005), y sus características de hidrosolubilidad o liposolubilidad, que determina su toxicocinética y por tanto la posibilidad de alcanzar sus dianas. Los principales sistemas afectados son el gastrointestinal, neurológico central y periférico, hemático y renal; algunos de los compuestos metálicos son carcinógenos (Ferrer, 2003)

A su vez, los metales pesados se destacan por su toxicidad sobre los organismos en los ecosistemas acuáticos (Hellawell, 1992), su efecto se relaciona con una alteración de la homeostasis de cationes como Ca^{+2} , Mg^{+2} , afectando el transporte a nivel de membrana celular (Pane et al., 2003). También afectan los mecanismos de respiración disminuyendo la tasa de respiración, además, como en el caso del cobre, este aumenta la fragilidad de la membrana lisosomal liberando enzimas hidrolíticas (Khangarot & Rathore, 2003).

La realidad es que el mecanismo subyacente de la toxicidad de los metales pesados no siempre está claro. Sin embargo, dependiendo de su estado de oxidación, pueden ser altamente reactivos y, como consecuencia, tóxicos para la mayoría de los organismos. Y de manera más general, la toxicidad de estos está relacionada, al menos en parte, con el estrés oxidativo inducido en los sistemas vivos (Quinlan et al. 1988; Robinson et al. 1994; Okamoto y Colepicolo 1998; Adonaylo et al., 1999; Livingstone, 2001; Wang & Shi, 2001). Así mismo, pueden promover el daño oxidativo al incrementar directamente la concentración celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y reducir la capacidad antioxidante celular (Pinto et al., 2003).

Muchos factores ambientales pueden inducir estrés oxidativo en la célula por generación de O_2 . Por lo tanto, la modulación de los niveles de antioxidantes

constituye una respuesta adaptativa importante para soportar condiciones adversas. De hecho, el mantenimiento de una alta capacidad antioxidante en las células se ha relacionado con una mayor tolerancia frente a diferentes tipos de estrés ambiental (Pedrajas et al. 1993; Dat et al. 1998; Thomas et al. 1999; Pinto et al., 2003).

2.2.1 Cobre

El cobre (Cu), es un oligoelemento abundante que se produce naturalmente en la corteza terrestre y en las aguas superficiales. Se puede encontrar como un metal puro en la naturaleza y tiene una alta conductividad térmica y eléctrica. Los compuestos de cobre se encuentran generalmente como sales de cobre (II) (US EPA, 2019).

El Cu, es un metal de transición de coloración rojiza y brillo metálico que, este puede ser fácilmente moldeado o forjado. Posee varias propiedades físicas que propician su uso industrial en múltiples aplicaciones, siendo el tercer metal, después del hierro y del aluminio, más usado en el mundo (Yan & Pan, 2002).

Se puede encontrar en mezclas (llamadas aleaciones) con otros metales tales como latón (aleación de cobre y zinc) y bronce. También se encuentra como parte de otros compuestos formando sales. Estas sales de cobre ocurren naturalmente, pero también son manufacturadas. La sal de cobre más común es el sulfato de cobre (CuSO_4). La mayoría de los compuestos de cobre son de color azul-verde (ATSDR, 2002).

Sin embargo, este metal puede llegar a incorporarse a un sistema de abastecimiento de agua por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, lo que posteriormente se deposita en lagos, ríos y distintos acuíferos (Prieto et al., 2009) Estos proceso que influyen en el destino del cobre sobre los sistemas acuáticos incluyen: complejación con ligandos orgánicos e inorgánicos, sorción de óxidos de metales, arcillas, partículas y material orgánico,

bioacumulación y el intercambio entre los sedimentos y agua. Gran parte del cobre vertido al agua es en forma de partículas y tiende a sedimentarse, a precipitarse o es absorbido por la materia orgánica, por hierro hidratado, arcilla y óxidos de manganeso en el agua o por los sedimentos de la columna de agua (Velasco et al., 2006).

La US EPA (2019), menciona que el cobre se encuentra comúnmente en los sistemas acuáticos como resultado de fuentes naturales y antropogénicas (**Tabla 2**):

Tabla 2. Tipos de fuentes de contaminación del Cobre (US EPA, 2019).

Fuentes naturales	Fuentes antropogénicas
Depósitos geológicos	Actividades mineras y agricultura
Actividad volcánica	Manufactura eléctrica
Meteorización	Lodos de obras de tratamiento de propiedad publica
Erosión de rocas y suelos	Uso de pesticidas

Otra de las fuentes importantes de cobre en el ambiente marino son las pinturas antiincrustantes, usadas como recubrimiento para cascos de barcos, boyas y superficies submarinas, y como un contaminante de cubiertas, pilotes y algunas estructuras marinas que utilizan maderas tratadas con arsenato de cobre cromado (CCA) (US EPA, 2019).

De esta manera, el cobre es uno de los contaminantes más importantes y potencialmente tóxicos (Chang & Sibley, 1993). Por un lado, el Cu es importante para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas y especies acuáticas. Participa en numerosos procesos fisiológicos, principalmente en el transporte de electrones en la fotosíntesis, el metabolismo de la pared celular y respiración mitocondrial (Yruela, 2009). Es esencial su papel como cofactor para varias enzimas relacionadas con el estrés oxidativo como: la catalasa, la superóxido dismutasa o la peroxidasa (Tchounwou et al., 2012). Sin embargo, se ha considerado un

contaminante importante de los cuerpos de agua, clasificándose como extremadamente tóxico (Heath, 1991), representando un riesgo potencial para la vida acuática, cuando el exceso de Cu está presente en las células (Strejckova et al., 2016).

En los organismos presentes en el ambiente acuático se ha encontrado que, en el caso de las microalgas, la toxicidad del cobre está relacionada principalmente con los iones libres y su sensibilidad varía entre algas (Chang y Sibley, 1993). Además, se encontró que tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular y un efecto negativo sobre la fotosíntesis de las microalgas presentes en estos ambientes (Strejckova et al., 2016).

2.2.2 Sulfato de cobre (CuSO_4)

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), La nomenclatura química del CuSO_4 es tetraoxosulfato (VI) de cobre (II) o conocido comercialmente como sulfato de cobre, otros nombres incluyen sulfato cúprico, vitriolo azul (pentahidratado), bluestone (pentahidratado), bonattite (mineral trihidratado) y calcantina (mineral pentahidratado), sus propiedades se pueden observar en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Propiedades Fisicoquímicas del CuSO_4

Estado físico	Polvo azul
Punto de fusión	110 °C
Masa molar	159,6 g/mol
Densidad	3603 kg/m ³
Solubilidad en agua	20,7 g/100ml (20°C)

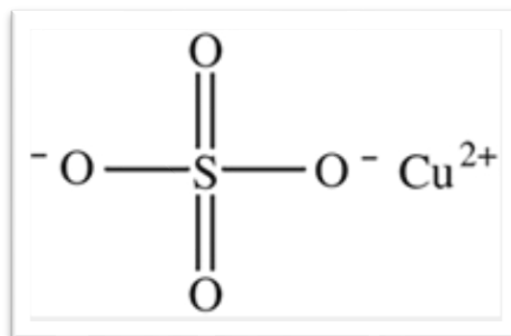


Figura 3. Estructura química del CuSO_4

El primer uso registrado de cobre como fungicida fue a mediados de la década de 1700, y se trataron semillas de cereal con sulfato de cobre pentahidratado para controlar el mal olor. En la década de 1880, el científico francés Pierre Marie Alexis Millardet descubrió las propiedades fungicidas de amplio espectro del cobre a partir del uso de sulfato de cobre en forma de mezcla de Burdeos (sulfato de cobre, cal hidratada y agua). El primer registro para un pesticida que contiene cobre se emitió en 1956. Actualmente, 16 ingredientes activos de cobre tienen registros activos de uso de alimentos sujetos a reevaluación de tolerancia y revisión de reinscripción. Así, la EPA publicó *Guías de registro de pesticidas con sulfato de cobre como ingrediente activo* en marzo de 1996, y para los compuestos de cobre del grupo II, *Guías de registro de pesticidas con cobre del grupo II como principio activo* en abril de 1987 (US EPA, 2009).

El sulfato de cobre disponible comercialmente más común es el sulfato de cobre (II) pentahidratado (**Figura 4**), se utiliza principalmente como fungicida, bactericida, herbicida acuático, algicida y molusquicida de amplio espectro para usar en una variedad de cultivos agrícolas, ornamentales y césped (US EPA, 2009).



Figura 4. Forma comercial de CuSO_4 (Merck)

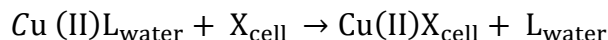
Los principales cultivos en los que se usa el sulfato de cobre, incluyen: cítricos, fresa, tomate, pimienta, arroz, avellana, nuez, melocotón, manzana y uva. El sulfato de cobre como algicida está aprobado por la EPA (*Environmental Protection Agency*) para uso en acuicultura (Schnick et al., 1986). Aunque no está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) como agente terapéutico, es usado masivamente para el control de parásitos protozoarios en especies acuáticas (Straus, 2003), así como para disminuir la proliferación de fitoplancton en aguas eutróficas (Mazon et al., 2002).

La efectividad terapéutica de CuSO_4 se reduce a medida que la alcalinidad y la dureza total se incrementan. Por su parte, la toxicidad del cobre aumenta cuando disminuye la materia orgánica, la alcalinidad y la dureza (Velasco et al., 2006).

2.2.3 Mecanismo de acción tóxica

Los iones de Cu pueden existir tanto en estado cúprico oxidado (Cu^{2+}) o reducido en estado cuproso (Cu^+). Como fungicida y algicida, el ión cúprico se une a varios grupos, incluyendo grupos sulfuro, imidazoles, carboxilo, fosfato y grupos tiol, grupos que dan lugar a la desnaturalización no específica de proteínas, que conducen a fugas celulares (US EPA, 2009).

Si bien, se sabe que la toxicidad del cobre en las microalgas generalmente se manifiesta sólo después de la captación de cobre en la célula (Stauber & Davies, 2000), se sabe poco sobre los sitios específicos a los que se une el cobre en la membrana de la pared celular de algas, la naturaleza del sitio de acción tóxica (ligando biótico) o el modo exacto de acción del cobre en las microalgas. La adsorción del cobre a las células de algas se describe en por la siguiente ecuación:

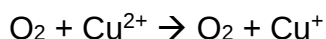


Dónde: L= ligando y X_{cell} = sitios en la membrana celular (Sunda, 1989). El cobre se une rápidamente y no específicamente a muchos sitios en la membrana

celular, incluidos los grupos carboxílico, sulfhídrido y fosfato (Crist et al., 1990), y específicamente a los sitios de transporte de cobre (Levy et al., 2007).

En general, la absorción de cobre a las superficies celulares se considera rápida, y es capaz de alcanzar un pseudoequilibrio con el cobre en solución, mientras que la internalización del metal a través de la membrana plasmática es mucho más lenta. Una vez que el cobre se internaliza, el cobre oxida a los grupos tiol en el citoplasma, lo que lleva a una disminución de la proporción del glutatión reducido a oxidado, que a su vez afecta la formación del huso y la división celular (Levy et al., 2007).

Tanto los iones de cobre tanto cúprico (Cu^{2+}) como cuproso (Cu^+), pueden participar en las reacciones de oxidación y reducción. En presencia de superóxido (O_2^-) o agentes reductores como el ácido ascórbico o GSH, el Cu^{2+} se puede reducir a Cu^+ , que es capaz de catalizar la formación del radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la reacción de Fenton y las reacciones de Haber-Weiss (Bremner, 1998; Gaetke & Chow, 2003):



El radical hidroxilo es el radical oxidante más poderoso que probablemente surja en los sistemas biológicos, y es capaz de reaccionar con prácticamente todas las moléculas biológicas (Buettner, 1993). Puede iniciar el daño oxidativo al extraer el hidrógeno de un carbono que contiene amino para formar un radical proteico centrado en el carbono y de un ácido graso insaturado para formar un radical lipídico (Powell, 2000).

2.2.4 Cromo

El cromo (Cr), es un elemento de transición ubicado en el grupo VI-B de la tabla periódica. Las formas estables de Cr son las especies trivalentes de Cr (III) y hexavalente de Cr (VI), aunque existen varios otros estados de valencia que son inestables y de corta duración en los sistemas biológicos. El Cr (VI) se considera la forma más tóxica de cromo, que generalmente se asocia con el oxígeno como oxianiones de cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). El Cr (III) es menos móvil, menos tóxico y se encuentra principalmente unido a la materia orgánica en ambientes del suelo y acuáticos (ATSDR, 2012).

El cromo es un metal gris, brillante que es extremadamente resistente a los agentes corrosivos ordinarios. Este metal es abundante en la corteza terrestre y en los gases de los volcanes. Las concentraciones ambientales se derivan de su explotación en las minas, fundición de minerales que lo contienen y por sus aplicaciones industriales. Las emisiones de cromo hacia el aire, agua y suelo son realizadas por diversas actividades antropogénicas (Jaramillo J. et al., 2008):

- La quema de combustibles fósiles
- Producción de cemento
- Curtido de pieles
- Producción de acero inoxidable y aleaciones metálicas
- Producción de químicos (como colorantes, pigmentos y plaguicidas),
- cromado electrónico

El cromo, también se puede encontrar en muchos productos de consumo como (ATSDR, 2012):

- Madera tratada de dicromato de cobre
- Cuero curtido con sulfato de cromo
- Utensilios de cocina de acero inoxidable
- Reemplazo de cadera de metal sobre metal

Por lo tanto, la exposición del hombre a este metal es principalmente de naturaleza ocupacional (Jaramillo J. et al., 2008). Sin embargo, el cromo es un micronutriente esencial en animales y humanos, está incluido en el complejo llamado factores de tolerancia a la glucosa (GFC) y es indispensable para el metabolismo normal de azúcar, lípidos y proteínas de los mamíferos (Mordenti & Piva, 1997). Por otro lado, el cromo es un metal no esencial para plantas y microorganismos, pero pueden ser absorbidos por estos. En altas concentraciones, se comporta como tóxico, mutagénico, teratógeno y carcinogénico (Cervantes et al., 2001).

La contaminación de cromo en todo el mundo ha surgido principalmente de la práctica común de eliminación de residuos de diferentes industrias con la forma dominante de Cr(III) termodinámicamente estable. Sin embargo, la reciente detección de niveles tóxicos significativos de Cr(VI) en aguas superficiales y subterráneas en diferentes partes del mundo plantean cuestiones críticas relacionadas con la disposición actual de los residuos que contienen cromo. A pesar de la estabilidad termodinámica de Cr(III), la presencia de ciertos minerales naturales, en especial los óxidos de MnO_2 , puede aumentar la oxidación de Cr(III) a Cr(VI) en el medioambiente. Este factor es de interés público, porque a un pH elevado, Cr(VI) es biodisponible, siendo esta forma muy móvil y, por lo tanto, representa el mayor riesgo de contaminación de las aguas (Avudainayagam et al. 2003).

2.2.5 Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

El dicromato de potasio es uno de los principales compuestos de cromo. Es un compuesto inorgánico de fórmula $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, caracterizado por ser un poderoso antioxidante. De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la nomenclatura química del $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ es heptaoxidodicromato de dipotasio o conocido comercialmente como dicromato de potasio, otros nombres incluyen

dicromato potásico, heptaoxidocromato (VI) de potasio o sal dipotasica del ácido crómico. Sus propiedades fisicoquímicas se pueden observar en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del $K_2Cr_2O_7$

Estado físico	Cristal anaranjado intenso
Masa molar	294,18 g/mol
Punto de fusión	398 °C
Solubilidad en agua	130g/L a 20°C

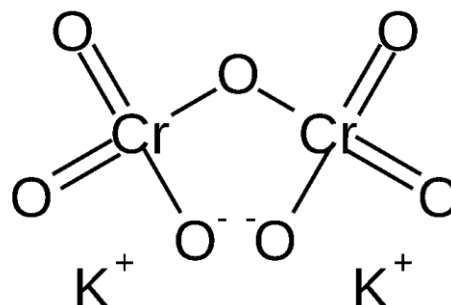


Figura 5. Estructura Química del $K_2Cr_2O_7$

Es un compuesto iónico con dos iones de potasio (K^+) y el ion dicromato cargado negativamente ($Cr_2O_7^-$), en el que dos átomos de cromo hexavalente (con estado de oxidación +6) están unidos a tres átomos de oxígeno, así como un átomo oxígeno puente (**Figura 4**) (ATSDR, 2012).



Figura 6. Forma comercial del $K_2Cr_2O_7$ (Fermont).

Para su uso comercial (**Figura 6**), este se puede obtener mediante cloruro de potasio y dicromato de sodio y por tostado de cromito y carbonato de potasio a una temperatura entre 900 y 1000°C. También se puede obtener por intercambio de catión a partir del dicromato de sodio y cloruro de potasio.

El dicromato de potasio se utiliza para (Gunnar & Friberg, 1978):

- Preparar soluciones de limpieza fuertes
- Preparar diversos productos tales como ceras, pinturas, colas, etc.
- Se utiliza en las exhibiciones pirotécnicas con tungsteno y hierro
- Curtido de cuero para el calzado
- Como agente oxidante en el proceso de impresión fotográfica

2.2.6 Mecanismo de acción toxica

El cromo es uno de los metales pesados más tóxicos, ampliamente encontrado en aguas residuales, resultante de los desechos de la industria principalmente (Barnhart, 1997). Los efectos biológicos del cromo dependen de su estado de oxidación. El estado de oxidación trivalente (Cr III) es la forma más estable, es esencial para los mamíferos a concentraciones traza y relativamente inmóvil en los sistemas acuáticos, debido a su baja solubilidad en agua. El Cr (VI) es considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador sulfato (ATSDR, 2012).

Los mecanismos de toxicidad del cromo son muy complejos. Están mediados en parte por el potencial redox del Cr (VI), que contribuye a la mayor potencia tóxica de este, en relación con el Cr (III), ya que una vez que el metal está en el interior de las células, el cromo (VI) se reduce rápidamente a cromo (III). Estas reacciones comúnmente involucran especies intracelulares, como ascorbato, glutatión o aminoácidos (ATSDR, 2012)

Se ha propuesto que la toxicidad del Cr VI se debe a que, al igual que otros metales, produce estrés oxidativo. En este proceso dentro de las células se general intermediarios reducidos de cromo que, en presencia de H_2O_2 , funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton (**Figura 7**), llevando a la forma de

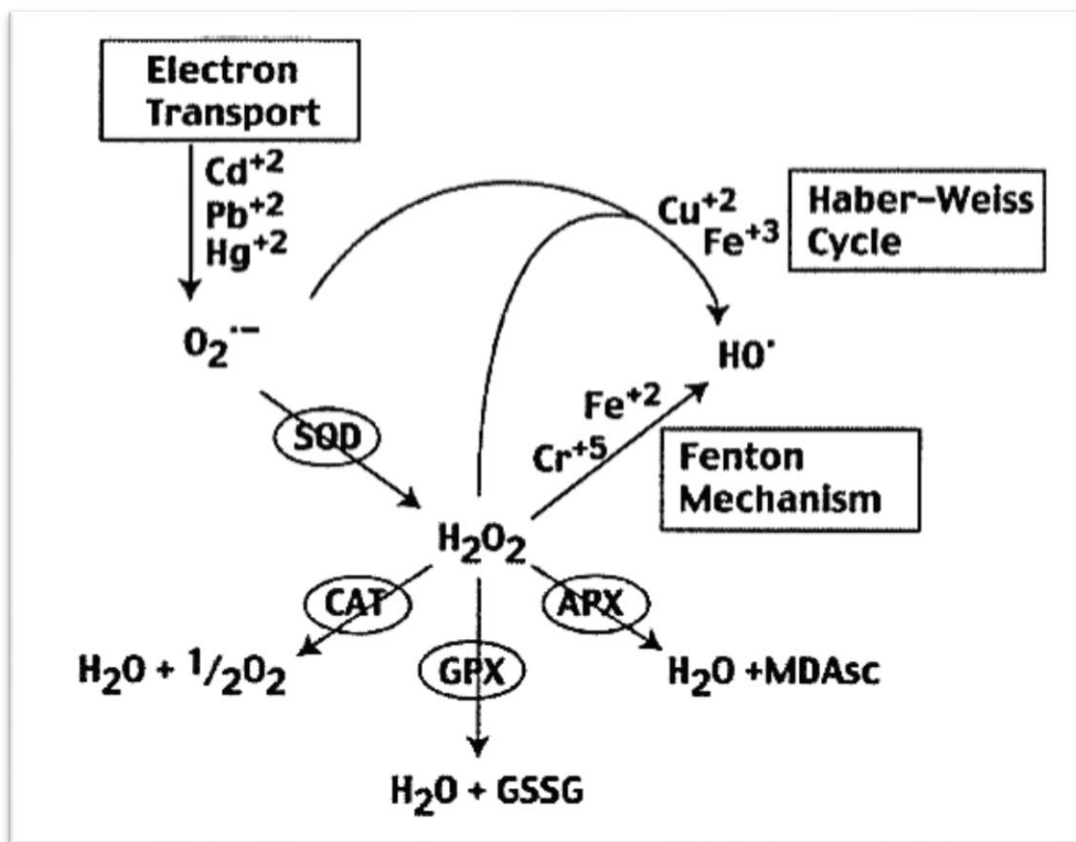


Figura 7. Inducción de ROS en las células causado por metales pesados (Pinto et al., 2003).

especies reactivas de oxígeno (ERO). Conduce el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daños a los ácidos nucleicos (Gutiérrez & Cervantes, 2008).

La formación de estos radicales libres, que conducen al estrés oxidativo, pueden ser responsables de muchos de los efectos nocivos del cromo en las células, incluida la peroxidación de lípidos y las alteraciones en la comunicación celular, las vías de señalización y el citoesqueleto (Viti & Giovannetti, 2001).

En mamíferos, se cree que los productos de reducción metabólica del cromo (VI) como los radicales libres, Cr (V) y el Cr (III) recién generado son en parte

responsables de los efectos cancerígeno. De tal manera que los radicales libres, el Cr (V) y el Cr (III) pueden provocar daños estructurales en el DNA, daños funcionales y otros efectos celulares (ATSDR, 2012).

Por otra parte, el Cr (III) es relativamente inocuo debido a su solubilidad e incapacidad para atravesar las membranas biológicas; dicha especie constituye un oligoelemento indispensable para los procesos bioquímicos y fisiológicos en células superiores, en cantidades muy pequeñas. El Cr (III) específicamente tienen acciones en el metabolismo de la glucosa, el colesterol y los ácidos grasos, además de desempeñar un papel importante en diferentes reacciones enzimáticas (Gutiérrez & Cervantes, 2008).

2.2.7 Cadmio

El cadmio (Cd), es un metal encontrado en la corteza terrestre, presente en varios tipos de rocas, lodos de sedimentación, carbones y petróleos. Se obtiene como subproducto del tratamiento metalúrgico del zinc y del plomo (ATSDR, 2002).

El metal es de color blanco plata, brillante, maleable y muy dócil. Pertenecce al grupo II B de la Tabla periódica y en su comportamiento analítico se parece más al zinc que al mercurio. En sus compuestos actúa normalmente con el grado de oxidación II (Pinto et al., 2003).

En lo ambiental, el cadmio es un elemento relativamente raro en la litosfera. Por afinidad química, se le encuentra junto al zinc, en proporción muy variable. Las principales fuentes de contaminación son (Tukaj et al., 2007; Jaramillo J. et al., 2008):

- Minería
- La fabricación de fertilizantes fosfatados
- La incineración de residuos de madera, carbón, plásticos
- La combustión de aceite y gasolina

- El recubrimiento y revestimiento de otros metales (fierro, acero y cobre)
- En aleaciones no ferrosas y dispositivos fotovoltaicos
- Pigmentos para vidrios, cerámicas y pinturas
- Como estabilizante de plásticos
- En la producción de baterías, soldaduras, amalgamas dentales, lámparas incandescentes y municiones para armas

Los compuestos más comunes del cadmio son cloruro de cadmio (CdCl_2) y el sulfato de cadmio (CdSO_4), estos son solubles en agua (ATSDR, 2002).

En el aire, el cadmio (como óxido, cloruro y sulfato) existirá como partículas o vapores (de procesos de alta temperatura). Se puede transportar largas distancias en la atmósfera, donde se depositará en las superficies del suelo y agua (ATSDR, 2002).

En el suelo, el cadmio y sus compuestos pueden viajar a través del suelo, pero su movilidad depende de varios factores, como el pH y la cantidad de materia orgánica, que variarán según el entorno local. Generalmente el Cadmio se une fuertemente a la materia orgánica, donde estará inmóvil en el suelo y será absorbido por la vida vegetal, eventualmente, ingresando al suministro de alimentos (Tukaj et al., 2007).

En el caso de las plantas, la toxicidad del cadmio se manifiesta en la degradación de la clorofila, la inhibición de la fotosíntesis y la dirección del metabolismo a la síntesis de compuestos protectores como la lignina o los flavonoides (Chmielowska-Bąk et al., 2013).

En el agua, el cadmio existe como el ion hidratado o como complejos orgánicos con otras sustancias inorgánicas u orgánicas. Las formas solubles migran en el agua y las formas insolubles de cadmio son inmóviles y se depositarán y absorberán en los sedimentos. En microorganismos habitantes de aguas dulces, el cadmio incluso en concentraciones muy bajas, se caracteriza por ser bioacumulable y transferirse a lo largo de la cadena trófica (Tukaj et al., 2007).

2.2.8 Cloruro de cadmio (CdCl_2)

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la nomenclatura química del CdCl_2 es dicloruro de cadmio o conocido comercialmente como cloruro de cadmio, otros nombres incluyen cloruro de cadmio (II). Sus propiedades fisicoquímicas se pueden observar en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del CdCl_2 .

Apariencia física	Sólido blanco, higroscópico, inodoro
Densidad	4047 kg/m ³ ; 4,047 g/cm ³
Masa molar	183.32 g/mol
Solubilidad en agua	1.48 g/100 g (20 °C)
Punto de fusión	841 K (568 °C)

El cloruro de cadmio es un compuesto cristalino que se presenta en forma sólida cuya fórmula química es CdCl_2 . Es ligeramente soluble en alcohol y se disuelve bien en agua y en otros disolventes polares. Entre sus principales aplicaciones se encuentran (Cavas et al., 2005):

- Fotocopias
- Síntesis de cetonas
- Pigmento inorgánico

El cadmio, el metal pesado más estudiado, es un elemento no esencial, no beneficioso y con un alto potencial tóxico (Tukaj et al., 2007). Se ha demostrado que presenta efectos cancerígenos en humanos por la de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (Chmielowska-Bąk et al., 2013).

2.2.9 Mecanismo de acción tóxica

La toxicidad en agua está controlada por la concentración de cadmio libre, la cual a su vez está condicionada a la dureza del agua. De acuerdo con este hecho,

los organismos de agua dulce resultan más afectados que los organismos de aguas marinas (ATSDR, 2002).

La exposición a este metal pesado tóxico conduce a numerosas alteraciones en el funcionamiento de las células, como: la generación de especies reactivas de oxígeno, trastornos en la estructura y funcionamiento de la membrana, inhibición de la respiración, alteraciones en la homeostasis iónica y perturbaciones en la división (Ramírez, 2013).

Al menos algunos de los efectos tóxicos causados por el estrés de cadmio podría deberse a su capacidad para imitar iones esenciales divalentes como el Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} para competir por los sitios de unión de los transportadores. Pudiéndose distinguir dos tipos de mimetismo a nivel celular (Bridges & Zalups, 2005):

- El mimetismo iónico, es la capacidad de los iones no unidos para imitar otros iones o elementos. Un ejemplo de tal proceso es la entrada de cadmio en la célula a través de transportadores predestinados para elementos esenciales. Por lo tanto, puede conducir a alteraciones en la homeostasis y distribución de los minerales.
- El mimetismo molecular, a su vez, consiste en reemplazar a otros metales en moléculas biológicas.

De esta manera, el cadmio, puede alertar las vías de transducción de señales y contribuir a la citotoxicidad de varias maneras. Finalmente, la sustitución de iones esenciales por Cd^{2+} puede llevar a (Chmielowska-Bąk et al., 2013):

- a. Alteraciones de la estructura de la molécula diana
- b. Imitación de acción del ion esencial y activación de la molécula objetivo
- c. Liberación de los metales esenciales

Por otro lado, una de las respuestas más comunes de los microorganismos a la exposición del cadmio es la generación de especies reactivas de oxígeno. La acumulación excesiva de ROS, conduce a un estrés oxidativo que, a su vez, causa lesiones en diversas moléculas biológicas, como la peroxidación de lípidos y el daño

oxidativo de las proteínas y al DNA. Estas lesiones conducen a la filtración de la membrana, a la homeostasis de iones perturbados, a la inactivación de las enzimas y al aumento de la tasa de mutaciones (Scandalios, 2002).

Finalmente, el cadmio no tiene actividad reducción-oxidación, pero puede reemplazar a los metales activos por redox en moléculas biológicas y, como consecuencia, aumentar los niveles intracelulares de los metales. Por lo tanto, es posible que contribuya al estrés oxidativo a través de la liberación de metales redox (como el cobre y el hierro), resultantes de su sustitución en moléculas biológicas (Chmielowska-Bąk et al., 2013).

2.3 BIOENSAYOS

Según Paracelso (1493-1541) *“la dosis hace el veneno”* o sea ninguna sustancia química es tóxica si la dosis es demasiada baja, y por otro lado todas las sustancias químicas son tóxicas si la dosis es suficientemente alta. Efectivamente la relación entre la cantidad del contaminante a la cual un organismo está expuesta y el grado de los efectos tóxicos producidos es uno de los conceptos básicos de ecotoxicología y es la base de la evaluación del riesgo toxicológico (Huovinen & Gómez, 2017).

Los bioensayos de toxicidad son una de las herramientas más utilizadas en ecotoxicología para evaluar la toxicidad y relacionar la concentración del xenobiótico con la respuesta biológica (relación concentración-respuesta) (Huovinen & Gómez, 2017). Como disciplina, ha proporcionado protocolos de pruebas estandarizadas para estudios de toxicidad de especies únicas representativas de diferentes niveles taxonómicos (Altenburger et al., 1996). En este contexto, los ensayos de biotoxicidad han adoptado una importancia creciente en la evaluación de la toxicidad potencial de muestras medioambientales, puesto que son rápidos y no necesitan la completa caracterización química de las mismas (Boluda, R. et al., 2002). Sin embargo, algunos autores (Pedersen et al., 1988; Ruíz et al., 1997) indican la necesidad de combinar los ensayos ecotoxicológicos y químicos para evaluar dicha toxicidad potencial y establecer su naturaleza. Estos ensayos aspiran a la predicción realista del comportamiento de sustancias tóxicas en el medioambiente.

Actualmente, los resultados de los bioensayos son aceptados como estimaciones conservadoras de los efectos potenciales de las sustancias en el medio ambiente y se reconoce su utilidad para los programas de monitoreo ambiental, la construcción de bases de datos para la comparación de la sensibilidad de las especies a los contaminantes, así como para la regulación de sustancias tóxicas (Romero & Cantú, 2004). Así mismo, las pruebas biológicas pueden ser utilizadas para evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, inclusive en muestras con mezclas complejas, mediante una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de organización biológica, que van desde alteraciones bioquímicas,

moleculares y fisiológicas hasta los parámetros poblacionales entre muchos otros aspectos (Ramírez & Mendoza, 2008).

Desde el punto de vista regulatorio las pruebas biológicas pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, para controlar descargas de aguas residuales municipales e industriales, para regular el uso y producción de sustancias químicas y para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes. Por último, las industrias pueden incorporar las pruebas biológicas a su proceso de toma de decisiones con respecto al desarrollo, manufactura y comercialización de sus productos (Rand & Petrocelli, 1985). De esta manera, se han formulado estándares actuales para la emisión e inmisión de contaminantes a cuerpos de agua, así como los criterios de calidad del agua para la protección de la vida acuática (Altenburger et al., 1996). Por un lado, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), ha identificado que varias de las actividades que son de su competencia, tales como la revisión de estudios ecotoxicológicos para el registro de nuevos plaguicidas, el análisis de estudios de evaluación de riesgo ecológico, la caracterización de los residuos industriales, la evaluación de la contaminación por emisiones, fugas, derrames y descargas, entre otras de compuestos orgánicos e inorgánicos, requieren de procedimientos estandarizados para medir los impactos que ocasionan sobre los organismos y los ecosistemas (SEMARNAT, 1999), proporcionando así la NOM-001-SEMARNAT-1996 para la descarga de aguas residuales en cuerpos de agua establece los límites máximos permisibles de contaminantes, con el objetivo de proteger su calidad y posibilitar sus usos, y es de observancia obligatoria para los responsables de dichas descargas. A demás, la USEPA, ha desarrollado procedimientos específicos y detallados para limitar las descargas en función de objetivos de calidad aceptables para el cuerpo receptor. Asimismo, ha elaborado modelos para la estimación de concentraciones permisibles de xenobióticos en el ambiente (Montvydiene & Marciulionienė, 2004).

Según Ramírez & Mendoza (2008), existen características específicas que deberían de tener las pruebas ecotoxicológicas y las categorizaron en orden de importancia de acuerdo a los siguientes aspectos:

- Ser capaces de generar resultados ecológicamente significativos
- Ser capaces de generar información defendible desde el punto de vista científico y legal
- Estar basados en métodos disponibles rutinariamente y ser de amplia aplicación
- Ser predictivas de efectos ecológicos
- Ser aplicables a una amplia variedad de compuestos
- Ser simples y costo-efectivas

De igual manera, existen criterios que ayudan a la selección de los bioensayos para las evaluaciones ecotoxicológicas de sustancias químicas, categorizándolas en la tabla 1.

Tabla 6. Criterios para la selección de bioensayos en el laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Ramírez & Mendoza, 2008).

Factibilidad	• Bajo costo • Materiales y reactivos disponibles en la localidad • Tiempo máximo de desarrollo • Procedimiento de prueba simple • Facilidad en la evaluación de la respuesta a medir
De los organismos	• Fácil obtención y mantenimiento • Representativo ecológico ○ De un grupo funcional o taxonómico ○ De una ruta de exposición • Información sobre su sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos • Respuesta relevante a los compuestos tóxicos • Sensibilidad a bajas concentraciones • Información sobre su biología • Condiciones presentes en los ecosistemas mexicanos • Concentraciones químicas reales a las del medio ambiente • Técnicamente seguros y no contaminantes • Posibilidad de ser estandarizados

De la prueba	• Buena exactitud, precisión analítica y de aplicación universal • Significado ecológico de los resultados • Buenas prácticas de laboratorio ○ Requerimientos mínimos de sobrevivencia/reproducción en pruebas y testigos ○ Edades o etapas de la vida requeridos al inicio de la prueba ○ Comprobación de concentraciones nominales
--------------	---

Según Huovinen & Gómez (2017), los bioensayos principalmente se clasifican de acuerdo a la duración o tiempo de exposición de estos y del organismo a utilizar y su ciclo de vida, además de los parámetros a medir:

- Toxicidad aguda, se produce dentro de un periodo corto generalmente la respuesta del organismo es rápida a una exposición a corto plazo que varía de 24 a 96 horas
- Toxicidad crónica, se desarrolla durante una exposición prolongada del xenobiótico

Mientras que las respuestas biológicas que se miden pueden ser:

- Letales (mortalidad)
- Subletales (Crecimiento)

Por otro lado, según (Riva, 1991), el diseño de los bioensayos para la predicción de riesgo en el ambiente acuático, deberá cuantificar la toxicidad de acuerdo a los ecosistemas acuáticos o terrestres además de los productos de transformación. Y para observar las posibles interacciones se realizarán las siguientes pruebas:

- Magnificación
- Sinergismo
- Antagonismo
- Detoxificación

A demás, los bioensayos de toxicidad proveen de estimaciones sobre la concentración (CL_{50} o concentración letal media, Cl_{50} o concentración inhibitoria) o dosis (DL_{50} o dosis letal media) que es letal para el 50% de los organismos o población. A demás, ofrecen información sobre las concentraciones más altas que no generan toxicidad (NOEC) y las más bajas que causan efecto (LOEC), siendo de gran utilidad para estimar niveles de exposición que no implican riesgo (Huovinen & Gómez, 2017).

La interpretación de los resultados de bioensayos de toxicidad requiere considerar ciertas restricciones, tales como la dificultad de extrapolar los resultados obtenidos en laboratorio con organismos de cultivo a las condiciones naturales (Huovinen & Gómez, 2017). Es por ello que en un inicio la calidad del agua se evaluó mediante datos fisicoquímicos, donde estos analizan básicamente los efectos de la contaminación a corto plazo. Sin embargo, desde principios del siglo pasado, mediante investigaciones, se encontró que los organismos indicadores de calidad del agua determinan los efectos de los impactos en el ecosistema acuático a través de un tiempo más prolongado. La información biológica generada, a partir de los también llamados bioindicadores, no reemplaza los análisis fisicoquímicos, pero sí reduce costos por lo que estos estudios son importante en el monitoreo de la calidad del agua (Vázquez et al., 2006).

2.4 BIOINDICADORES

La mayoría de los procedimientos utilizados en toxicología son llevados a cabo sobre mamíferos, pero está creciendo la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad (Walter et al., 1998; Repetto et al., 2001) y el interés científico en promocionar el estudio de los efectos de las sustancias químicas sobre organismos terrestres (incluyendo vegetales) y ambientes acuáticos. Las alternativas más prometedoras en ecotoxicología abarcan la utilización de unos pocos organismos con sensibilidad limitada y/o que no están

protegidos por la legislación. Estos incluyen bacterias, hongos, algas, plantas y animales invertebrados (Repetto et al., 2001).

Dicho lo anterior, los bioindicadores pueden definirse como especies o comunidades que particularmente, por su presencia, proporcionan información sobre el entorno físico y/o químico circundante en un sitio en particular (Bellinger & Sigee, 2015). La determinación de una especie como bioindicador requiere de conocimiento previo respecto a su composición comunitaria bajo condiciones normales, incluyendo el ciclo de vida de las especies, su estacionalidad y sus variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental (Vázquez et al., 2006). En el contexto del cambio, los bioindicadores pueden ser considerados como marcadores de alerta temprana que reflejan el estado de "salud" de un sistema acuático (Bellinger & Sigee, 2015).

La base de las especies individuales como bioindicadores reside en su preferencia o tolerancia por hábitats particulares, su sensibilidad, especificidad y fácil monitoreo más su capacidad para crecer y superar a otras especies en condiciones particulares de la calidad del agua (Vázquez et al., 2006; Bellinger & Sigee, 2015). En cada región existen especies fácilmente identificables en las alteraciones causadas por el hombre. La declinación puede deberse a la mala calidad del agua, a la degradación del hábitad o a la combinación de estos dos factores (Vázquez et al., 2006).

De acuerdo con Roldán (1999), existen características ideales que debe cumplir un bioindicador:

- Deben ser abundantes, de amplia distribución y fáciles de recolectar
- Relativamente fáciles de identificar, si se comparan con otros grupos menores
- Ser sedentarios en su mayoría y reflejar las condiciones locales
- Ser apreciables a simple vista
- Se podrán cultivar en el laboratorio

- Varían poco genéticamente
- Responderán rápidamente a los tensores ambientales

La ventaja del uso de bioindicadores como herramienta para determinar la calidad del agua e implementar acciones sobre la recuperación son variadas (Vázquez et al., 2006):

- La fácil colecta y registro de información biológica puede realizarse por personas ajenas a la biología
- Las comunidades biológicas reflejan las condiciones del sistema (físicas, químicas, biológica y ecológica)
- El biomonitoreo permanente de las comunidades resulta ser económico comparado con los análisis fisicoquímicos
- La información resultante puede expresarse por medio de índices bióticos que expresan la calidad del agua mediante escalas numéricas

Existen muchos tipos de bioensayos que son accesibles y pueden realizarse en el campo o en el laboratorio y monitorearse de forma automática o manual. Los organismos que participan en tales ensayos incluyen (Kokkali, 2011):

- Algas y plantas
- Microorganismos
- Invertebrados

Los efectos adversos de los productos químicos en los organismos acuáticos con el objetivo de evaluar y predecir los impactos en los ecosistemas acuáticos. Como disciplina de especies únicas representativas basadas en laboratorio con zooplancton y fitoplancton (Altenburger et al., 1996).

2.4.1 El fitoplancton

El fitoplancton abarca el muy diverso grupo polifilético de los protistas fotosintéticos microscópicos (algas) y las cianobacterias. Las primeras células de fitoplancton (cianobacterias marinas), probablemente aparecieron hace casi 3 mil millones de años (Hedges et al., 2001). Desde entonces, el fitoplancton ha sido sometido a una diversificación dramática (como fundador del linaje de las plantas terrestres) y numerosos eventos de extinción, y conquistó el reino del agua dulce. Hoy en día, representan aproximadamente la mitad de la productividad primaria de la Tierra (Falkowski et al., 2004, Katz et al., 2004).

La composición del fitoplancton afecta profundamente a la comunidad de los ciclos biogeoquímicos de muchos elementos, como carbono, nitrógeno y fósforo, ya que los principales grupos funcionales tienen diferentes necesidades y modos de adquisición de estos elementos (Falkowski et al., 2004). Muchas cianobacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y aumentan en la columna de agua (Howarth et al., 1988; Capone et al., 1997; Herrero y Flores 2008).

Las diatomeas tienen una mayor eficiencia de captura de carbono en el océano profundo, debido a que sus conchas de sílice hacen que se hundan más rápido que otros grupos de fitoplancton (Smetacek, 1999), con un efecto directo sobre el clima global (Falkowski et al., 1998). Grupos de fitoplancton también difieren en su comestibilidad y el valor nutricional de los niveles tróficos superiores (Sterner y Elser, 2002). Finalmente, muchas especies de fitoplancton pueden producir toxinas que afectan negativamente a la calidad del agua y a niveles tróficos superiores (Anderson et al., 1998, Huisman et al., 2005).

Debido a que la composición del fitoplancton afecta al funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y al clima global, es importante entender los factores que rigen la dinámica del fitoplancton. Inducido por el hombre, el cambio global es probable que rápidamente altere la estructura de la comunidad fitoplanctónica (Litchman et al., 2006) y, por tanto, la necesidad de comprender la reorganización del fitoplancton de la comunidad en el cambio climático se hace aún más urgente. Más allá de estas preocupaciones prácticas, muchas de las preguntas fundamentales de la ecología han sido formuladas y contestadas utilizando el

fitoplancton como un sistema modelo. La llamada “Paradoja del Plancton” de Hutchinson (1961), que se hacía la pregunta de por qué muchas especies de

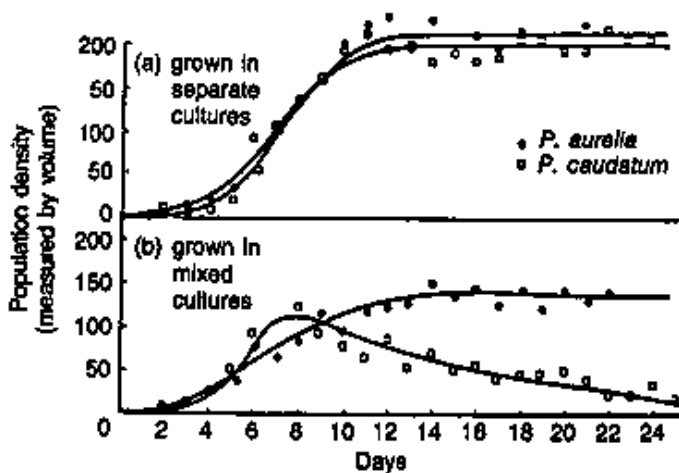


Figura 8. Exclusión competitiva. Crecimiento de poblaciones de *Paramecium* (*P. Aurelia* y *P. caudata*) en cultivos separados (a) y cultivos combinados (b) (Hernández, 2015).

fitoplancton pueden coexistir sólo en unos pocos recursos, en contra del principio de exclusión competitiva (**Figura 8**). Pues bien, ello derivó a que el fitoplancton fuera una de las primeras aplicaciones de la teoría de la competencia de los recursos (Tilman, 1977, 1982; Tilman et al., 1982).

Igualmente, los principios fundamentales de la interacción trófica, como depredador-presa o depredador-clave también se han abordado con frecuencia en el fitoplancton (Leibold, 1996). Los principales avances en la estequiometría ecológica se hicieron usando un fitoplancton-zooplancton de ecosistemas de agua dulce (Sterner y Elser, 2002). El fitoplancton es un excelente sistema modelo para abordar cuestiones ecológicas tan fundamentales debido a su pequeño tamaño, tiempos cortos de generación, un gran número de población, y la facilidad de manipulación en condiciones controladas de laboratorio. Además, de que es el primer eslabón que soporta la cadena trófica acuática (**Figura 9**), representando la base de la producción fotosintética de gran parte del O_2 y fijación de CO_2 del planeta. De esta manera, cualquier alteración sobre el fitoplancton produciría un desequilibrio potencial en los niveles tróficos superiores con consecuencias

negativas para la estabilidad del ecosistema (Franklin et al., 2000; Cortés et al., 2018).

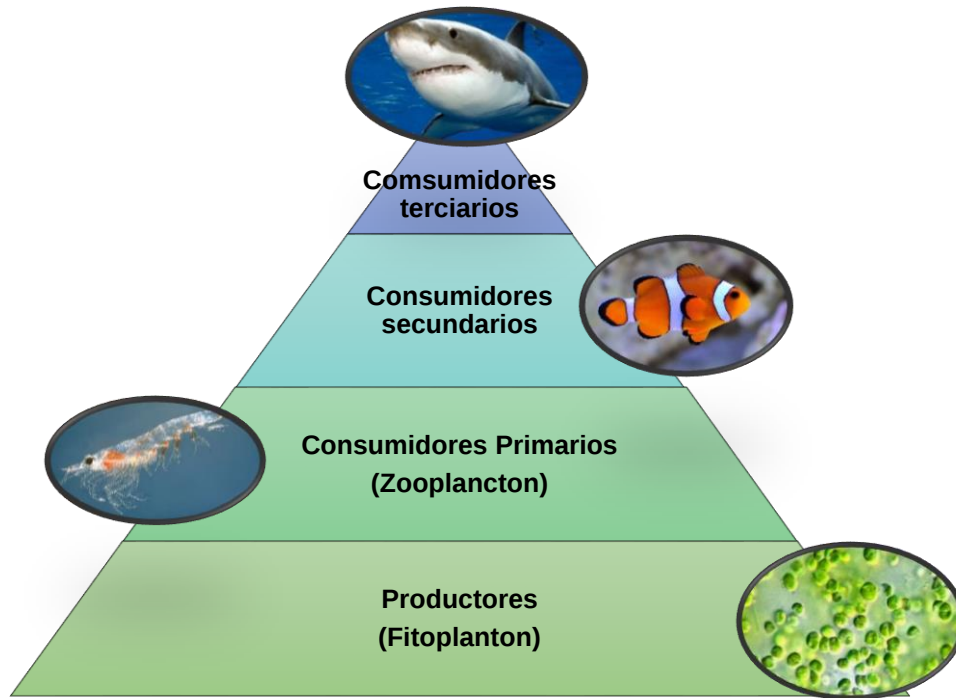


Figura 9. Cadena trófica.

2.4.2 Microalgas verdes

Las algas están ampliamente presentes en ambientes de agua dulce, como lagos y/o ríos, donde típicamente están presentes como microorganismos, aunque relativamente poco visibles, tienen una gran importancia en el medio ambiente de agua dulce (Bellinger & Sigee, 2015).

El término “alga” no es estrictamente un término taxonómico, sino que se usa como una etiqueta inclusiva para varios filos diferentes, estos organismos incluyen

tanto procariotas (células que carecen de un núcleo unido a la membrana) como eucariotas (células con un núcleo más orgánulos típicos unidos a la membrana) (Bellinger & Sigee, 2015) como las microalgas verdes, las microalgas rojas, las diatomeas y los dinoflagelados o las cianobacterias procariotas (Miazek et al., 2015).

Estos microorganismos fueron los responsables del cambio en la composición de la atmósfera primitiva hace unos 3500 millones de años, aumentando el nivel de oxígeno, originando una atmósfera rica en este gas, que ha permitido el desarrollo de la vida tal como la conocemos. Son responsables de al menos de la productividad primaria del planeta (Agah et al., 2009).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que utilizan la luz solar para convertir el CO₂ de la atmósfera en carbono orgánico. Atendiendo a la fuente de energía y de carbono de las microalgas se pueden cultivar en distintos modos (Miazek et al., 2015):

- Autotrófico: utilizan luz, natural o artificial, como fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono.
- Mixotrófica: las microalgas realizan la fotosíntesis, pero en presencia de una fuente de carbono orgánico.
- Heterotrófico: La energía y el carbono se obtiene de la oxidación de sustratos orgánicos. No todas las especies de microalgas pueden crecer en heterotrofía, ya que los costes de operación y riesgos de contaminación son elevados.

Debido a su posición clave como productores primarios en sistemas ecológicos acuáticos, las microalgas son indicadoras sensibles del cambio ambiental y, por tanto, son especies de prueba importantes para la evaluación reguladora de metales (Levy et al., 2007).

Dentro de los ecosistemas de agua dulce, las algas aparecen como organismos de flotación libre (planctónicos) o asociados a sustratos (en gran parte benthicos) (Bellinger & Sigee, 2015). Son organismos simples, sin diferenciación en

raíces, tallos y hojas, y sus órganos sexuales no están encerrados dentro de cubiertas protectoras. En términos de fisiología, son fundamentalmente autótrofos (obtienen todos sus materiales de fuentes inorgánicas) y generan compuestos de carbono complejos a partir de dióxido de carbono y energía luminosa (Tuchman, 1996).

Las algas de agua dulce proporcionan dos tipos principales de información sobre la calidad del agua (Bellinger & Sigeo, 2015):

- Información a largo plazo, en el caso de un lago templado, por ejemplo, la detección de una intensa floración de microalgas es indicativo de un estado preexistente de alto contenido de nutrientes.
- Información a corto plazo, como el cambio ambiental. La detección de un cambio en los años subsecuentes desde un bajo a un alto dominio de microalgas puede indicar un cambio en el estado eutrófico.

En el ambiente de agua dulce, las algas verdes (*Chlorophyta*) varían en tamaño desde organismos unicelulares microscópicos hasta grandes colonias globulares y extensos crecimientos filamentosos. Se caracterizan por una coloración verde fresca debido a la presencia de clorofilas como la clorofila a y b (**Tabla 7**), que no están ocultas por pigmentos accesorios como el β -caroteno y otros carotenoides. En los casos en que las algas tienen una exposición excesiva a la luz los pigmentos carotenoides pueden ser fotoprotectores y aparecer en niveles altos, oscureciendo las clorofilas y dando un color rojo brillante al alga (Bellinger & Sigeo, 2015).

Tabla 7. Tipo de clorofila presente en microalgas y cianobacterias (Miazeck et al., 2015)

Tipo de clorofila	Variedad de microalga	Taxonomía
a,b	<i>Chlorella vulgaris</i>	Microalga verde
a,c1,c2	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Diatomea
a,c1,c2	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i>	Dinoflagelada
a,c1,c3	<i>Karenia mikimotoi</i>	Dinoflagelada
a,d	<i>Acaryochloris marina</i>	Cianobacteria
a,f	<i>Halomicronema hongdechloris</i>	Cianobacteria

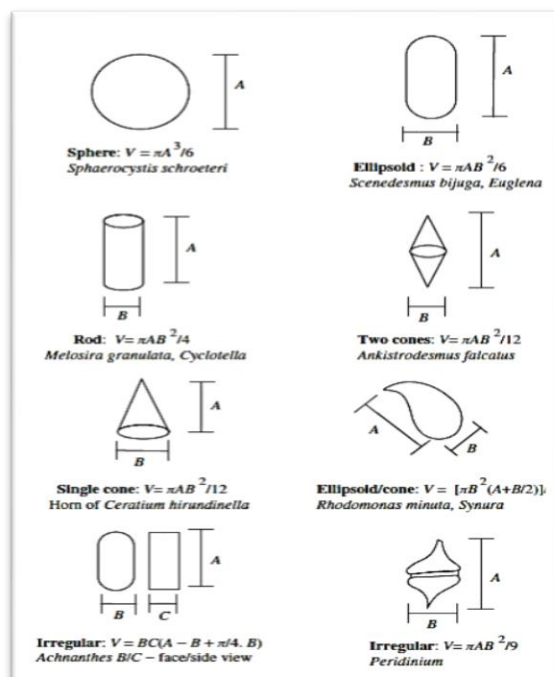
Además de su pigmentación característica, Bellinger & Sigee (2015), mencionan que las algas verdes también tienen una serie de divisiones citológicas distintivas:

- Los flagelos, cuando están presentes, se presentan en pares. Estos son de igual longitud sin pelos tubulares tripartitos y tienen una estructura similar. Algunos géneros tienen cuatro o incluso ocho flagelos, pero esto es inusual.
- Los cloroplastos varían en forma, tamaño y número. Tienen una doble membrana externa, sin retículo endoplasmático periplastidal.
- La producción y el almacenamiento de la reserva fotosintética (almidón) ocurren dentro del plástido, con gránulos frecuentemente agrupados alrededor del pirenoide. En todas las algas eucariotas, el material de almacenamiento se produce principalmente en el citoplasma general.

Aunque la motilidad se asocia normalmente con la posesión de flagelos, algunas algas pueden moverse sin la ayuda de flagelos por la secreción de mucílago de la superficie. En muchas algas, la presencia de mucílago en la superficie, es importante para aumentar el tamaño global de las células/colonias e influir en la forma (Bellinger & Sigee, 2015).

Las preferencias de hábitat de las algas verde contemporáneas, son frecuentemente útiles para proporcionar información sobre las características fisicoquímicas del medio ambiente acuático. Las algas verdes filamentosas, por ejemplo, a menudo dominan ambientes estresados por la eutrofización cultural, la acidificación y la contaminación por metales (Cattaneo et al., 1995).

El tamaño y la forma, junto con otras características fenotípicas importantes, son claramente importantes en la clasificación e identificación de las especies de algas. A nivel funcional y ecológico, el tamaño y la forma también son importantes en términos de intercambio de solutos y gases, absorción de luz, tasas de



crecimiento y división celular, sedimentación en la columna de agua y motilidad de células/colonias (Sigee, 2004).

Las microalgas demuestran una amplia gama de formas y varían en varios órdenes de magnitud en tamaño (**Figura 10**). La estimación de biomasa tradicional más comúnmente utilizada para microalgas es el biovolumen celular, que se calcula para microalgas a partir de dimensiones lineales medidas microscópicamente (Hillebrand et al., 1999). La unidad medida de biovolumen depende del tamaño y la forma, que varía mucho de una especie a otra, incluso entre diferentes individuos (Sun, 2003).

Las células de microalgas son capaces de sintetizar numerosos compuestos en cantidades más altas, como respuesta a condiciones de estrés tales como alta temperatura, alta salinidad, falta de nutrientes y también estrés por metales. Sin embargo, las condiciones de estrés también pueden tener efectos negativos en el crecimiento de las microalgas (Miazek et al., 2015).

Figura 10. Ejemplos comunes de formas estándar para el cálculo de biovolumen de microalgas (Bellinger & Sigee, 2015)

Por otro lado, los metales a bajas concentraciones pueden estimular el crecimiento y la producción de compuestos objetivo, pero la sobredosis de metales tiene efectos perjudiciales y letales en los cultivos de microalgas. La respuesta de

las células microalgales a la presencia de metales depende de muchos factores, como las condiciones de cultivo, la disponibilidad de nutrientes, la presencia de compuestos orgánicos y la capacidad de tolerancia de determinadas cepas (Miazeck et al., 2015).

La acumulación de metales en células de microalgas consiste en dos mecanismos (**Figura 11**):

- La adsorción de metales en la superficie de la pared celular que contiene grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, fosfato, amino, sulfhidrilo)
- La absorción de metales dentro de las células mediante sistemas de transporte de metales

Los metales en las células de microalgas pueden causar la formación de especies reactivas de oxígeno, que interactúan con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, resultando en su degradación.

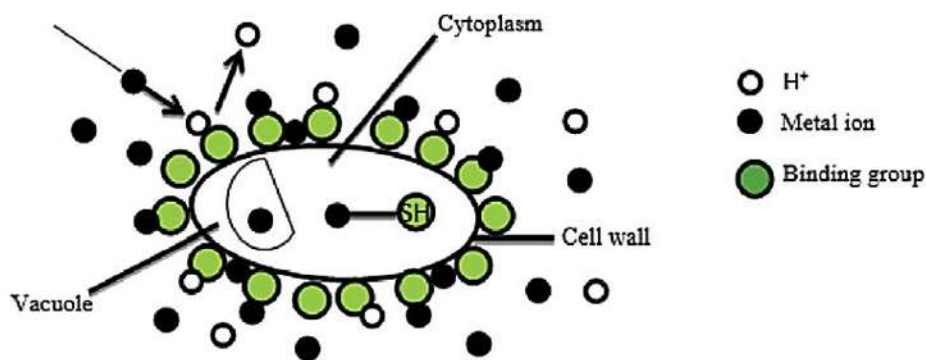


Figura 11. Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (SH-, COO-, OH-, PO43-, etc.) (Zeraatkar et al., 2016).

La mayoría de los estudios sobre aguas dulces, han utilizado la comunidad fitoplanctónica para la evaluación ambiental contemporánea, ya que es la principal biomasa de algas, se toman muestras fácilmente en sitios a lo largo de estos ecosistemas y muchas especies planctónicas tienen preferencias ecológicas definidas. Así como la determinación de la biomasa del fitoplancton es importante ya que proporciona información sobre la productividad primaria del sistema acuático

y la cantidad del material orgánico disponible para el consumo del resto de la cadena trófica (Bellinger & Sigee, 2015)

2.4.3 *Scenedesmus intermedius*

Imperio	Eucariota
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridiplantae</i>
Filum	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Clorophyceae</i>
Orden	<i>Sphaeropleales</i>
Familia	<i>Scenedesmaceae</i>
Género	<i>Scenedesmus</i>
Especie	<i>Scenedesmus intermedius</i>

Tabla 8. Taxonomía de *Scenedesmus intermedius* (Guiry, 2019).

Scenedesmus intermedius es un fitoplancton representante de las microalgas verdes, en la clase *Clorophyceae* de familia *Scenedesmaceae* y de género *Scenedesmus*, como se muestra en la **Tabla 8**. Es uno de los géneros de algas eucariotas de agua dulce más comunes, especialmente en aguas eutróficas e hipertróficas (Quevedo et al., 2008).

Scenedesmus intermedius se localiza en poblaciones unicelulares y pequeñas colonias de rápido crecimiento. Sus células tienen forma cilíndrica (o con

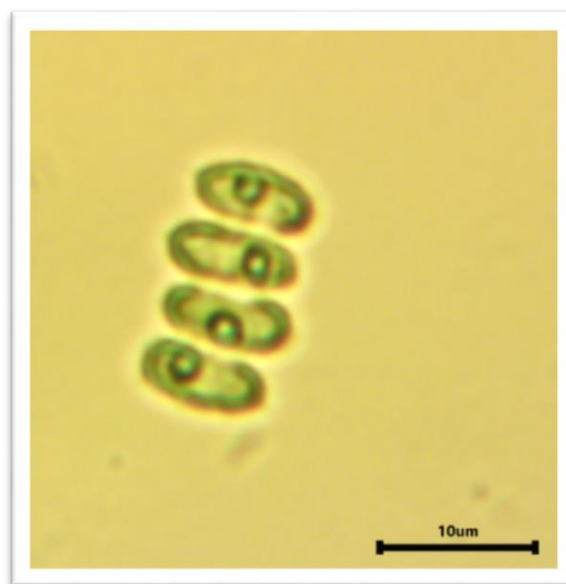


Figura 12. Colonia de *Scenedesmus intermedius*.

forma elipsoidal o fusiforme) y generalmente más largas que anchas (**Figura 12**). Miden 3.5 μm a 12.5 μm de altura y 1.6 μm a 7.5 μm de diámetro. Las células pueden existir en forma unicelular, aunque también se encuentran con frecuencia en la cenobia de 2, 4 u 8 células unidas por las paredes laterales (Bellinger & Sigee, 2015).

Las paredes celulares están compuestas en su mayor parte de celulosa. Las capas de celulosa intervienen total o parcialmente en la estructura de las células

hijas. En el interior de la célula aparecen los cloroplastos de uno hasta numerosos cloroplastos, en ellos puede aparecer orgánulos mayormente esféricos: los pirenoides, constituidos fundamentalmente por proteínas pudiendo estar rodeados o no de almidón. La matriz del pirenoide puede encontrarse atravesada por tilacoides. También cuentan con un núcleo y vacuolas que aparecen generalmente en las células más viejas (Hernández & Labbé, 2014).

Para *Si*, la reproducción es mediante autoesporulación (asexual), ocurre principalmente mediante el rompimiento o gelatinización de la pared celular materna. Así, las hijas crecen juntas en un nuevo cenobio en el interior de la célula madre (Quevedo et al., 2008).

Bajo condiciones de estrés o ante la presencia de pastores, las células de *Scenedesmus* pueden dividirse en dos subgéneros: *Scenedesmus* sin espinas y *Scenedesmus* con espinas. Aunque en el primer caso, las células cuentan con paredes de células gruesas y mucílago, lo que puede hacerlas resistentes a la digestión. Las espinas que llegan a formar las células es un mecanismo para desalentar la depredación (**Figura 13**) (Bellinger & Sigee, 2015).

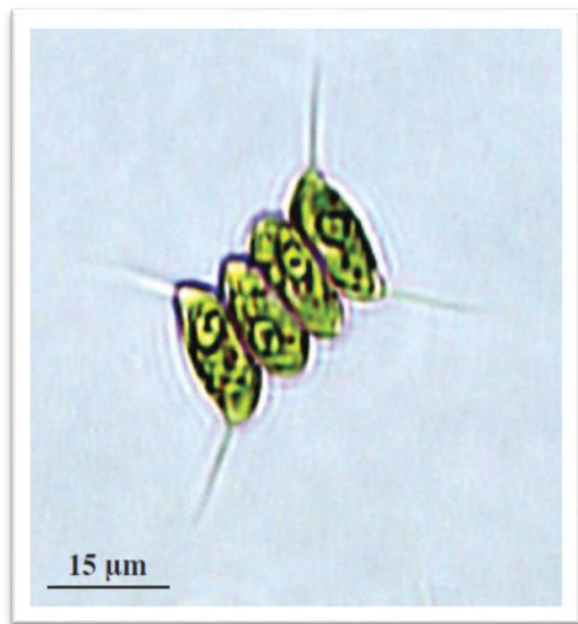


Figura 13. *Scenedesmus* sp. (Bellinger & Sigee, 2015).

3. HIPÓTESIS

La presencia de compuestos metálicos como Sulfato de cobre (CuSO_4), Cloruro de cadmio (CdCl_2) y Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en forma individual y en mezcla generan una respuesta tóxica sobre ecosistemas acuáticos y cambios en el volumen celular para el bioindicador *Scenedesmus intermedius*.

4. JUTIFICACIÓN

El sulfato de cobre, cloruro de cadmio y el dicromato de potasio son sustancias químicas con gran contenido en metales, las cuales son ampliamente usadas por diferentes sectores, tanto de la industria como de la agricultura, y son causa de la generación de grandes concentraciones residuales al ser vertidas de forma constante sin ningún tipo de tratamiento previo al medio acuático, provocando que se acumulen en el ambiente. La protección de los ecosistemas acuáticos se basa en normas ambientales que considera las concentraciones máximas permisibles de las sustancias químicas individualmente. Sin embargo, en la realidad existen mezclas complejas en las que se producen múltiples interacciones entre los constituyentes (i. e. aditiva, sinérgica, antagónica), siendo este punto donde existe un gran vacío de información. Este problema ha atraído un amplio interés público y de agencias regulatorias, como la Environmental Protection Agency (EPA). Además, aportar datos para mejorar la evaluación de la ecotoxicidad acuática, también es una necesidad incluida en el IPCS (Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas), y hoy se reconoce que los estudios realizados sobre la toxicidad de metales aún son insuficientes, y siguen siendo una prioridad.

En los estudios toxicológicos se utilizan bioensayos para la obtención de datos, por medio de la relación contaminante-respuesta biológica, de tal manera que, la importancia de utilizar especies planctónicas como bioindicadores en ellos permite, no sólo el desarrollo de metodologías alternativas a los tradicionales

ensayos con mamíferos, lo cual evita la presión pública para minimizar la utilización de vertebrados en ensayos de ecotoxicidad, si no que al pertenecer a los primeros niveles de la cadena trófica (productores), los datos proporcionados posibilitan alertas tempranas de peligros ambientales causados por la contaminación ya que estos datos pueden extrapolarse a niveles tróficos superiores.

En la legislación de varios países como Estados Unidos, Canadá y los de la Comunidad Europea, entre otros, se han incluido los ensayos con microorganismos vivos para cuantificar el grado de toxicidad de efluentes industriales, aguas residuales y/o residuos sólidos, para determinar los límites de descarga y los efectos tóxicos sobre la biota, en concreto el alga *Scenedesmus intermedius*, perteneciente al fitoplancton, y utilizada como bioindicador está incluida dentro de las especies recomendadas por los protocolos definidos por varias instituciones de estandarización como la OECD por su alta sensibilidad a un considerable número de xenobióticos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la respuesta tóxica de los compuestos metálicos: Sulfato de cobre (CuSO_4), Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y Cloruro de cadmio (CdCl_2), en forma individual y en combinación en el medio acuático utilizando como bioindicador la microalga verde *Scenedesmus intermedius*.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad a corto plazo de Sulfato de cobre (CuSO_4), Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y Cloruro de cadmio (CdCl_2) a través de la Cl_{50} a los 6 días de exposición sobre la microalga *Scenedesmus intermedius*.
- Determinar la concentración a la cual no se observó efecto (NOEC) a los 6 días de exposición de Sulfato de cobre (CuSO_4), Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y Cloruro de cadmio (CdCl_2) sobre *Scenedesmus intermedius*.
- Determinar el efecto sinérgico, antagónico o aditivo de la mezcla de los tres compuestos metálicos sobre el bioindicador *Scenedesmus intermedius*.
- Comparar el volumen celular de la microalga *Scenedesmus intermedius* sobre un control, IC_{50} y NOEC a los 6 días de exposición de Sulfato de cobre (CuSO_4), Dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y Cloruro de cadmio (CdCl_2) en forma individual y en mezcla.

6.MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sustancias de ensayo

Las sustancias de ensayo utilizadas:

- CuSO_4 (MERCK), se realizaron disoluciones en agua destilada del xenobiótico para la obtención de concentraciones 0.75 mg/L - 3.5 mg/L
- CdCl_2 (Sigma-Aldrich), se realizaron disoluciones en agua destilada del xenobiótico para la obtención de concentraciones 0.015mg/L - 1.25mg/L
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Fermont), se realizaron disoluciones en agua destilada del xenobiótico para la obtención de concentraciones 0.25mg/L – 5mg/L

6.2 Material biológico

Se utilizó la microalga verde *Scenedesmus intermedius* (Si), el cual fue obtenida de la colección de cultivos de microalgas del laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH.

6.3 Ensayos de inhibición de crecimiento

Para la determinación del efecto inhibitorio de crecimiento 50 (CI_{50}) se basó en la metodología descrita por la Directriz 201 (OECD, 2011), que consiste en establecer la inhibición de crecimiento al 50% de la población de la microalga *Scenedesmus intermedius* expuesta a un xenobiótico durante 6 días.

Se utilizaron tubos de doble cierre estériles de polipropileno (Sarstedt, AG & Co. Germany), estableciendo 12 réplicas por cada concentración ensayada y un control sin exponer al xenobiótico. Inicialmente, en cada tubo se incluyó una concentración de 10^6 cel mL^{-1} en volumen total de 3mL de BG-11. Las células de la

microalga *Scenedesmus intermedius* se obtuvieron de cultivos madre, las cuales se mantuvieron en un cultivo axénico a 21°C y periodo de luz-obscuridad de 12:12h a una intensidad fotónica de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en matraces de cultivo (Greiner; Bio-One; GmbH, Germany), con 20 mL de medio de cultivo BG-11 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). La concentración de la microalga *Si* para los bioensayos se ajustó por recuento sobre cámara de Neubauer (BlauBrand, GmbH + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany).

Los sets fueron expuestos a las concentraciones crecientes del xenobiótico. Los tubos control y los tubos expuestos al tóxico se mantuvieron durante todo el ensayo a 21°C e iluminación en un ciclo de 12:12h de luz-oscuridad. A los 6 días de ser expuestas al xenobiótico se midió la biomasa celular en cámara de Neubauer.

6.4 Determinación de volumen celular

Fue obtenida la altura, diámetro y volumen de 30 células de *Scenedesmus intermedius* directamente medidas usando un sistema de análisis de imagen por observación a 100x en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) por medio de una cámara para microscopio (AmScop Microscope Digital Camera, Model Number: MU1000, FMA050, 5mm, 10MP, Color CMOS) e interpretación por el software (AmScope versión 3.7.3377, United Scope LLC, Irvine CA, U. S.), del cultivo axénico, NOEC_(6d) y CI_{50(6d)}, de los compuestos individuales y en mezcla.

7. ANÁLISIS DE DATOS

7.1 Análisis estadístico para la obtención de $CI_{50(6d)}$ Y $NOEC_{(6d)}$

Las IC_{50} se obtuvieron por la curva de Concentración–Respuesta a través de regresión lineal, mostrando la media muestral y su respectiva desviación estándar de cada valor con una $n=12$. Sometiendo los datos al test de normalidad por la prueba de D'Agostino y Pearson. La comparación de las CI_{50} de ambos compuestos se realizó por t-student no pareado, considerando un grado de significancia $p<0.05$. Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prim v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

7.2 Determinación de las interacciones de las combinaciones de los productos químicos

El propósito de este ensayo es la determinación del efecto sinérgico, aditivo y/o antagónico que puedan presentar las distintas combinaciones de dos o más sustancias químicas a través de sus $IC_{50(6d)}$, basándonos a través de la metodología descrita por (Chou, 2006), por evaluación cuantitativa en la combinación de dos o más sustancias de acuerdo a la potencia de cada producto; si dos o más sustancias de acuerdo a la potencia de cada producto; si dos xenobiótico que presentan mecanismos similares o son mutuamente excluyentes se presentan en un Índice de Combinación $IC<1$ mostrando un efecto sinérgico, pero si por el contrario dos xenobiótico presentan mecanismos totalmente distintos y son independientes se presentan en un Índice de Combinación $IC>1$, exhibirán entonces un efecto antagónico, o en su caso cuando $IC=1$ se mostraría un efecto aditivo.

Se realizó a través de un sistema de algoritmos basados en el Índice de Combinación de (Chou & Talalay, 1984) y su respectivo gráfico Fa-IC (Respuesta-Índice de Combinación), mediante el programa informático CompuSyn v 1.0.

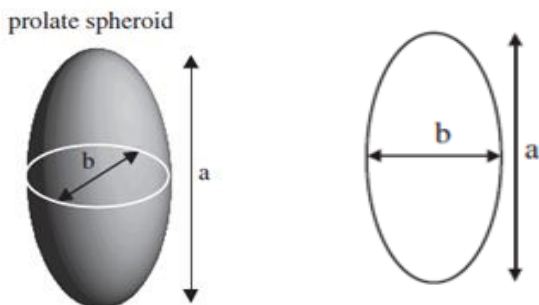
7.3 Determinación de diferencias morfológicas en volumen celular

Para la determinación de diferencias morfológicas en volumen celular exhibidas, se evaluaron a través de los modelos geométricos propuestos por Hillebrand et al., (1999) y Sun & Liu, (2003). *Scenedesmus intermedius* muestra una forma prolate spheroid (modelo 2H) (**Tabla 9**) para el cálculo de su volumen celular se basa de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Cálculo del volumen celular (V) de acuerdo con el modelo prolate spheroid (2H) (Hillebrand et al., 1999; Sun & Liu, 2003)

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot b^2 \cdot a$$

Tabla 9. Modelo geométrico prolate spheroid para la determinación del volumen celular en *Scenedesmus intermedius* (Hillebrand et al., 1999; Sun & Liu, 2003).

Código de forma	Forma simulada
2-H	 El diagrama muestra un elipsoide prolato (prolate spheroid) con sus ejes de longitud 'a' y anchura 'b'. A la izquierda, se muestra una representación tridimensional sombreada del elipsoide con una línea blanca que indica el eje de anchura 'b'. A la derecha, se muestra una representación bidimensional de un elipse con los ejes 'a' (vertical) y 'b' (horizontal) etiquetados con flechas y letras.

Los cálculos estadísticos de volumen celular son realizados por medio de un ANOVA de 1 vía por el test Dunnett en el paquete estadístico Graphpad Prims v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA).

8.RESULTADOS

8.1 Respuesta de sulfato de cobre (CuSO_4), dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y cloruro de cadmio (CdCl_2) sobre *Scenedesmus intermedius*

La Agencia de Protección Ambiental propone categorizar las sustancias contaminantes para el ambiente acuático para pruebas de toxicidad aguda dentro de la cual, se encuentran 4 categorías (Cl_{50} expresado en mg/L):

- **Categoría I**, se encuentran las sustancias con una $\text{Cl}_{50} < 1$ mg/L, es decir, en sustancias altamente tóxicas para organismos acuáticos.
- **Categoría II**, se encuentran las sustancias con una Cl_{50} de 1-10 mg/L, para las sustancias que son tóxicas para ambientes acuáticos.
- **Categoría III**, se encuentran las sustancias con una Cl_{50} de 10-100 mg/L, estas son sustancias peligrosas para el ambiente acuático.
- **Categoría IV**, se encuentran las sustancias no tóxicas con una Cl_{50} igual o mayor que 100 mg/L, es decir, son consideradas como sustancias que no representan riesgo nocivo para los organismos acuáticos.

De acuerdo a lo anterior, en la **Tabla 10**, se muestran los valores de la $\text{NOEC}_{(6d)}$ y la $\text{Cl}_{50(6d)}$ para CuSO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y CdCl_2 , de acuerdo con estos resultados, el CuSO_4 y el CdCl_2 se categorizan como sustancias altamente tóxicas para el ambiente acuático (Categoría I), mientras que el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ entra dentro de la categoría II, como sustancia que es tóxica para el ambiente acuático por la Agencia de Protección Ambiental (EPA).

Con relación a lo anterior, en la **Gráfica 3**, se puede observar la respuesta de la concentración-respuesta en forma lineal del efecto de los xenobióticos sobre el crecimiento de la microalga *Scenedesmus intermedius*, donde el CdCl_2 mostró una mayor toxicidad ante la microalga, seguido por el CuSO_4 y el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Tabla 10. Valores de la IC_{50} y $NOEC$ de los xenobióticos sobre *Scenedesmus intermedius* a 6d de exposición

COMPUESTO	$CuSO_4$	$K_2Cr_2O_7$	$CdCl_2$
CI_{50} (6d)	0.71mg/L	1.19 mg/L	0.13mg/L
(L.C. al 95%)	(0.22-1.05)	(0.58-2.25)	(0.033-0.32)
$NOEC_{(6d)}$	0.062mg/L	0.173mg/L	0.00245mg/L
(L.C. al 95%)	(0.00087-0.21)	(0.020-0.37)	(0.0000143-0-014)
r	0.96	0.99	0.99

8.2 Respuesta de la mezcla de sulfato de cobre ($CuSO_4$), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y cloruro de cadmio ($CdCl_2$) sobre *Scenedesmus intermedius*

Los resultados obtenidos de los datos de toxicidad para las mezclas binarias de los productos químicos, mostraron que para la mezcla de $CdCl_2/K_2Cr_2O_7$ dieron un efecto antagónico en diferentes magnitudes, ya que el índice de combinación (IC) en los datos presentados de la fracción afectada (Fa) indican que son mayor a uno, inhibiendo así la respuesta tóxica de ambos compuestos (**Tabla 11, Gráfica 2-A**). Este mismo comportamiento resultó para la mezcla de $K_2Cr_2O_7/CuSO_4$ (**Tabla 11, Gráfica 2-C**).

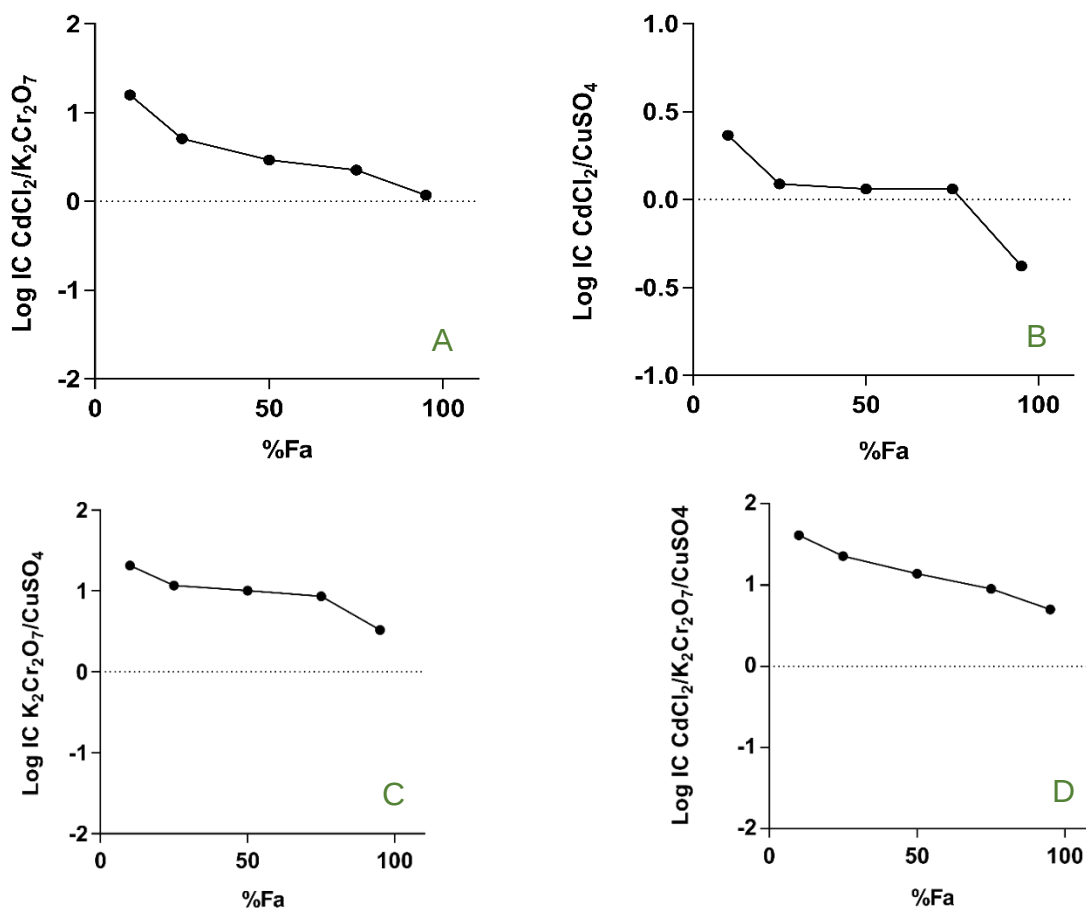
En cambio, la mezcla de $CdCl_2/CuSO_4$ mostró una ligera interacción antagonista entre las sales metálicas ($IC_{10\%}>1$), no obstante, para la $IC_{50\%}$ la respuesta de las sales metálicas resultó en la suma de los efectos individuales en la mezcla (efecto aditivo), sin embargo, la mezcla mostró una tendencia al aumento de la toxicidad que produce sinergismo en concentraciones más altas (**Tabla 11, Gráfica 2-B**).

Finalmente, el combo de las tres sales metálicas resultó mostró efectos antagónicos ($IC > 1$) en las diferentes magnitudes, permaneciendo en el mismo plano de fuerza antagónica mostrada en la **Gráfica 2-D**.

Tabla 11. Valores del índice de combinación (IC) de las mezclas binarias de los productos químicos

Mezcla CdCl ₂ /K ₂ Cr ₂ O ₇		
%Fa	IC	EFEECTO
10	15.47	Antagónico
25	5.94	
50	2.75	
75	1.74	
95	1.45	
100	2.26	
Mezcla CdCl ₂ /CuSO ₄		
10	2.26	Antagónico
25	1.50	
50	1.06	Aditivo
75	0.81	Sinérgico
95	0.55	
100	0.18	
Mezcla K ₂ Cr ₂ O ₇ /CuSO ₄		
10	26.60	Antagónico
25	17.85	
50	12.15	
75	8.44	
95	4.94	
100	2.59	

Nota:* Los rangos de IC y los efectos se perfeccionan a partir de los descritos por Chou (1991). $IC < 1$, $IC = 1$ y $IC > 1$ indican sinergismo, efecto aditivo y antagonismo respectivamente (Chou, 2006).



Gráfica 1. Fa-Log IC. Efectos de las mezclas binarias de productos químicos en el Índice de Combinación (IC). (A) y (B), representan la combinación del cloruro de cadmio con dicromato de potasio y sulfato de cobre. (C), representa la combinación de dicromato de potasio con sulfato de cobre. (D), representa el efecto de la mezcla de los tres productos químicos en el índice de combinación.

Por otro lado, en la **Tabla 12**, se pueden observar los valores de $\text{Cl}_{50(6d)}$ de las mezclas de los compuestos metálicos, confirmando que la mezcla de $\text{CdCl}_2/\text{CuSO}_4$ presentó mayor toxicidad seguido por las mezclas de $\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{CuSO}_4$, siendo el combo de $\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{CuSO}_4$ el que presentó una menor toxicidad.

Acorde con lo anterior, en la **Figura 14** se muestran los diferentes poligonogramas con las respuestas de las interacciones toxicológicas de las sales metálicas en combinaciones binarias, representado de una forma cualitativa las interacciones a diferentes niveles de la Fa (la fracción afectada, representa el efecto sobre la microalga). La línea verde delgada, representa el efecto aditivo. La línea

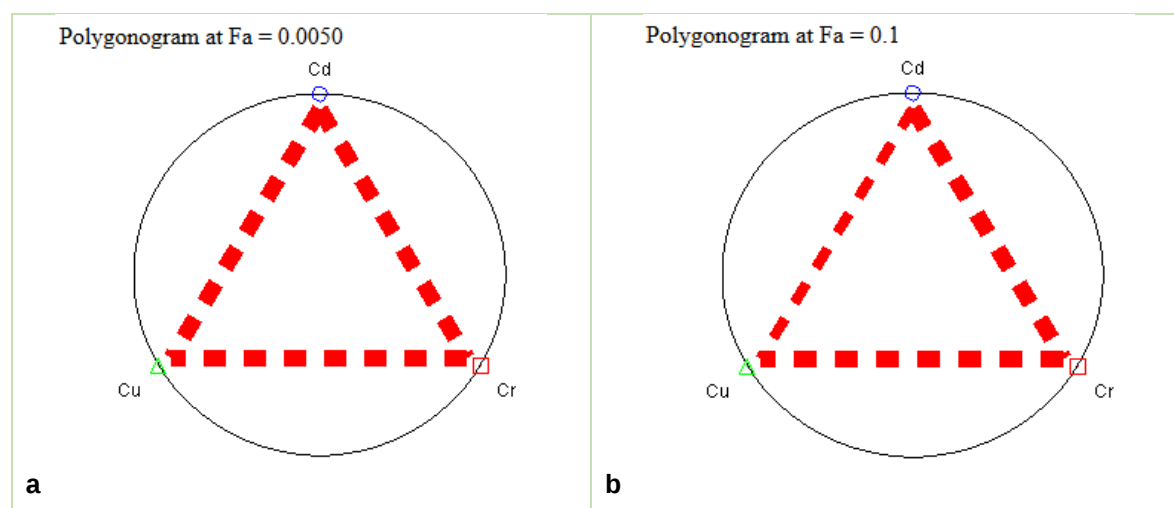
verde sólida, representa el afecto sinérgico. La línea punteada roja, representa el efecto antagónico, y el grosor de las líneas representa la intensidad de la interacción.

Tabla 12. Comparación entre mezclas con respecto a la mezcla de las 3 sales metálicas

MEZCLA	IC _{50(6d)} mg/L (L.C. 95%)	Ecuación
CdCl₂/K₂Cr₂O₇	1.23 (0.89-1.69) ***	Y = 1.527X - 0.1402 r = 0.98
CdCl₂/CuSO₄	0.67 (0.44-1.01) ***	Y = 1.148X + 0.1975 r = 0.98
K₂Cr₂O₇/CuSO₄	9.24 (6.65-12.65) ^{ns}	Y = 1.526X - 1.474 r = 0.98
CdCl₂/K₂Cr₂O₇/CuSO₄	9.44 (9.43-9.45)	Y = 1.528X - 1.489 r = 1.00

NOTA: *** Diferencias muy significativas con una $p > 0.0001$ con respecto al combo ^{ns} Diferencias no significativas con respecto al combo.

En resumen, como se muestra en la **Gráfica 3**, la mezcla binaria de CdCl₂/CuSO₄ resultó con mayor toxicidad seguido por las mezclas de CdCl₂/K₂Cr₂O₇ y K₂Cr₂O₇/CuSO₄, siendo el combo de los tres compuestos el que presentó menor toxicidad.



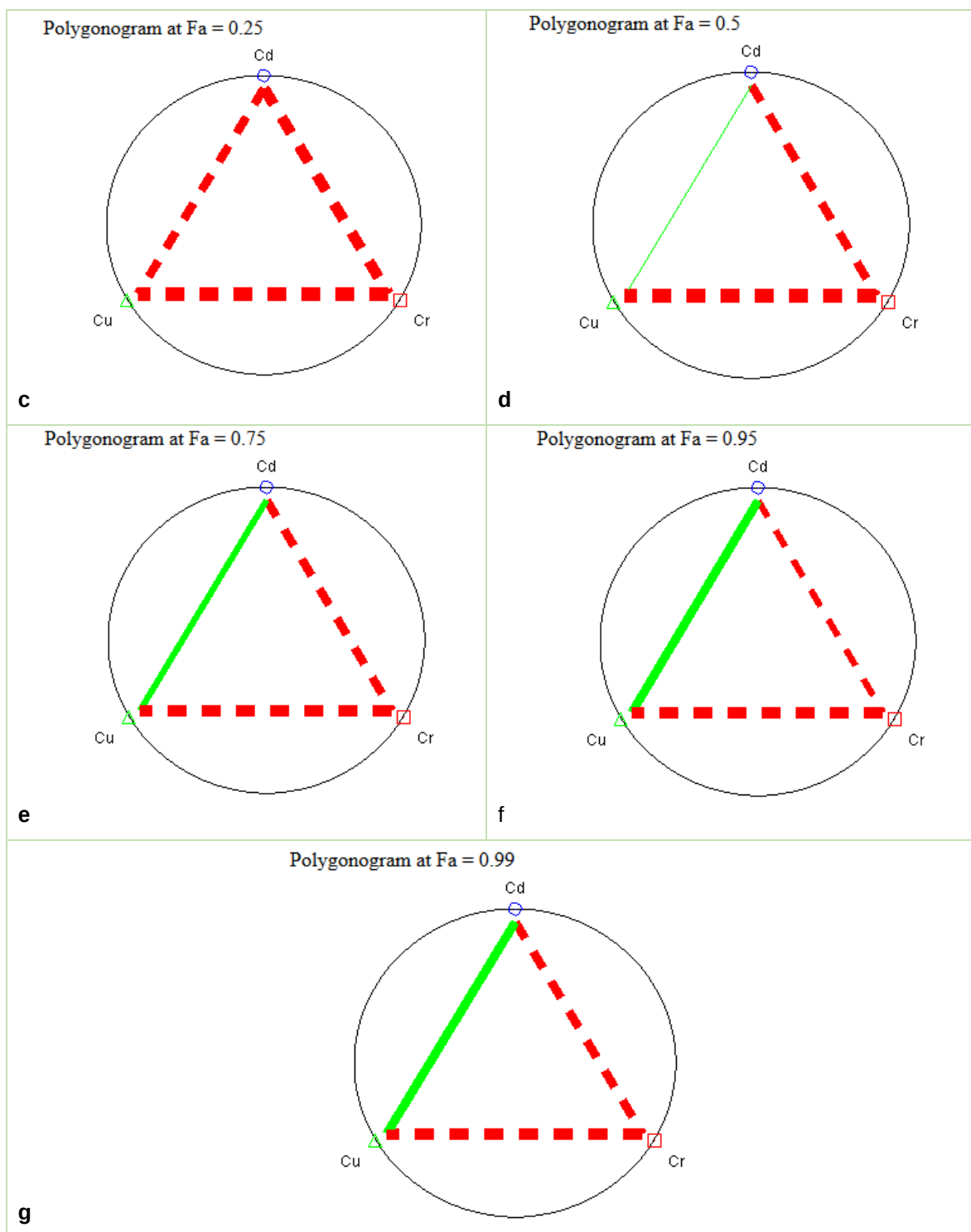
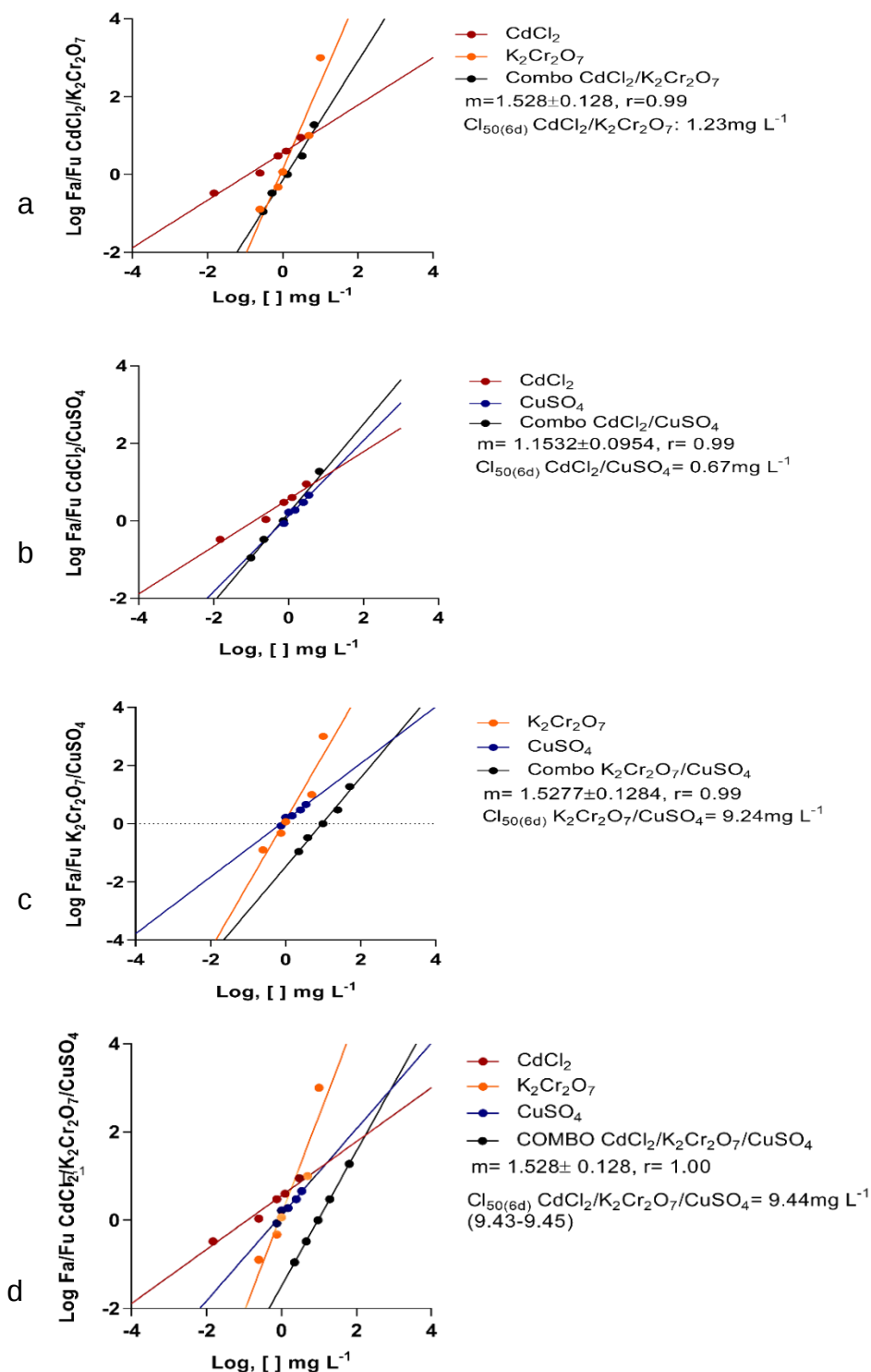


Figura 14. Poligonograma para los tres xenobióticos en la mezcla en IC_{50} sobre *Scenedesmus intermedius*. Fa correspondiente al efecto de (a) 0.50%, (b) 10%, (c) 25%, (d) 50%, (f) 75%, (g) 95% y (h) 100%.



Gráfica 2. Efecto medio de la mezcla binaria de los xenobióticos sobre Scenedesmus intermedius. a) y b), efecto de la mezcla binaria de CdCl_2 con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y CuSO_4 respectivamente, comparados con la respuesta individual de los xenobióticos. c), efecto de la mezcla binaria de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{CuSO}_4$ comparado con la respuesta individual de los xenobióticos. d), Efecto de la mezcla de los tres xenobióticos comparándolo con la respuesta individual de estos.

8.3 Análisis de morfología celular de *Scenedesmus intermedius*

Para calcular el biovolumen para las células de la microalga verde *Scenedesmus intermedius* se utilizó la **ecuación 1**, que fue propuesta por Hillebrand et al., (1999) y Sun & Liu, (2003). Se obtuvo el volumen para las células control, así como para las expuestas a la 6d-NOEC y la IC_{50(6d)} de sulfato de cobre, dicromato de potasio y cloruro de cadmio de manera individual y el combo de estos.

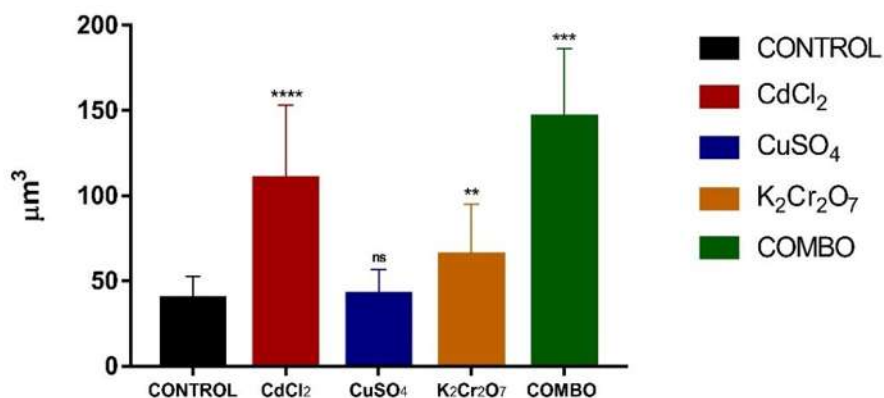
Tabla 13. Comparación del biovolumen calculado para la 6d-NOEC y la IC_{50(6d)} de los xenobióticos sobre *S. intermedius*

	Control	CuSO ₄	K ₂ Cr ₂ O ₇	CdCl ₂	Combo
IC _{50(6d)}	39.40	42.11 ^{ns}	65.39 ^{**}	110.10 ^{***}	146.30 ^{***}
NOEC _(6d)	42.69	38.56 ^{ns}	56.47 ^{**}	42.68 ^{ns}	93.32 ^{***}

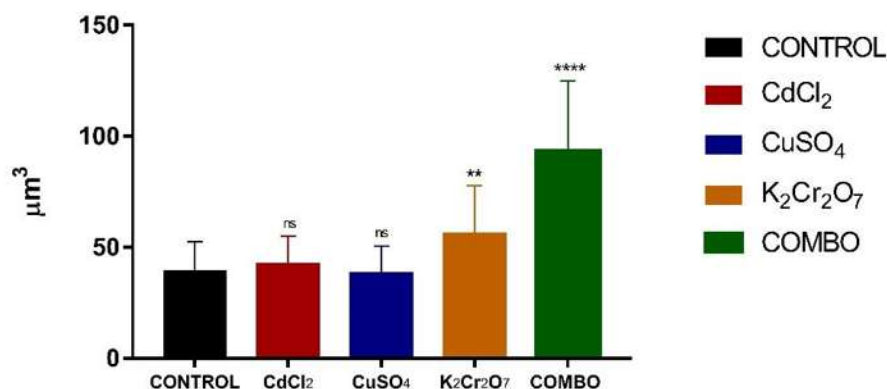
NOTA: *** Diferencias muy significativas con una p>0.0001 con respecto a control. **Diferencias significativas con una p>0.001 con respecto a control. ^{ns} Diferencias no significativas con respecto a control.

Según los datos obtenidos para las mediciones de las células de *Scenedesmus intermedius*, mediante el análisis estadístico, se puede observar que en el caso del biovolumen de las células expuestas a la IC_{50(6d)} y a la 6d-NOEC el sulfato de cobre no presentó diferencias significativas con respecto a control, en cambio, el dicromato de potasio y cloruro de cadmio en comparación con las células control, presentan poco significativas y significativas respectivamente (**Tabla 13, Gráfica 4 y Gráfica 5**).

Sin embargo, en el caso del combo de las tres sales metálicas se observó un aumento del volumen de las células del 73% ante la exposición de las IC_{50(6d)} y un 54% para la exposición a la NOEC_(6d) comparadas con las células control (**Tabla 13, Gráfica 4 y Gráfica 5**).



Gráfica 4. Diferencias entre el biovolumen de las células de *S. intermedius* expuestas a la IC_{50(6d)} de los tres xenobióticos de manera individual y en combo.



Gráfica 3. Diferencias entre el biovolumen de las células de *S. intermedius* expuestas a la NOEC_(6d) de los tres xenobióticos de manera individual y en combo.

NOTA: *** Diferencias muy significativas con una $p > 0.0001$ con respecto a control. **Diferencias significativas con una $p > 0.005$ con respecto a control. ns Diferencias no significativas con respecto a control.

Por otro lado, se pueden observar las diferencias morfológicas de las células de *S. intermedius* en la **Figura 16-B, Figura 17-D, Figura 18-F y Figura 19-H**, se pueden observar las células expuestas a las Cl₅₀ de sulfato de cobre, dicromato de potasio, cloruro de cadmio y el combo de estos, respectivamente. Por otro lado, en la **Figura 16-C, Figura 17-E, Figura 18-G y Figura 19-I** se pueden observar las células de la microalga expuestas a la NOEC_(6d) de las sales metálicas de manera individual y el combo de estos.

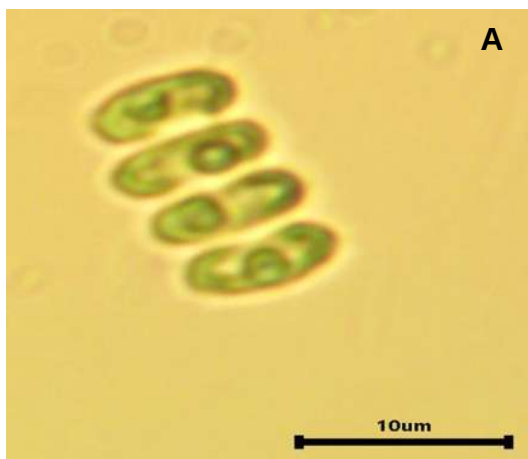


Figura 15. Célula control de *Scenedesmus intermedius*.

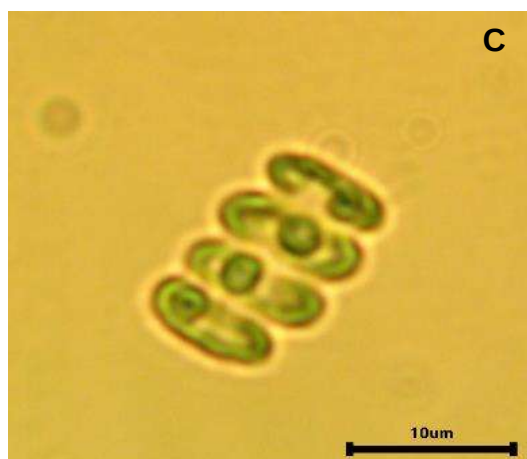
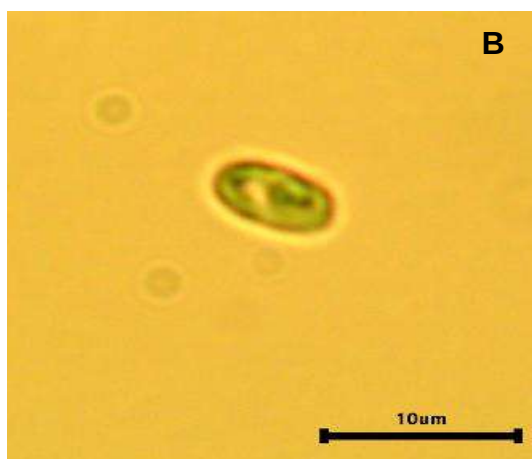


Figura 16. B), Célula de *S. intermedius* expuesta a la $IC_{50(6d)}$ de $CuSO_4$. C), Células de *S. intermedius* expuestas a la $NOEC_{(6d)}$ de $CuSO_4$

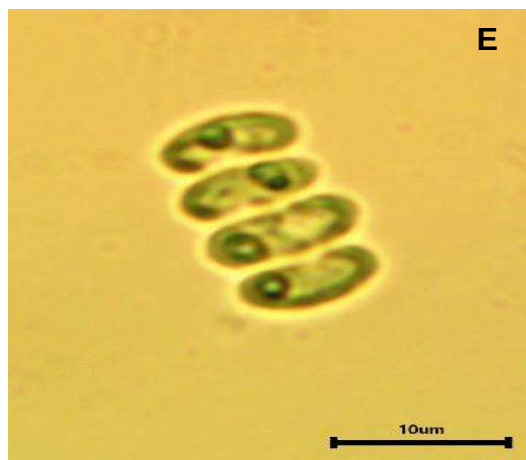
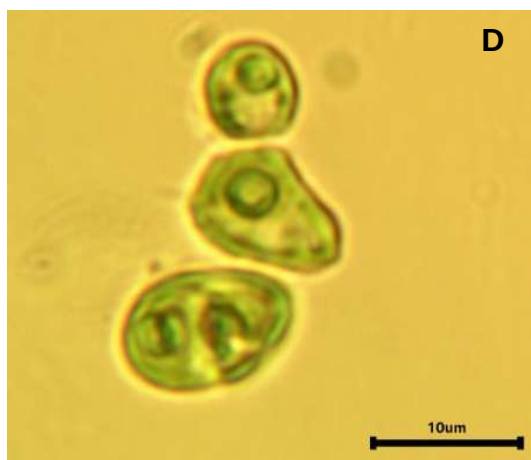


Figura 17. D), Célula de *S. intermedius* expuesta a la $IC_{50(6d)}$ de $K_2Cr_2O_7$. E), Células de *S. intermedius* expuestas a la $NOEC_{(6d)}$ de $K_2Cr_2O_7$.

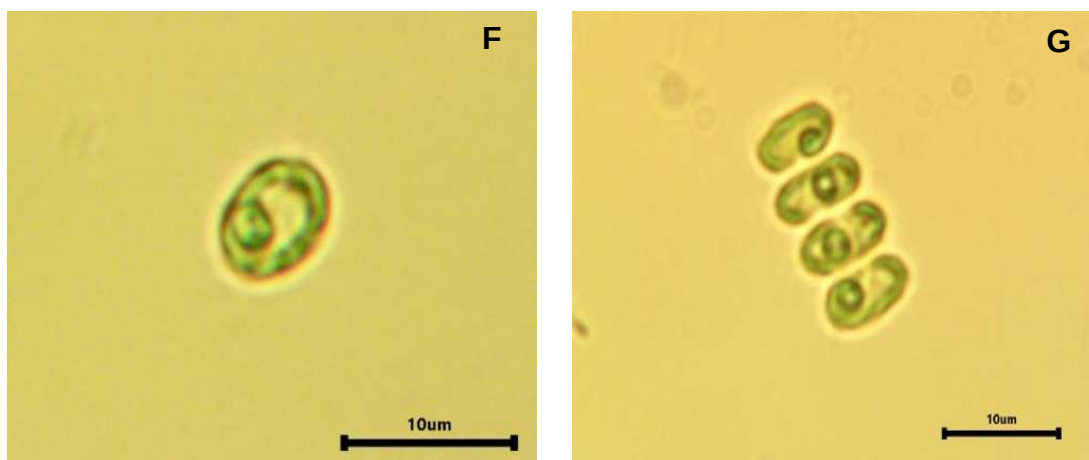


Figura 18. F), Célula de *S. intermedius* expuesta a la $IC_{50(6d)}$ de $CdCl_2$. G), Células de *S. intermedius* expuestas a la $NOEC_{(6d)}$ de $CdCl_2$.

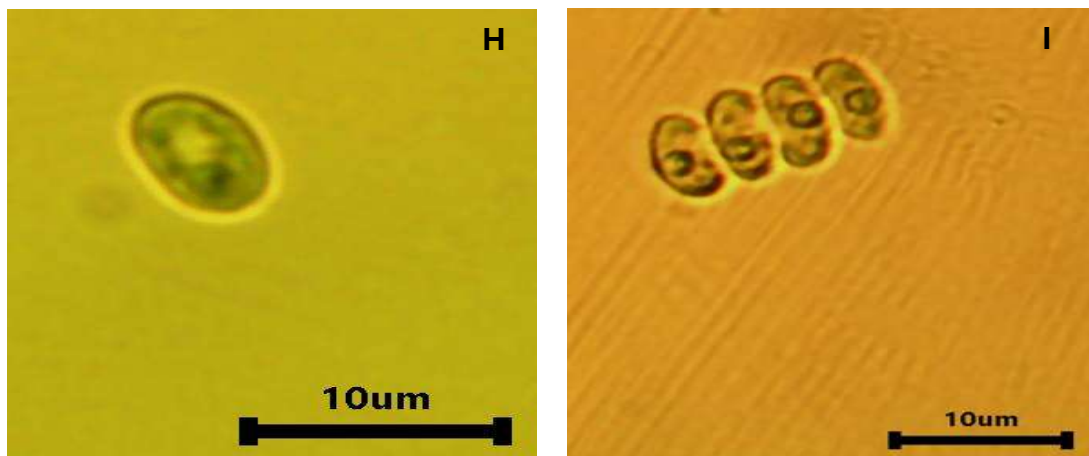
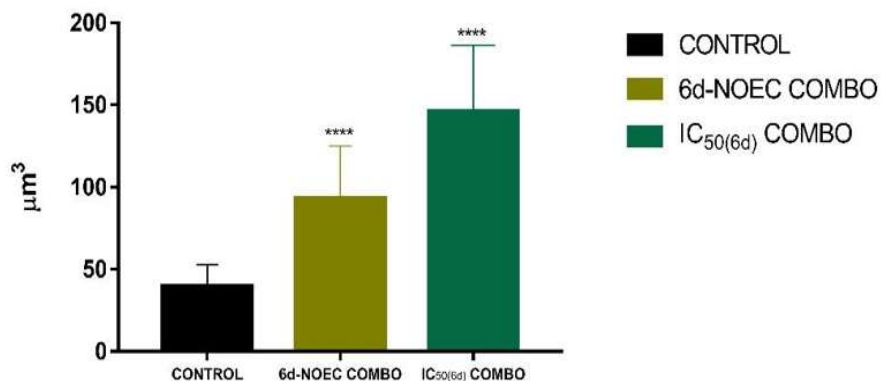


Figura 19. H), Célula de *S. intermedius* expuesta a la $IC_{50(6d)}$ del combo de los tres xenobióticos. I), Células de *S. intermedius* expuestas a la $NOEC_{(6d)}$ del combo de los tres xenobióticos.

En resumen, de acuerdo con los datos obtenidos del volumen de las células de *Scenedesmus intermedius*, se infiere que, a concentraciones bajas de las sales metálicas de manera individual, las células de *Scenedesmus intermedius* utiliza estos como fuente de metales esenciales, mientras que, a concentraciones altas, lleva a la célula a una posible apoptosis por el aumento en su volumen celular, confirmando así el efecto de hormesis de los xenobióticos en la microalga. En cambio, las células de *S. intermedius* expuestas a la mezcla de los tres xenobióticos,

mostró un aumento significativo en el volumen tanto en bajas como en altas concentraciones, debido al efecto tóxico de los estos xenobióticos (**Gráfica 6**).



Gráfica 5. Diferencias entre el biovolumen de las células de *S. intermedius* expuestas a la NOEC_(6d) y IC_{50(6d)} del combo de los xenobióticos

NOTA: *** Diferencias muy significativas con una $p > 0.0001$ con respecto a control.

9.DISCUSIÓN

Una de las principales causas del deterioro del medio ambiente lo constituye la contaminación por metales debido al alto nivel de toxicidad que ellos representan para la salud humana; lo cual se acentúa por su persistencia y la acumulación en los organismos, ya que se trata de compuestos que no se biodegradan fácilmente (Carballo et al., 2012), esto plantea una grave amenaza para los organismos acuáticos (incluso a concentraciones mínimas) ya que tienen la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica (Monteiro et al., 2011). De tal manera que, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) consideran a los metales pesados dentro de los diez grupos de xenobióticos prioritarios para ser estudiados y tomar acciones en su control y disposición (Jaramillo J. et al., 2008). En los sistemas acuáticos, las microalgas constituyen el principal componente del fitoplancton que soporta la cadena trófica, de esta manera, un cambio, sea cualitativo o cuantitativo, producido por un contaminante, podría repercutir drásticamente en el ecosistema (Cordero et al., 2014).

En este contexto, los bioensayos ecotoxicológicos, han sido recomendadas como herramientas indispensables en las evaluaciones de impacto ambiental que genera cualquier tipo de contaminante incluidos los metales pesados y en la obtención de autorizaciones gubernamentales para realizar actividades productivas, tanto por los expertos del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y por la Organización Mundial de la Salud (Franklin et al., 2002). Entre los parámetros que pueden indicar un efecto tóxico de los agentes contaminantes sobre los organismos, el más estudiado y utilizado es la inhibición de crecimiento de las microalgas (Vázquez et al., 2006).

De tal manera que, la evaluación de la toxicidad de los compuestos metálicos en este estudio se realizó sobre un bioindicador representante del fitoplancton (*Scenedesmus intermedius*). En la actualidad, la base fisiológica de los efectos interactivos entre metales y microalgas no es bien conocida, y aún no

existen suficientes estudios donde se mida el efecto de la interacción en términos de unión celular, captación de metales y toxicidad. (Franklin et al., 2002).

Por otro lado, existe una numerosa cantidad de factores que tienen influencia sobre la respuesta de toxicidad de los metales en los organismos acuáticos. En primera instancia éstos pueden dividirse en factores de tipo fisicoquímicos y de tipo biológicos. Los primeros involucran a todos aquellos parámetros que afectan a la especiación química de los metales, con la presencia de otros metales y de otros contaminantes (plaguicidas, hidrocarburos del petróleo).

Los factores biológicos que influyen o que tienen relación con los efectos de los metales están estrechamente vinculados con las condiciones propias de los organismos como son la edad, talla, peso, sexo, estadio, madurez gonádica, capacidad de adaptación, hábitos alimenticios, entre otros (Páez-Osuna, 2005). Por otro lado, la captación y toxicidad de los metales pesados sobre los organismos acuáticos están influidos no solo por su concentración, sino que también son relevantes el tiempo de exposición y los factores bióticos y abióticos del ambiente (Castañé, et al., 2003). Un aspecto importante relacionado con los organismos a prueba es el efecto hormesis, ya que los bioindicadores al desempeñarse como productores en la cadena trófica (como las microalgas), podrían estar acumulando sustancias tóxicas en su interior y el riesgo estaría asociado directamente con los organismos consumidores, debido a que se estarían generando procesos de biomagnificación, los cuales repercutirán en la población humana.

Una valoración del riesgo tóxico, originada por CuSO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y CdCl_2 , de manera individual y en mezcla, sobre fitoplancton representativo de los ecosistemas acuáticos dulces a través de la microalga *Scenedesmus intermedius*, ha sido realizada en el presente estudio. Para ello, la importancia de estos productores primarios, tanto en la cadena trófica como en la valoración del riesgo ambiental, se ha tenido en consideración dentro de los ecosistemas acuáticos.

En este estudio, se obtuvo la $\text{Cl}_{50(6d)}$ para sulfato de cobre (CuSO_4) de 0.71 mg/L (0.22-1.05) sobre la microalga *Scenedesmus intermedius* que, de acuerdo con

la EPA, se encuentra en la categoría I como sustancia muy tóxica para el ambiente acuático.

En un estudio realizado por Yan & Pan, (2002), donde utilizaron las microalgas de agua dulce: *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Closterium lunula*, para obtener la CI_{50} a 96 horas de exposición al cobre, las cuales fueron de 0.05mg/L, 0.068mg/L y 0.2mg/L respectivamente. Estos resultados muestran una gran similitud con los resultados de este estudio, manteniéndose dentro de la categoría I por la EPA.

Otro estudio realizado por Franklin et al., (2002), donde obtuvieron la toxicidad del cobre sobre el crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. obteniendo una IC_{50} a 48h de 0.09mg/L y una CI_{50} a 72h de 0.11mg/L del sulfato de cobre, donde también es considerado altamente tóxico para el medio acuático.

En otro estudio realizado por Cordero et al., (2014), donde utilizaron como bioindicador a *Tetraselmis Chuii*, una microalga de gran distribución en los ecosistemas marinos, obtuvieron una CI_{50} a 48 horas de exposición de 6.4mg/L. En dicho estudio, se observó que a bajas concentraciones se produjo una mayor densidad celular que la inicial al bioensayo, sugiriendo una activación celular. Este comportamiento puede estar relacionado con la utilización del cobre como micronutriente y la diferencia del ambiente acuático de las microalgas.

Por otro lado, existe una variedad de estudios del cobre en diferentes organismos de agua marina encontrados en la literatura. Un ejemplo es el estudio realizado por Cortés et al., (2018), donde estudiaron la toxicidad aguda del sulfato de cobre sobre *Artemia franciscana*, que es un microcrustáceo representante del zooplancton como primer consumidor de la cadena trófica, obteniendo una LC_{50} a 24 horas, la cual fue de 28.91 mg/L. Claramente se puede observar que la sensibilidad de crustáceo es menor a la del fitoplancton, sin embargo, es de destacar la importancia de los estudios de toxicidad en diferentes representantes de la cadena trófica

Otro estudio realizado por Gaete & Paredes, (1996), donde estudiaron la toxicidad aguda del cobre sobre *D. magna* (cladócero de agua dulce), obteniendo una $LC_{50(24h)}$ de 60 mg/L, comparándolo con el estudio realizado por Gaete & Chávez, (2008), donde utilizaron como bioindicador a *D. obtusa*, obtuvieron una IC_{50} a 24horas de 15.8mg/L. Las diferencias entre ambos estudios pueden deberse al tipo de compuesto utilizado en los ensayos.

En la Tabla 13, se puede observar de manera más simplificada la recopilación de las IC_{50} y las CL_{50} de la exposición de cobre en diferentes organismos acuáticos obtenidos de diferentes estudios realizados sobre la toxicidad del cobre.

Tabla 14. IC_{50} de cobre ante la exposición de diferentes especies

Especie	Concentración (mg/L)	Forma de cobre utilizada	Tiempo de ensayo	Referencia
<i>Scenedesmus obliquus</i> ,	0.05mg/L	Cu	Cl_{50} -96h	(Yan & Pan, 2002)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.068mg/L	Cu	Cl_{50} -96h	(Yan & Pan, 2002)
<i>Closterium lúnula</i>	0.2mg/L	Cu	Cl_{50} -96h	(Yan & Pan, 2002)
<i>Chlorella</i> sp	0.09mg/L	$CuSO_4$	Cl_{50} -48h	(Franklin et al., 2002b)
<i>Chlorella</i> sp	0.11mg/L	$CuSO_4$	Cl_{50} -72h	(Franklin et al., 2002a)
<i>Tretaselmis Chuii</i>	6.4mg/L	$CuSO_4$	Cl_{50} -48h	(Cordero et al., 2014)
<i>Artemia franciscana</i>	28.91mg/L	$CuSO_4$	CL_{50} -24h	(Cortés et al., 2018)

<i>D. magna</i>	60mg/L	Cl ₂ Cu	CL ₅₀ -24h	(Gaete & Paredes, 1996)
<i>D. obtusa</i>	15.8mg/L	CuSO ₄ •5H ₂ O	CL ₅₀ -24h	(Gaete & Chávez, 2008)

Se puede observar claramente que el cobre es uno de los metales más estudiados de manera individual. Páez-Osuna (2005) comenta que existe una variabilidad de los resultados que se encuentran en la literatura, ya que la toxicidad del cobre es atribuida principalmente al ión Cu (II), el cual puede llegar a formar complejos fácilmente con una gran variedad de sustancias que se hallan, tanto en aguas limpias y contaminadas. También, es absorbido con cierta facilidad por el material suspendido (oxidihidroxilo de hierro y manganeso, minerales arcillosos, materia orgánica, entre otros). Esta propiedad y las dificultades relacionadas con la separación de las especies químicas influyen y tiene que ver con la variabilidad de los resultados.

Por otro lado, se obtuvo la Cl_{50(6d)} para dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) de 1.19 mg/L (0.58-2.25) sobre la microalga *Scenedesmus intermedius* que, de acuerdo con la EPA, se encuentra en la categoría II como sustancia tóxica para el ambiente acuático.

Los estudios de toxicidad del cromo son escasos, sin embargo, los datos disponibles abarcan una gran variedad de especies, dentro de los estudios previos no se encontró datos con *S. intermedius*. Pero, de acuerdo con los organismos de aguas dulces se encuentra las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Selenastrum capricornutum* que fueron utilizadas en un estudio realizado por (Mo et al., 2016), donde obtuvieron como resultado una IC_{50(96h)} de 0.61 mg/L y 0.696mg/L respectivamente. En otro estudio realizado por (Sánchez-Fortún et al., 2009), donde utilizan como bioindicador la microalga *Dictyosphaerium chlorelloides* obtuvieron una Cl₅₀ a 72 horas exposición de 1.64mg/L. El análisis toxicológico estándar demuestra claramente que las microalgas son muy sensibles al efecto del cromo. A

pesar de esto, la evidencia en la literatura demuestra la existencia de algún tipo de variabilidad entre las especies de las microalgas y por ende la diversa sensibilidad observada en los resultados. Sin olvidar el tiempo de los ensayos que puede ser un factor para la presente diversidad de los resultados.

En la **Tabla 14**, se puede observar de manera más simplificada la recopilación de las IC₅₀ de la exposición de cobre en diferentes organismos acuáticos obtenidos de diferentes estudios realizados sobre la toxicidad del cromo.

Tabla 15. IC₅₀ de cromo ante la exposición de diferentes especies

Especie	Concentración (mg/L)	Forma de cromo utilizada	Tiempo de ensayo	Referencia
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.61mg/L	K ₂ Cr ₂ O ₇	96h	(Mo et al., 2016)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	0.696mg/L	K ₂ Cr ₂ O ₇	96h	(Mo et al., 2016)
<i>Dictyosphaerium chlorelloides</i>	1.64mg/L	Cr	72h	(Sánchez-Fortún et al., 2009)

La capacidad del cromo de inhibir la fotosíntesis ha sido reportada previamente para algunas algas. Los efectos dependen tanto de la naturaleza del organismo (tamaño celular, estructura de la pared celular y reacciones redox) y de la duración de la exposición (Chen et al., 2003; Pinto et al., 2003; Zayed & Ferry, 2003).

En este estudio, se obtuvo la CI_{50(6d)} para cloruro de cadmio (CdCl₂) de 0.13 mg/L (0.033-0.13) sobre la microalga *Scenedesmus intermedius* que, de acuerdo con la EPA, se encuentra en la categoría I como sustancia muy tóxica para el ambiente acuático.

Los estudios de toxicidad del cadmio disponibles en la literatura abarcan una gran variedad de especies, dentro de los estudios previos no se encontró datos con

S. intermedius. Pero, de acuerdo con los organismos de aguas dulces se encuentra la microalga *Chlorella pyrenoidosa* que fue utilizada en un estudio de Mo et al., (2016) donde obtuvieron como resultado una $CI_{50(96h)}$ de 0.017mg/L. De acuerdo con el estudio realizado por Vera et al., (2001), donde utilizaron la microalga *Chaetoceros gracilis*, obtuvieron una $CI_{50(5d)}$ de 0.000591mg/L. Otro estudio realizado por Franklin et al., (2002) obtuvieron una $CI_{50(72h)}$ de 0.00085mg/L utilizando como bioindicador a la microalga *Chlorella* sp.

De este modo se puede observar la diferencia entre la sensibilidad de los organismos al tóxico, sin embargo, se sigue manteniendo una respuesta tóxica elevada para estos microorganismos como primero eslabones de la cadena trófica.

Entre los estudios de toxicidad del cadmio para organismos de agua marina se encuentra el estudio realizado por Cordero et al., (2014), donde utilizaron como bioindicador a *Tetraselmis Chuii*, una microalga de gran distribución en los ecosistemas marinos, obtuvieron una CI_{50} a 48 horas de 5.44mg/L. En dicho estudio, se observó el efecto hormesis, es decir, que a bajas concentración se produjo una mayor densidad celular que la inicial del bioensayo. Se ha considerado que el cadmio puede actuar como un micronutriente cuando se encuentra en concentraciones traza y existe limitación en el ambiente de micronutrientes esenciales. Sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos en el estudio realizado por Romero et al., (2002), quienes de igual manera utilizaron la microalga *Tetraselmis Chuii*, además de la microalga *Chaetoceros* sp (diatomea marina), donde obtuvieron una IC_{50} a 96 horas de exposición, las cuales fueron de 0.63mg/L y 0.56mg/L respectivamente. Las diferencias en estos estudios pueden deberse al tiempo de exposición y al tipo de bioindicador utilizado.

En la **Tabla 15**, se puede observar de manera más simplificada la recopilación de las IC_{50} de la exposición de cobre en diferentes organismos acuáticos obtenidos de diferentes estudios realizados sobre la toxicidad del cadmio.

Tabla 16. Cl_{50} de cadmio expuesto a diferentes especies

Especie	Concentración (mg/L)	Forma de cobre utilizada	Tiempo de estudio	Referencia
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.017mg/L	$CdCl_2$	96h	(Mo et al., 2016)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	0.000591mg/L	Cd	5d	(Vera et al., 2001)
<i>Chlorella sp.</i>	0.00085mg/L	$CdSO_4 \cdot 8H_2O$	72h	(Franklin et al., 2002b)
<i>Tetraselmis Chuii</i>	0.63mg/L	$CdCl_2$	96h	(Romero et al., 2002)
<i>Chaetoceeros sp.</i>	0.56mg/L	$CdCl_2$	96h	(Y. Romero et al., 2002)
<i>Tetraselmis Chuii</i>	5.44mg/L	$CdCl_2$	48h	(Cordero et al., 2014)

Según Vera et al., (2001), las diferencias de senilidad al cadmio entre las diferentes especies de microalgas, dependerán de las características de la pared y membrana celular (permeabilidad), de los mecanismos de detoxificación, de la acción toxica y del grado de bioconcentración.

En general, al comparar todos los resultados encontrados en la literatura tanto de los compuestos de cobre, cromo y cadmio, se puede afirmar que el cadmio y cobre presenta mayor toxicidad que el cromo, ya que las concentraciones letales medias en microorganismos de agua dulce, el cadmio y cobre son mucho menores que las del cromo.

En cuanto a la mezcla de metales, la protección de los ecosistemas acuáticos se basa en normas ambientales que considera las concentraciones máximas permisibles de las sustancias químicas individualmente, un ejemplo de ellos es la NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales y bienes nacionales (DOF,

1996). Sin embargo, en la realidad existen mezclas complejas en las que se producen múltiples interacciones entre los constituyentes, en este sentido al combinar dos o más agentes químicos puede causar interacciones con respuestas aditivas, de sinergismo y/o antagonismo (Gaete & Paredes, 1996; Gaete & Chávez, 2008). De tal manera que la Agencia de Protección Ambiental (EPA) recomienda una evaluación de estas interacciones toxicológicas entre los componentes tóxicos. Sin embargo, en la literatura, el conocimiento sobre el potencial toxicológico de las interacciones es limitado, así como su aplicabilidad directa a mezclas asociadas con sitios de aguas residuales peligrosas (Cortés et al., 2018).

No obstante, ha habido informes aislados sobre efecto sinérgico o la neutralización de los metales pesados específicos en los sistemas biológicos (Chu & Chow, 2002), por ejemplo, copépodos *Amphiascus tenuiremis* (Hagopian-Schlekat, et al., 2001) y nematodo *C. elegans* (Power & De Pomerai, 1999). Diferentes estudios indican efectos aditivos de metales y compuestos orgánicos cuando se encuentran en forma mezcla (Warne & Hawker, 1995; 1996; Sharma, et al., 1999).

Los resultados obtenidos en este estudio por las mezclas binarias dieron como resultado: una respuesta antagónica con un $IC > 1$ para las dos mezclas binarias de dicromato de potasio con cloruro de cadmio y sulfato de cobre ($CdCl_2/K_2Cr_2O_7$ y $K_2Cr_2O_7/CuSO_4$) sobre *Scenedesmus intermedius*, en cambio la mezcla binaria de cloruro de cadmio con sulfato de cobre ($CdCl_2/CuSO_4$) sobre la microalga, mostro una respuesta antagónica-aditiva-sinérgica con un $IC < 1$ y eventualmente un $IC > 1$.

Al comparar los resultados obtenidos de las mezclas de sales metálicas en este trabajo con otros autores, se encontró un déficit de información referente a las mezclas utilizadas en este estudio. Sin embargo, en un estudio realizado por Mo et al., (2016), donde evaluaron el efecto tóxico de la mezcla binaria de $CdCl_2/K_2Cr_2O_7$ durante 96 horas sobre *Chlorella pyrenoidosa* y *Selenastrum capricornutum*, donde en el primer caso, la microalga presentó un efecto sinérgico a altas concentraciones mientras que a bajas el efecto fue antagónico. Mientras que

la segunda microalga, presentó un efecto sinérgico de diferentes magnitudes. Por otro lado, los mismos autores, realizaron un estudio de la mezcla binaria de $\text{CdCl}_2/\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ donde obtuvieron un efecto sinérgico a bajas concentraciones y posteriormente, a altas concentraciones se inhibió el efecto tóxico en las microalgas (*S. capricornutum* y *Chlorella pyrenoidosa*). En este caso, los resultados indican diferencias con los establecidos en este estudio, estas diferencias pueden deberse principalmente al tiempo de exposición y a la diferencia entre los bioindicadores utilizados.

Otro estudio realizado por Franklin et al., (2002), donde obtuvieron un efecto considerado menos que aditivo (antagónico) con respecto a la mezcla de $\text{CuSO}_4/\text{ZnSO}_4$ en el crecimiento de *Chlorella* sp. En contraste con el efecto producido por la mezcla de $\text{CuSO}_4/\text{CdSO}_4$ que resultó en una respuesta aditiva sobre el mismo bioindicador, en estudios de 72 horas. Carballo et al., (2012), sugiere que si las combinaciones de mezclas son sinérgicas o antagónicas depende de si un metal facilita la captación del otro o si compiten por los mismos sitios de transporte en la membrana celular. En otra instancia, Bao et al. (2008), informaron que las mezclas de compuestos metálicos con agentes oxidantes podrían ser altamente reactivas, y el efecto aditivo está relacionado con una mejora en la producción de especies de la capacidad antioxidante celular.

Por otro lado, existe una variedad de estudios encontrados en la literatura de mezcla de compuestos donde utilizan bioindicadores diferentes a las microalgas. Un ejemplo de ello, es el estudio realizado por Gaete & Chávez, (2008), con *Daphnia obtusa*, donde determinan el tipo de interacción que se da entre $\text{ZnCl}_2/\text{CuSO}_4$ donde se obtuvo una respuesta sinérgica por parte del cobre en concentraciones altas. Mientras que cuando el zinc se encuentra en alto porcentaje en la mezcla, provoca un efecto antagónico. Esto es similar a lo observado Utgikar et al. (2004), que describen una interacción sinérgica entre el cinc y el cobre sobre la bacteria *Vibrio fischer*, que es atribuible al cobre. La interacción antagónica podría estar relacionada con la electronegatividad de los metales en mezcla como también la

similitud de la interacción de los iones metálicos con los sitios activos en los organismos (Fargasova, 2001).

Otro estudio realizado por Cortés et al., (2018), donde utilizan como bioindicador a *Artemia franciscana*, obtienen como resultado de la mezcla binaria de $\text{CuSO}_4/\text{KMnO}_7$ un efecto aditivo, sin embargo, el resultado obtenido de la mezcla de $\text{NaClO}/\text{CuSO}_4$ muestra una tendencia en el aumento de la toxicidad produciendo sinergismo en concentraciones más altas. Esta diferencia podría ser atribuible a la diferencia de sensibilidad y características fisiológicas entre los organismos y la duración de los estudios.

Se debe destacar que los metales tóxicos afectan comunidades planctónicas, provocando alteraciones en la fotosíntesis, crecimiento, inhibición de la actividad enzimática y la respiración celular (Yan & Pan, 2002). Por lo tanto, se destaca la importancia de considerar que la acción conjunta de agentes químicos se debe tomar en cuenta en el desarrollo de criterios de calidad de agua ecotoxicológicamente relevantes, ya que los estudios actuales generalmente los consideran en forma individual (Logan & Wilson, 1995).

En la **Tabla 17**, se puede observar de manera más simplificada la recopilación de los efectos ante la exposición a las mezclas de las sales metálicas en diferentes organismos acuáticos obtenidos de diferentes estudios.

Tabla 17. Efectos de las mezclas de compuestos expuestos a diferentes bioindicadores

Mezcla	Bioindicador	Respuesta	Tiempo de estudio	Autor
$\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Antagónico-Sinérgico	96h	Mo et al., (2016)
$\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	<i>Selenastrum capricornutum</i> ,	Sinergico	96h	Mo et al., (2016)
$\text{CdCl}_2/\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Sinérgico - Antagónico	96h	Mo et al., (2016)

CdCl ₂ /Ni(NO ₃) ₂	<i>Selenastrum capricornutum</i> ,	Sinérgico - Antagónico	96h	Mo et al., (2016)
CuSO ₄ /ZnSO ₄	<i>Chlorella</i> sp.	Antagónico	72h	Franklin et al., (2002)
CuSO ₄ /CdSO ₄	<i>Chlorella</i> sp.	Aditivo	72h	Franklin et al., (2002)
ZnCl ₂ /CuSO ₄	<i>Daphnia obtusa</i>	Sinérgico*		Gaete & Chávez, (2008)
Cu/Zn	<i>Vibrio fischer</i> ,	Sinérgico*		Utgikar et al. (2004)
CuSO ₄ /KMnO ₇	<i>Artemia franciscana</i>	Aditivo		Cortés et al., (2018)
NaClO/CuSO ₄	<i>Artemia franciscana</i>	Sinergico		Cortés et al., (2018)

*Efecto sinérgico por parte del cobre a altas concentraciones en la mezcla.

En este estudio, se obtuvo el volumen celular para la microalga *Scenedesmus intermedius* a concentraciones en las cuales no se observó efecto tóxico (6d-NOEC), el cual indicó que en general, que no existen cambios significativos con respecto a control, ante la exposición de forma individual de sulfato de cobre, dicromato de potasio y cloruro de cadmio. Sin embargo, la NOEC_(6d) para la mezcla de las sales metálicas, si presento una diferencia significativa con respecto a control. Por otro lado, La exposición de sulfato de cobre de manera individual a altas concentraciones (CI₅₀), no tuvo un aumento en el volumen de las células, pero, la exposición de la microalga al dicromato de potasio y cloruro de cadmio de manera individual y las mezclas de los tres compuestos, a altas concentraciones, indicó un aumento significativo con respecto a control.

Los estudios de volumen celular para microalgas, en la actualidad son escasos en el caso de los estudios con metales. Sin embargo, en un estudio

realizado por Romero et al., (2002) donde utilizaron las microalgas *Chaetoceros* sp. y *Tetraselmis* sp. como bioindicadores para determinar las variaciones en la morfología celular, las cuales mostraron un aumento del volumen significativo al exponerlas a altas concentraciones de cadmio durante 6 días con respecto a control. El cual coincide con el estudio realizado por Bolaños et al. (1992), quienes mostraron un notable deterioro y aumento de tamaño de células de la cianobacteria *Anabaena* sp. después de 96h de exposición a 1.5mg/L de cadmio. De igual manera, Stokes et al. (1973) observaron cambios morfológicos significativos de aumento de tamaño en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Estas similitudes en cuanto a los efectos del cadmio, probablemente se deban a la acción de este metal para actuar a nivel de la membrana citoplasmática, uniéndose a ésta por el carácter de atracción polar produciendo un desacoplamiento en la permeabilidad, provocando un aumento en el volumen celular (Rivera 1995).

10.CONCLUSIONES

La evaluación sobre la toxicidad de CuSO_4 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y CdCl_2 de manera individual sobre *Scenedesmus intermedius*, demuestra que son tóxicos para organismos productores de la cadena trófica, y por ende su uso y vertido indiscriminado al medio ambiente representa un riesgo potencial para el ecosistema.

La respuesta de las mezclas binarias de $\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{CuSO}_4$ indica que sus efectos se inhiben en combinación, siendo menos toxica que la respuesta individual de sus componentes; sin embargo, la mezcla binaria de $\text{CdCl}_2/\text{CuSO}_4$ indica que conforme las concentraciones de los dos xenobióticos va en aumento, sus efectos tóxicos son mayores en combinación que a los que se observaron individualmente sobre la microalga.

La medición del volumen celular sobre la microalga arrojó datos complementarios para comprender más a fondo el efecto tóxico aún en bajas concentraciones de las sales metálicas, confirmando el efecto tóxico que estos presentaron. Sin embargo, la información que existe en la actualidad sigue siendo insuficiente, advirtiendo la necesidad de un mayor número de pruebas respecto a los efectos a largo plazo de estos xenobióticos y precisar el tipo de interacción con otro tipo de contaminantes en mezcla para obtener resultados más representativos de la potencialidad tóxica de los contaminantes.

11. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos, se recomienda el estudio de las sales metálicas utilizadas en este estudio en conjunto con otros contaminantes, ya que se requiere de la consideración de las mezclas de los agentes químicos y su impacto en los ecosistemas, para poder establecer o actualizar normas que ayuden a disminuir el impacto de los metales como contaminantes.

12. BIBLIOGRAFÍA

- AA. Cortés, S. Sánchez-Fortún, Ma.C. Bartolomé. (2017). Mecanismos de resistencia a metales tóxicos (Cd) bajo variaciones abióticas en microalgas, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. [https://doi: 10.1016/j.recqb.2017.08.005](https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.005)
- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentaste, E., Sarzanini, C. and Barberis, R. 2002. Distribution and Mobility of Metals in Contaminated Sites. Chemometric Investigation of Pollutant Profiles. *Environmental Pollution*, 119: 177.
- Adonaylo, V. N. & Oteiza, P. I. 1999. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology* 135: 77–85.
- Agah, H., Leermakers, M., Elskens, M., Fatemi, S. M. R., & Baeyens, W. (2009). Accumulation of trace metals in the muscle and liver tissues of five fish species from the Persian Gulf. *Environmental Monitoring and Assessment*, 157(1-4), 499-514. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0551-8>
- Alaee M (2003) *Environ. Monit. Assess.* 88, 327.
- Albert, L. A. (2013). *Toxicología ambiental (Segunda, Vol. 121)*. México, D.F.: LIMUSA.
- Alfaro, M. (1999). *Contaminación del aire: emisiones vehiculares, situación actual y alternativas (Primera ed.)*. San José, C. R.: EUNED.
- Alloway, B., & Ayres, D. (1997). *Chemical principles of environmental pollution (Second ed.)*. New York: CRC Press

- Altenburger, R., Boedeker, W., Faust, M., & Grimme, L. H. (1996). Regulations for combined effects of pollutants: Consequences from risk assessment in aquatic toxicology. 34. <https://doi.org/1155-1157>
- ATSDR. (2002). Copper. Agency for toxic substances and disease registry.
- ATSDR. (2002). Toxicological profile for Cadmium. Anales de la Facultad de Medicina, 63(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=37963107>
- ATSDR. (2012). Toxicological Profile for Chromium. 592.
- Avudainayagam S, Megharaj M, Owens G, Kookana RS, Chittleborough D, Naidu R (2003) Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 178:53-91.
- Bao, V.W., K.M. Leung, K.W. Kwok, A.Q. Zhang & G.C. Lui. 2008. Synergistic toxic effects of zinc pyriithione and copper to three marine species: implications on setting appropriate water quality criteria. Mar. Pollut. Bull., 57(6-12): 616-623.
- Barata c., d. J. Baird, a. J. Nogueira, a. M. Soares & m. C. Riva. 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides of *Daphnia magna* Straus. Implications for mult-substance risks assessment. Aquatic Toxicology, 78: 1-14.
- Barata, C., Hontoria, F., & Amat, F. (1996). Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: Temperature and strain effects. Aquaculture, 142(3-4), 171-189. doi:10.1016/0044-8486(95)01250-8
- Barceló, L. D., & López, M. J. (2012). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. 27.

- Baudouin, M. F., & Scoppa, P. (1974). Acute toxicity of various metals to freshwater zooplankton. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(6), 745-751. doi:10.1007/BF01685925
- Bellinger, E. G., & Sigee, D. C. (2015). *Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators (Second edition)*. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc.
- Bolaños L, García GM, Mateo P, Bonilla I (1992) Differential toxicological response to cadmium in *Anabaena* strain PCC 7119 grown with NO_3 and NH_4 as nitrogen source. *J. Plant. Physiol.* 140: 345-349
- Bridges CC, Zalups RK (2005) Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol Appl Pharm* **204**: 274–308.
- Carballo, M. E., Martínez, A., Salgado, I., Maldener, I., Álvarez, M., Boza, A., ... Pérez, M. (2012). Capacidad de captura de cadmio y cinc por bacterias, microalgas y levaduras. 1, 10.
- Cavas, T., Garanko, N. N., & Arkhipchuk, V. V. (2005). Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*, 43(4), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014>
- Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres Guzmán J.C., Moreno-Sánchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 333-347.
- Chang, C., Sibley, T.H., 1993. Accumulation and transfer of copper by *Oocystis pusilla*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 689–695.

- Chmielowska-Bąk, J., Izbiańska, K., & Deckert, J. (2013). The toxic Doppelganger: on the ionic and molecular mimicry of cadmium. 60, 6.
- Chou, T.-C. (2006). Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621-681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2014). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 325. <https://doi.org/10.15517/rbt.v53i3-4.14408>
- Cortés, A. A., Sánchez-Fortún, S., García, M., Martínez, H., & Bartolomé, Ma. C. (2018). Toxicological assessment of binary mixtures and individually of chemical compounds used in reverse osmosis desalination on *Artemia franciscana* nauplii. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(4), 660-672. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue4-fulltext-4>
- Dat, J. F., Foyer, C. H. & Scott, I. 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 118:1455–61.
- DOF. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- Fargasova, A. 2001. Winter Third- to FourthInstar Larvae of *Chironomus plumosus* as Bioassay Tools for Assessment of Acute Toxicity of Metals and Their Binary Combinations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48: 1-5

- Faust, A., R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi & L. Grimme. 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63: 43-63.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Grimme, L. (2003). Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquatic Toxicology*, 63(1), 43-63. doi:10.1016/S0166-445X(02)00133-9
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por metales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272003000200008>
- Franklin, N. M., Stauber, J. L., Lim, R. P., & Petocz, P. (2002). Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): The effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11), 2412-2422. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211121>
- Gaete, H., & Chávez, C. (2008). Toxicidad de mezclas de cobre, cinc y arsénico en *Daphnia obtusa*. 9.
- Gaete, H., & Paredes, K. (1996). Toxicidad de mezclas de contaminantes químicos sobre el Cladóceros *Daphnia magna*. 1, 23-28.
- Gaetke, L., & Chow, C. K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2), 147-163. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00159-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00159-8)
- Galindo, Ma. D. (2016). Catástrofes ecológicas lentas: la contaminación por metales tóxicos. Presentado en Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad

- de Cádiz. Recuperado de http://www.juntadeandalucia.es/averroes/centros-tic/11008525/helvia/sitio/upload/catastrofes_lentas_por_metales.pdf
- Gallego, A., Martín-González, A., Ortega, R., & Gutiérrez, J. C. (2007). Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere*, 68(4), 647-661. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.031>
- Gramatica P., Vighi, F., Consolaro, R. Todeschini, A. Finizio & M. Faust. 2001. QSAR approach for the selection of congeneric compounds with a similar toxicological mode of action. *Chemosphere*, 42: 873-883.
- Guiry, M. (2019). AlgaeBase. Recuperado 4 de febrero de 2019, de <http://www.algaebase.org>
- Gunnar, N., & Friberg, L. (1978). Factors Influencing Metabolism and Toxicity of Metals: A Consensus Report. *Environmental Health Perspectives*, 25, 3. <https://doi.org/10.2307/3428706>
- Gutiérrez F. y C. Cervantes; Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico; CONCYTEG; Año 3, Núm. 37; 21-36.
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G. T., & Shaw, T. J. (2001). Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*, 51(3), 247-264. doi:10.1016/S0141-1136(00)00102-1

- Hellawell, j. M. 1992. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Pollution Monitoring Series. Ed. Elsevier Applied Science. USA. 546 pp.
- Hernández, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía, 49(2), 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollingher, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. Journal of Phycology, 35(2), 403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hondal, O. C., Carballo, G. A., Concepción, J., & Molleda, M. I. (2003). Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos. 37.
- Huovinen, P., & Gómez, I. (2017). Hacia el desarrollo de microbioensayos. 3.
- Jaramillo J., F., Rincón S., A., & Rico M., R. (2008). Toxicología Ambiental. México.
- Ke, C., & Wang, W.-X. (2002). Trace metal ingestion and assimilation by the green mussel *Perna viridis* in a phytoplankton and sediment mixture. Marine Biology, 140(2), 327-335. doi:10.1007/s002270100696
- Khangarot, b. & r. Rathore. 2003. Effects of Copper on Respiration, Reproduction, and Some Biochemical Parameters of Water Flea *Daphnia magna* Straus. Bull. Environ. Contam. Toxicol.,70: 112-117.
- Kokkali, V. (2011). Electrochemical peroxidation of contaminated water and assessment of the toxicity using existing and novel bioassays. 290.
- Levy, J. L., Stauber, J. L., & Jolley, D. F. (2007). Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. Science

- of The Total Environment, 387(1-3), 141-154.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.016>
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. Pollut. Bull. 42:656–66.
- Logan, D., & Wilson, H. (1995). An ecological risk assessment method for species exposed to contaminant mixtures. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(2), 351-359. doi:10.1002/etc.5620140222
- Marchese M, Gagneten AM, Parma MJ, and P. J. Pavé PJ (2008) Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 55:603-609.
- Miazeck, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., & Goffin, D. (2015). Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. International Journal of Molecular Sciences, 16(10), 23929-23969. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
- Mo, L., Zheng, M., Qin, M., Zhang, X., Liu, J., Qin, L., Liang, Y. (2016). Quantitative Characterization of the Toxicities of Cd-Ni and Cd-Cr Binary Mixtures Using Combination Index Method. BioMed Research International, 2016, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2016/4158451>
- Monteiro, C. M., Fonseca, S. C., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2011). Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. Journal of Applied Phycology, 23(1), 97-103. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9542-6>

- Montvydiene, D., & Marciulionienė, D. (2004). Assessment of toxic interactions of heavy metals in a multicomponent mixture using *Lepidium sativum* and *Spirodela polyrrhiza*. *Environmental Toxicology*, 19(4), 351-358. <https://doi.org/10.1002/tox.20041>
- Mordenti A., Piva G. (1997). Chromium in animal nutrition and possible effects on human health. In: Canali S., Tittarelli F., Sequi P., eds, *Chromium Environmental Issues*. Franco Angeli s.r.l. Milan, pp. 131-151.
- Newton, M. K. (2015). Toxicity of binary metal mixtures to freshwater aquatic organisms. No. 3722428.
- Okamoto, O. K. & Colepicolo, P. 1998. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119:67–73.
- Olguín, h.f., salibián, a. And puig, A. Comparative sensitivity of *Scenedesmus acutus* and *Chlorella pyrenoidosa* as sentinel organisms for aquatic ecotoxicity assessment: studies on a highly polluted urban river. *Environmental Toxicology*, 2000, 15, 14-22.
- Páez-Osuna, F., & Frías-Espéricueta, M. G. (2001). Bioacumulación, distribución y efectos de los metales pesados en los peneidos. En F. Páez-Osuna, *Camaronicultura y Medio Ambiente* (págs. 245-269). México, D.F.: UNAM, El Colegio de Sinaloa.
- Pane, e. F. C., j. C. Smith, c. Mcgeer & c. Wood. 2003. Mechanisms of Acute and Chronic Waterborne Nickel Toxicity in the Freshwater Cladoceran, *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Technol.*, 37: 4382-4389

- Parrot, J. L. & J. B. Sprague. 1993. Patterns in toxicity of sublethal mixtures of metal and organic chemicals determined by microtox and by DNA, RNA and protein content of fathead minnows *Pimephales promelas*. *Can. J Fish. Aquat. Sci.*, 50(10): 2245-2253.
- Pedrajas, R. J., Peinado, J. & Lopez-Barea, J. 1993. Purification of Cu-Zn-superoxide dismutase isoenzymes from fish liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution. *Free Radic. Res. Commun.* 19:29–41.
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., & Colepicolo, P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae¹. *Journal of Phycology*, 39(6), 1008-1018. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- Prieto, J., González, C. A., Román, A. D., & Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=93911243003>
- Quevedo, C., Morales, S., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus sp.* en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalga. 15, 25-31.
- Quinlan, G. J., Halliwell, B., Moorhouse, C. P. & Gutteridge, J. M. C. 1988. Action of lead (II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions. *Biochim. Biophys. Acta* 962: 196–200.

- Ramírez, A. (2013). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63(1), 51. <https://doi.org/10.15381/anales.v63i1.1477>
- Ramírez, P., & Mendoza, A. (2008). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de las sustancias Químicas y suelo (Primera)*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- Rand, G. M., & Petrocelli, S. R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology. Methods and applications*. New York.
- Ren, s., r. Mee & p. Frymier. 2004. Using factorialexperiments to study the toxicity of metal mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 38-43.
- Riva, M. C. (1991). *Nociones y planteamientos toxicológicos en la preservación del medio ambiente acuático*. 22.
- Rivera D (1995) Efecto del cobre y cadmio en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* y *Dunaliella salina*. *Estud. Oceanol.* 14: 61-74.
- Robinson, N. J., Urwin, P. E., Robinson, P. J. & Jackson, P. J. 1994. Gene expression in relation to metal toxicity and tolerance. I Basra, A. J. [Ed.] *Stress Induced Gene Expression in Plants*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 209–48.
- Roldán, G. (1999). Los macroinvertebrados y su valor como indicadores de calidad del agua. 23.
- Romero, P., & Cantú, A. (2004). *Métodos de evaluación de calidad de aguas (2a.)*. Recuperado de Castillo, G. (ed.). 2004. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. IDRC/IMTA, México. 202 pp. Disponible en: http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.

- Romero, Y., Lodeiros, C., Esclapés, M., & Marín, N. (2002). Efecto tóxico del cadmio sobre microalgas aisladas del nororiente de Venezuela. 27, 104-109.
- San Juan, E. M. (2010). Movilidad de Pb y Ni en suelos contaminados del valle del Mezquital Hidalgo. Tesis (Ingeniero Agrónomo especialista en suelos), Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Sánchez-Fortún, S., López-Rodas, V., Navarro, M., Marvá, F., D'ors, A., Rouco, M., ... Costas, E. (2009). Toxicity and adaptation of dictyosphaerium chlorelloides to extreme chromium contamination. Environmental Toxicology and Chemistry, 28(9), 1901. <https://doi.org/10.1897/08-489.1>
- Scandalios JG (2002) The rise of ROS. Trends Biochem Sci **27**: 483–486. Schirran SL, Barran PE (2009) The use of ESI-MS to probe the binding of divalent cations to calmodulin. J Am Soc Mass Spectr **20**: 1159–1171.
- SEMARNAT. (1999). Biodiversidad. México.
- Sharma, S., Schat, H., Vooijs, R., & Van Heerwaarden, L. (1999). Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: Concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. Environmental Toxicology and Chemistry, 18(2), 348-355. doi:10.1002/etc.5620180235
- Sigee, D.C. (2004). Freshwater Microbiology: Diversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment. Chichester, UK, John Wiley & Sons, p. 524
- Spiro, T. G., & Stigliani, W. M. (2004). Química Medioambiental (2a.). Madrid: Pearson Educación S.A.

- Stauber JL, Davies CM. Use and limitations of microbial bioassays for assessing copper bioavailability in the aquatic environment. *Environ Rev* 2000;8:255–301.
- Stokes PM, Hutchinson TC, Krauter K (1973) Heavy-metal tolerance in algae isolated from contaminated lakes near Sudbury, Ontario. *Can. J. Bot.* 51: 2155-2168.
- Strejckova, A., Dvorak, M., Hynstova, V., Ridoskova, A., Klejdus, B., & Huska, D. (2016). Effect of copper on secondary metabolism of microalgae *scenedesmus quadricauda*. 6.
- Sun, J. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1331-1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
- Sun, J., & Liu, D. (2003). Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 25(11), 1331-1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. 2012. Heavy metal toxicity and the environment. *EXS*, 101(133–64).
- Thomas, D. J., Thomas, J. B., Prier, S. D., Nasso, N. E. & Herbert, S. K. 1999. Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Plant Physiol.* 120:275–82.
- Torres B., O., Zavala-Aguirre, J. L., Gómez-Rubio, P., Buelna-Osben, H. R., & Zúñiga-González, G. (2007). Potential fish species as genotoxicity biomarkers at lake “La Alberca”, Michoacan, Mexico. 8.

- Tuchman, N. (1996). The role of heterotrophy in algae. In Stevenson, R.J. (ed.). *Algal Ecology*. New York, Academic Press, pp. 299–318.
- Tukaj, Z., Baścik-Remisiewicz, A., Skowroński, T., & Tukaj, C. (2007). Cadmium effect on the growth, photosynthesis, ultrastructure and phytochelatin content of green microalga *Scenedesmus armatus*: A study at low and elevated CO₂ concentration. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.12.002>
- Turk, A., Turk, J., & Wittes, J. T. (2004). *Ecology, Pollution, Environment (Primera)*. México: Interamericana.
- US EPA. (2009). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Coppers.
- US EPA. (2019). Aquatic Life Criteria - Copper [Official]. Recuperado de United States Environmental Protection Agency website: <https://www.epa.gov/wqc/aquatic-life-criteria-copper>
- Utgikar, v., n. Chaudhary, a. Koeniger, h. Tabak, j. Haines & r. Govind. 2004. Toxicity of metals and metal mixtures: analysis of concentration and time dependence for zinc and copper. *Water Research*, 38: 3651-3658.
- Vázquez, G., Castro, G., González, I., Pérez, R., & Castro, T. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. 7.
- Velasco, Y. M., Gómez, W., & Calderón, J. M. (2006). Acute copper sulphate (CuSO₄) toxicity in cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) fingerlings under soft water conditions. 10(1), 64-70.
- Vera, G., Tam, J., Pinto, E., & Angulo, J. (2001). Efecto del cadmio sobre el crecimiento poblacional de la diatomea marina *Chaetoceros gracilis* Schutt.

- Viti, C., & Giovannetti, L. (2001). The impact of chromium contamination on soil heterotrophic and photosynthetic microorganisms. *Ann. Microbiol.*, 13.
- Wang, S. & Shi, X. 2001. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell Biochem.* 222:3–9
- Warne, M., & Hawker, D. W. (1995). The Number of Components in a Mixture Determines Whether Synergistic and Antagonistic or Additive Toxicity Predominate: The Funnel Hypothesis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31(1), 23-28. doi:10.1006/eesa.1995.1039
- Yan, H., & Pan, G. (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, 49(5), 471-476. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00285-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00285-0)
- Yruela, I. 2009. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5): 409–430.