

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“EFECTO TÓXICO INDIVIDUAL Y EN MEZCLA ANTE LOS
CONTAMINANTES ANTROPOGÉNICOS CLORURO DE
CADMIO Y DICROMATO POTÁSIO”**

“TESIS”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

AUTOR:

p.Q.F.B. PAOLA VANESSA ARGÜELLO TRENADO

ASESORA:

D.C. MARÍA CARMEN BARTOLOMÉ CAMACHO

MAYO 2019 MORELIA, MICHOACAN.



DEDICATORIA

A mis padres

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, su amor, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por haber creído en mí en cada momento.

A mis maestros

D.C. María Carmen Bartolomé Camacho por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella y brindarme su confianza para sacar este proyecto adelante; M.C Alondra Cortes Téllez por su tiempo compartido, apoyo incondicional e impulsar el desarrollo de este maravilloso proyectó.

A mis amigos

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo tan inseparables como el día que inicio nuestras amistades (Irazú, Jania, Jesús, Lupita, Gerardo, Rebeca, Diana, Yara, Daniel y Cinthya)

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mis más profundos y sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización de este presente trabajo y formación profesional, en especial a la D.C. María Carmen Bartolomé Camacho y a la M.C. Alondra Cortes Téllez, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibiendo a lo largo de estos años.

También quiero dar las gracias a mis padres y amigos por siempre haberme brindado su apoyo, comprensión, paciencia y ánimo.

A todos ellos, muchas gracias

ÍNDICE

ABREVIATURAS:.....	I
GLOSARIO:	II
RESUMEN.....	1
ABSTRACT:.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.0.1 TIPOS DE CONTAMINACIÓN.....	6
2.0.2 CONTAMINACION AMBIENTAL SEGUN EL CONTAMINANTE.....	7
2.0.3 LA CONTAMINACIÓN ACUATICA.....	8
2.0.4 PRINCIPALES CONSECUENCIAS DE LA CONTAMINACIÓN ACUÁTICA	10
2.2 METALES CADMIO Y CROMO, Y SUS COMPUESTOS. TOXICODINAMIA.....	15
2.2.1 CADMIO	15
2.2.2 CLORURO DE CADMIO	17
2.2.3 CROMO	21
2.2.4 DICROMATO DE POTASIO	22
2.3 BIOENSAYOS, TIPOS Y APLICACIÓN	28
2.3.1 TIPOS DE BIOENSAYOS	29
2.3.2 SELECCIÓN DE LOS ORGANISMOS PARA EL BIOENSAYO	32
2.3.3 TIPOS DE BIOENSAYOS	36
2.3.4 USO DE MICROALGAS EN BIOENSAYOS	38
2.4 BIOINDICADORES.....	40
2.4.1 BIOINDICADORES PLANCTÓNICOS	41
2.4.2 MICROALGA <i>SCENEDESMUS INTERMEDIUS</i> BIOLOGÍA ECOLOGIA MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDAS	42
3. HIPOTESIS.....	48

4. JUSTIFICACIÓN.....	49
5. OBJETIVOS	50
5.1 OBJETIVO GENERAL	50
5.2 OBJETIVO ESPECIFICOS	50
6. MATERIAL Y METADOS	51
6.1 COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS	51
6.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	51
6.1.2 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE TASA DE CRECIMIENTO	52
6.1.3 ANÁLISIS DE DATOS	53
6.2 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL CLORURO DE CADMIO Y DICROMATO DE POTASIO SOBRE LA MICROALGA DE <i>SCENEDESMUS INTERMEDIUS</i>	53
6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
6.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO, ADITIVO O ANTAGÓNICO DEL CLORURO DE CADMIO Y DICROMATO DE POTASIO SOBRE LA MICROALGA DE <i>SCENEDESMUS INTERMEDIUS</i>	55
7. RESULTADOS	56
7.1 RESPUESTA INDIVIDUAL DEL CLORURO DE CADMIO Y EL DICROMATO DE POTASIO	56
7.1 RESPUESTA EN MEZCLA DEL CLORURO DE CADMIO Y EL DICROMATO DE POTASIO	58
8. DISCUSIÓN.....	62
8.1 RESPUESTA INDIVIDUAL.....	62
8.2 RESPUESTA EN MEZCLA	66
9. CONCLUSIÓN.....	69
10. RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCES	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Rutas de contaminantes metálicos al medio ambiente (Goldberg, 1976).....	12
Fig. 2 Curva dosis- respuesta para metales esenciales y no esenciales (Potter G. 2013).	14
Fig. 3 El cadmio se encuentra en la naturaleza, en la corteza terrestre, y se ha usado para la fabricación de baterías y otros productos. (Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU)	15
Fig. 4 Modelo de barras y esferas del cloruro de cadmio (Anatolievich,2014).....	17
Fig. 5 Cristales de cromo de alta pureza (Dayan A.D. 2001).	21
Fig. 6. Formula estructural del Dicromato de potasio (National Institute for Occupational Safety and Health 2014)	¡Error! Marcador no definido.
Fig. 7 Lopezita forma mineral del dicromato de potasio (National Institute for Occupational Safety and Health 2014.....	¡Error! Marcador no definido.
Fig. 8 origen e interconversión de diferentes formas de Cr en el agua. Ruta 1 es la fuente global más importante de Cr (VI) mientras que la ruta 2 se describe el proceso natural más importantes de la formación de Cr (VI) (Anatoly Zhitkovich 2011).	23
Fig. 9 Especies acuosas de Cr (III) y Cr (VI). (A) Hidrólisis y polimerización de hexaacuachromium (III). Los valores de pH de transición son aproximados. (B) Estructuras de sulfato, cromato y dicromato (Anatoly Zhitkovich 2011)	25
Fig. 10 Riesgos genotóxicos de Cr (VI) ingerido (Anatoly Zhitkovich, 2011)	26
Fig. 11 Comparación de la capacidad de generación de biomasa microalgal. Estas pueden duplicarse mucho más de 2 o 3 veces más rápidamente que las plantas superiores. (Fernández, 2014)	39
Fig. 12 Fotografía microscópica (2000X) de la microalga Scenedesmus sp. fuente CCAP 217/8	43
Fig. 13 Proceso de fotosíntesis (producción de hidrogeno)(Wünschiers R. 2002) ..	44
Fig. 14 Fotografía microscópica(1000X) Scenedesmus Intermedius colonia de 4 células. Fotografía por Stream Algae of California	45
Fig. 15 Formación de autocolonias en Scenedesmus. Los números romanos indican las secuencias de las divisiones (Trainnor, 1998).	46
Fig. 16 ciclo reproductivo sexual de Scenedesmus. Z representa la formación de la zigoespora y L la liberación de células haploides (Trainnor, 1998).	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de los agentes contaminantes del agua	9
Tabla 2. Metales esenciales y tóxicos	13
Tabla 3. Metales esenciales para organismos (Potter G. 2013).....	13
Tabla 4. Propiedades Fisicoquímicas del cloruro de cadmio.....	17
Tabla 5 Propiedades Fisicoquímicas del Dicromato de cadmio.....	22
Tabla. 6. Adaptabilidad de los organismos como especies para bioensayos (Henry, 1988).	33
Tabla. 7. Criterios para la selección de pruebas biológicas en laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Ramírez & Mendoza, 2008)	34
Tabla 8. Índices de toxicidad (CI₅₀ y 96 h-NOEC) de ambos compuestos metálicos expuestos en forma individual sobre <i>S. Intermedius</i>.....	57
Tabla 9. Índice de combinación e índice de reducción de dosis (DRI) en mezcla de ambos metales experimental.	59
Tabla 10. Índice de combinación e índice de reducción de dosis (DRI) en mezcla de ambos metales No experimental.	59
Tabla 11. Parámetros en el índice de combinación de CdCl₂/ K₂Cr₂O₇	61
Tabla 12 IC₅₀ con Cadmio en diferentes especies	64
Tabla 13 IC₅₀ a 96 hrs en Cobre sobre diferentes especies acuáticas	65

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama. 1 Mantenimiento de cultivo de <i>Scenedesmus Intermedius</i>.	52
Diagrama. 2 Metodología para la determinación de las concentraciones inhibitorias de crecimiento del cloruro de cadmio y dicromato de potasio.	54

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica. 1 Porcentaje del grado de contaminación por metales pesados debido actividades antropogénicas.....	11
Grafica. 2	57
Grafica. 3	58
Gráfica. 4 Índice de combinación no experimental CdCl_2 /$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre S. intermedius	60
Gráfica. 5 Índice de combinación experimental CdCl_2 /$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre S. intermedius	60
Grafica. 6 Efecto medio de la combinación del CdCl_2 / $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre S. intermedius	60

ABREVIATURAS:

ASTM: Asociación Americana de Ensayo de Materiales

CAT: Catalasa.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

FA: Fracción afectada

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

GPx: Glutación peroxidasa

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC: Índice de combinación

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50%

IDR: índice de reducción dosis

IOMC: Programa Interorganizacional para el Manejo Adecuado de las Sustancias Químicas

LPO: Lipoperoxidación.

NOEC: Concentración a la cual no se observa efecto

NOM: Norma Oficial Mexicana

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio ambiente.

SOD: Superoxidasa dismutasa.

US EPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

UVL: umbral de valor límite.

GLOSARIO:

Abiótico: No relacionado con organismos vivos.

Absorción: 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.

Aguas residuales: Son las aguas de composición variada provenientes de las descargas municipales, industriales, comerciales, agrícolas pecuarias, domésticas y en general de cualquier otra.

Agudo: Exposiciones o efectos a corto plazo. 1. En toxicología experimental, estudios de corta duración, normalmente de 24 h, o de dos semanas o menos, iniciados por la administración de una dosis única. ant.Crónico. 2. En clínica médica, patología súbita y severa con curso rápido.

Antagonismo: La respuesta a una combinación de dos o más productos químicos es menor que la suma de las respuestas individuales esperadas. (a) Funcional: se produce cuando dos productos químicos se contrarrestan entre sí produciendo efectos opuestos sobre la misma función fisiológica. (b) Químico: reacción entre dos compuestos que generan un producto menos tóxico. (c) 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. (d) 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.

Antropogénico: Causado o influido por actividades humanas

Biodegradable: Destrucción *in vivo* o *in vitro* de una sustancia, por acción enzimática. Puede caracterizarse como: 1. Primaria. La alteración de la estructura química de la sustancia que supone la pérdida de una propiedad específica. 2. Aceptable desde el punto de vista ambiental. Se eliminan propiedades indeseables del compuesto. 3. Total. La

sustancia se transforma completamente en moléculas o iones simples (como dióxido de carbono, metano, nitrato, amonio, agua, etc.). En ocasiones los productos de biodegradación pueden ser más nocivos que la sustancia degradada.

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.

Bioindicador: Parámetro que puede utilizarse para identificar un efecto tóxico en un organismo, y puede permitir la extrapolación interespecies. 2. Indicador que señala un acontecimiento o una situación en una muestra o sistema biológico y proporciona una medida de la exposición, el efecto o la susceptibilidad.

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

Biomasa: 1. Cantidad total de material biótico, usualmente expresado por unidad de superficie o de volumen, en un medio, como agua, suelo, etc. 2. Materia producida por crecimiento de microorganismos, plantas o animales

Biota: La totalidad de los organismos vivos

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

Carcinogenicidad: Capacidad para inducir cáncer.

Concentración inhibitoria: Proporción de una sustancia en un medio que origina una inhibición determinada (p. ej. de crecimiento, de movimiento, etc.), en un sistema de ensayo; la CI-50 causa el 50% de la inhibición máxima.

Dragado: Operación que consiste en la limpieza de rocas y sedimentos en los cursos de agua, lagos, bahías o accesos a puertos.

Ecotoxicología: Estudio de los efectos tóxicos de los agentes físicos y químicos sobre las poblaciones y comunidades de los ecosistemas; abarca las formas de transferencia de estos agentes y sus interacciones con el ambiente.

Escorrentía: Corriente de agua que se vierte al rebasar su depósito o cauce naturales o artificiales

Fitoplancton: organismos acuáticos autótrofos del plancton, que tienen capacidad fotosintética y que viven dispersos en el agua.

Genotóxicidad: Capacidad para causar daño al material genético; el daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.

Lixiviación: Extracción sólido-líquido, es un proceso en el que un disolvente líquido pasa a través de un sólido pulverizado para que se produzca la disolución de uno o más de los componentes solubles del sólido.

Máxima concentración admisible (aceptable o permisible) (MAC, en inglés). Concentración que si es inhalada diariamente (en el caso de personas que trabajan 8 horas, cinco días a la semana, o durante 24 horas en caso de la población general), y que según los conocimientos actuales no parecen inducir daño apreciable, ni durante la vida laboral, ni posteriormente, ni en siguientes generaciones. t. rel. **límite permisible de exposición, valor umbral límite (TLV).**

Metalotioneína: Proteína de bajo peso molecular y rica en cisteínas se encuentra presente en todos los tejidos, principalmente en hígado y riñones (donde se acumula más cadmio en el organismo), funciona principalmente atrapando iones de cadmio.

Mutagénesis: Introducción de cambios heredables (mutaciones) del genotipo en una célula como consecuencia de alteración o de pérdida de genes o de cromosomas (o de parte de ellos).

Oligoelemento: Elemento químico que se halla en muy pequeñas cantidades en las células de los seres vivos y es indispensable para el desarrollo normal del metabolismo.

Plancton: Organismos, principalmente microscópicos, que flotan en aguas saladas o dulces, más abundantes hasta los 200 metros de profundidad, aproximadamente.

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

Tetragénicidad: Capacidad potencial para producir malformaciones o defectos en la descendencia. 2. Es una manifestación de toxicidad en la reproducción, caso particular de la embrio/fetotoxicidad, demostrada por la producción o el incremento de la frecuencia de malformaciones estructurales, congénitas, no-hereditarias, en la progenie, visualmente detectables al nacimiento.

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.

Umbral de valor límite: Representa la máxima concentración a la cual un organismo puede ser expuesto continuamente sin sufrir trastornos

Zooplankton: Fracción del plancton constituida por seres que se alimentan, por ingestión de materia orgánica ya elaborada

RESUMEN

El vertido de aguas residuales conlleva frecuentemente a altas concentraciones de metales pesados provenientes del uso antropógeno, entre ellos son habituales el cromo y cadmio, estos llegan a alcanzar a los diferentes ecosistemas acuáticos ocasionando un gran impacto contaminante, lo cual representa un peligro potencial no sólo para la población sino también para el medio ambiente. Teniendo en cuenta que la producción mundial de cadmio y Cromo se ha ido incrementando en los últimos años, se ha considerado realizar un estudio sobre la toxicidad de estos elementos, utilizando cloruro de cadmio y dicromato de potasio en su forma individual y en mezcla empleando bioensayos como herramientas de diagnóstico para determinar el efecto sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Un efecto nocivo evaluado por medio de ensayos biológicos normalizados puede indicar niveles de peligrosidad trasladables y asimilables a organismos que forman parte de los sistemas naturales y la biocenosis; por ello en nuestro estudio hemos utilizado un bioensayo de toxicidad aguda a través de la valoración de la Cl_{50} , usando como bioindicador un representante del fitoplancton, la microalga *Scenedemus intermedius*. Las microalgas al pertenecer al primer eslabón en la cadena trófica como productores son idóneas para los estudios de ecotoxicidad acuática. Los resultados obtenidos de la (Cl_{50}) a 96 horas mostraron que el cloruro de cadmio Cl_{50} de 0.522 mg L^{-1} fue más tóxico que el dicromato de potasio Cl_{50} de 6.64 mg L^{-1} entrando este en la categoría II, mientras que el cloruro de cadmio se encontraría en la categoría I, dentro de la clasificación de sustancias tóxicas o contaminantes en ambientes acuáticos de acuerdo a la EPA. Mientras que los resultados de la mezcla del cloruro de cadmio/dicromato mostraron como resultado una Cl_{50} de 6.44 mg L^{-1} a 96 horas con una respuesta antagónica, aunque a medida que aumentan las concentraciones la respuesta se vuelve sinérgica. Es por este que se llegó a la conclusión que la presencia de altas concentraciones de metales tóxicos como el Cd y el Cr supone un riesgo potencial, afectando así los niveles superiores de la cadena trófica primaria.

Palabras clave: Toxicidad aguda, *Scenedemus intermedius*, Dicromato de potasio, Cloruro de cadmio, Mezcla, Antagónica.

ABSTRACT:

The discharge of wastewater frequently leads to high concentrations of heavy metals from anthropogenic use, including chromium and cadmium, which reach the different aquatic ecosystems, causing a high level of contamination that represents a potential danger not only for population but also for the environment. Taking into consideration that the global production of cadmium and chromium has been increasing in recent years, it has been considered to do toxicity studies of these elements, using cadmium chloride and potassium dichromate in their individual and mixed form, using bioassays as diagnoses tool to determinate their effect into proof organisms under specific and controlled experimental conditions. A harmful effect can indicate levels of dangerousness that can be transferred and assimilated to organisms which are part of natural ecosystems and biocenosis. For this reason, the propose in our study were use an acute toxicity bioassay through the assessment of the CI_{50} , using the microalgae *Scenesdemus intermedius* as a bioindicator to determine the toxicity of these compounds under specific and controlled experimental condition, as Microalgae belonging to the first link in the trophic chain as producers are ideal for aquatic ecotoxicity studies.

The results obtained at 96 hours showed that the cadmium chloride CI_{50} 0.522mg L^{-1} was more toxic than the potassium dichromate was of CI_{50} 6.64mg L^{-1} . According to the EPA classification for toxic substances and pollutants in aquatic environments potassium dichromate reached the category II, while the cadmium chloride was considered to be in category I both of them being toxic for the environment. While the results of the cadmium chloride / dichromate mixture results in an IC_{50} 6.44 mg L^{-1} at 96 hours with an antagonistic response, although as the functions increase, the response becomes synergistic. This is how it was concluded that the presence of the functions of toxic media such as Cd and Cr the potential risk, affecting the upper levels of the primary trophic chain.

Keywords: Acute toxicity, *Scenesdemus intermedius*, Potassium dichromate, Cadmium chloride, Mixture, Antagonist.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de cuerpos de agua (ríos, lagos, océanos y agua subterránea) ocurre cuando los contaminantes son descargados directamente o indirectamente en cuerpos de agua sin un adecuado tratamiento que remueva los componentes dañinos. Particularmente peligrosa es la contaminación provocada por las altas concentraciones de algunos metales pesados por sus efectos adversos causados por la persistencia y el fenómeno de biomagnificación (Topollian, 1999). El termino "metales pesados" se aplica a cualquier elemento metálico que tenga una densidad relativamente alta y que sea toxico, aun en bajas concentraciones (Lenntech, 2004). Al contrario de muchos contaminantes orgánicos los metales pesados generalmente, no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales debido a que no son biodegradables (Förstner & Wittman, 1979); aunque hay que enfatizar que existen entre los metales pesados (plomo, cadmio, cromo, mercurio, zinc, cobre, plata, entre otros) constituyen un grupo de gran importancia, ya que algunos de ellos son esenciales para las células (Zn, Fe, Cu), pero dependiendo de la concentración pueden resultar tóxicos (Spain, 2003).

Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse. La bioacumulación se define como un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente (Angelova, Ivanova, Delibaltova, & Ivanov, 2004)). En un pequeño grado se pueden incorporar a organismos vivos (plantas y animales) por vía del alimento y lo pueden hacer a través del agua y el aire como medios de translocación y dependiendo de su movilidad en dichos medios (Lucho, Alvarez , Beltran, Prieto, & Poggi , 2005)

La absorción de metales pesados por los organismos fitoplanctónicos es generalmente el primer paso para la entrada de estos en la cadena trófica. La absorción y posterior acumulación depende de la concentración. Por lo tanto, el estudio de la toxicidad de metales en los ecosistemas acuáticos es de gran interés, ya que estos pueden llegar a producir efectos negativos sobre la biota normal acuática. En la actualidad, el monitoreo ambiental recurre a una terna de técnicas de diagnóstico, complementarias entre sí, que se indican a continuación:

a) monitoreo de efectos biológicos con ensayos de toxicidad.

b) monitoreo biológico de campo.

c) medición de parámetros químicos convencionales en descargas y cuerpos receptores.

Las microalgas pueden ser utilizadas para la detección de contaminantes y evaluación de ecotoxicidad, ofreciendo la utilidad de ser usadas en bioensayos ecotoxicológicos como bioindicadores para dar información debido a que es el primer eslabón de la cadena trófica en el medio acuático y desempeña un papel vital en la estabilidad del ecosistema acuático. Son además esenciales para indicar la calidad del medio ambiente acuático. Como organismos unicelulares que poseen una menor superficie celular y por tanto reducción en gasto energético, algunas se reproducen de forma asexual y otras por gametogénesis dependiendo de las condiciones en que se encuentren; Además de que son capaces de generar biomasa a partir de CO_2 y luz. Se puede afirmar que el deterioro de los ecosistemas se ve reflejado en cambios en la calidad del agua y en las comunidades presentes y que las comunidades algales, como grupos potenciales para evaluar impactos temporales en el medio, son idóneas para los estudios ya que presentan ciclos de vida cortos y están influenciados por variables, que no tienen efecto sobre organismos heterotróficos (Reynolds, 1984).

Por ello en esta investigación se planteó establecer la toxicidad aguda de dos compuestos metálicos el cloruro de cadmio y dicromato de potasio en su forma individual, utilizando la microalga *Scenedesmus intermedius* como bioindicador a través del estudio de la CI_{50} (96h).

2. ANTECEDENTES

El hombre ha dependido de los recursos que la naturaleza le proporciona, desde sus orígenes hace más de tres millones de años, y ha tenido la capacidad de transformar su ambiente a escala muy por encima de cualquier otro organismo del planeta. No fue sino hasta muy recientemente que el hombre comenzó a preocuparse acerca del impacto de sus transformaciones en el ambiente (INECC, 2007), esto fue debido a que, desde muy temprano en la historia, existía la percepción de que la naturaleza no sólo era capaz de absorber cualquier tipo de perturbación, sino que además se constituía en un enemigo a vencer. Transformar a la naturaleza de acuerdo a las necesidades del hombre se consideraba un signo de desarrollo económico y social (Jordan, 1998).

Las actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro de los distintos compartimientos ambientales, incluyendo el agua, el aire, el suelo y el sedimento, así como la biota asociada y por ende de los ecosistemas. Estos efectos dependen de la concentración en la que se encuentran las sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras (Ramírez & Mendoza, 2008).

Los efectos de la contaminación comenzaron a ser principalmente visibles a partir de la Revolución Industrial (1830-1890), cuando la producción en masa, así como el hacinamiento de las personas en las ciudades, provocó condiciones insalubres que produjeron muertes masivas, enfermedades crónicas y degenerativas, además de la devastación de bosques y ríos (Neuzil & Kovarik, 1996). Esta situación se vio magnificada posteriormente por la llamada “Revolución Química”, la cual proporcionó la utilización de miles de sustancias para fabricar productos de consumo diario, sin la realización de estudios científicos para conocer los posibles efectos de la mayoría de estas sustancias en el hombre y el medio ambiente (PBS, 2001).

La investigación formal de los efectos adversos de los contaminantes sobre los organismos se inicia en la década de los años 30, a través del desarrollo de estudios para determinar la relación causa-efecto entre la presencia de contaminantes químicos en el agua y sus efectos biológicos en poblaciones de peces. Estos estudios se enfocaron en su mayoría a

confirmar si un contaminante, del que se tenía sospecha, era el agente causante de un daño que ya había ocurrido y se basaron en pruebas de mortalidad de los organismos (Pruebas de toxicidad aguda) (Ramírez & Mendoza, 2008).

Sin embargo, el esfuerzo de eliminar la contaminación provocada por el hombre del medio ambiente natural, no han podido seguir el ritmo de la creciente cantidad de materiales de desecho y además una población creciente agrava aún más la situación. De esta forma el ser humano se expone constantemente a las sustancias químicas presentes en el ambiente a través del aire y el polvo que respira, del agua de consumo y de la ingesta de alimentos contaminados con agroquímicos u otras sustancias que se han depositado desde la atmósfera o están presentes en el agua de riego. Dependiendo de su magnitud, frecuencia y duración, la exposición a sustancias químicas puede producir efectos negativos muy diversos como trastornos en el sistema respiratorio, sistema nervioso y alteraciones hepáticas. También pueden ocurrir daños en los sistemas cardiovascular, inmunológico y hormonal, así como efectos reproductivos y teratogénicos, mutaciones y cáncer. La exposición a sustancias tóxicas es especialmente preocupante en los niños debido a que se encuentran en pleno desarrollo y son, por lo tanto, particularmente vulnerables (Ize et al. 2010).

En general, se considera como "contaminante" al exceso de materia o energía (calor) que provoque daño a los humanos, animales, plantas y bienes, o bien, que perturbe negativamente las actividades que normalmente se desarrollan cerca o dentro del agua. De esta forma no existe una división precisa entre las aguas contaminadas y las no contaminadas; a pesar de la dificultad para definir la contaminación, es claro que ésta provoca el abatimiento o muerte de la flora y fauna (Jiménez, 2001).

2.0.1 TIPOS DE CONTAMINACIÓN

- ⇒ **Contaminación del agua:** es la incorporación al agua de materias extrañas, como microorganismos, productos químicos, residuos industriales, y de otros tipos o aguas residuales. Estas materias deterioran la calidad del agua y la hacen inútil para los usos pretendidos.

- ⇒ **Contaminación del suelo:** es la incorporación al suelo de materias extrañas, como basura, desechos tóxicos, productos químicos, y desechos industriales. La contaminación del suelo produce un desequilibrio físico, químico y biológico que afecta negativamente las plantas, animales y humanos.
- ⇒ **Contaminación del aire:** es la adición dañina a la atmósfera de gases tóxicos, CO, u otros que afectan el normal desarrollo de plantas, animales y que afectan negativamente la salud de los humanos.

2.0.2 CONTAMINACION AMBIENTAL SEGUN EL CONTAMINANTE

- ◆ **Contaminación química:** refiere a cualquiera de las comentadas en los apartados anteriores, en las que un determinado compuesto químico se introduce en el medio.
- ◆ **Contaminación radiactiva:** es aquella derivada de la dispersión de materiales radiactivos, como el uranio enriquecido, usados en instalaciones médicas o de investigación, reactores nucleares de centrales energéticas, munición blindada con metal aleado con uranio, submarinos, satélites artificiales, etc., y que se produce por un accidente (como el accidente de Chernóbil), por el uso o por la disposición final deliberada de los residuos radiactivos.
- ◆ **Contaminación térmica:** refiere a la emisión de fluidos a elevada temperatura; se puede producir en cursos de agua. El incremento de la temperatura del medio disminuye la solubilidad del oxígeno en el agua.
- ◆ **Contaminación acústica:** es la contaminación debida al ruido provocado por las actividades industriales, sociales y del transporte, que puede provocar malestar, irritabilidad, insomnio, sordera parcial, etc.
- ◆ **Contaminación electromagnética:** es la producida por las radiaciones del espectro electromagnético que afectan a los equipos electrónicos y a los seres vivos.
- ◆ **Contaminación lumínica:** refiere al brillo o resplandor de luz en el cielo nocturno producido por la reflexión y la difusión de la luz artificial en los gases y en las partículas del aire por el uso de luminarias o excesos de iluminación, así como la intrusión de luz o de determinadas longitudes de onda del espectro en lugares no deseados.

- ♦ Contaminación visual: se produce generalmente por instalaciones industriales, edificios e infraestructuras que deterioran la estética del medio.

2.0.3 LA CONTAMINACIÓN ACUÁTICA

La importancia de los ecosistemas de agua dulce es pasada por alto por muchas personas. Debido a que estos son cuerpos muchos más pequeños que los océanos, pero importantes de todos modos, los ecosistemas de agua dulce incluyen lagos, ríos, arroyos y riachuelos. Todos ellos de descarga su agua en los océanos, por lo a partir de la desembocadura de los ríos. Una de las principales características del agua dulce son que en ellas existe una abundante cantidad de nutrientes y minerales (con un mínimo de sales minerales disueltas especialmente cloruro de sodio), es por eso que tantos tipos de plantas y animales son capaces de prosperar en tales ubicaciones.

Las cianobacterias o algas azules y verdes se encuentran en la mayoría de los ecosistemas de agua dulce y muchos animales dependen de estos organismos para alimentarse en ese entorno. Debido que proporcionan cantidades adecuadas de alimentos para aves, anfibios y muchos otros seres vivos de estos ecosistemas.

El deterioro de los ecosistemas debido a la contaminación es un problema crítico de nuestros tiempos. La creciente cantidad de contaminantes en zonas costeras se produce como consecuencia del vertimiento de desecho industrial, urbano, la actividad agrícola, minera y portuaria, representando un peligro inminente para el hombre y el medio ambiente. La actividad antropogénica es una constante amenaza para la estabilidad de los ecosistemas y en este sentido, los sistemas acuáticos son receptores de toda clase de residuos antropogénicos de naturaleza orgánica e inorgánica, dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas (propiedades fisicoquímicas) del ecosistema se pueden generar formas orgánicas e inorgánicas de tales residuos. Detectándose, además la presencia de compuestos tóxicos (Fargašová, 1997), generalmente considerados agresivos por su persistencia en los sedimentos (Visviki y Rachlin, 1991).

Tabla 1 Clasificación de los agentes contaminantes del agua.

<u>Agentes contaminantes del agua</u>		
Impurezas biológicas	Impurezas inorgánicas	Impureza orgánicas
• Bacterias • Virus • Parásitos	• Suciedad y sedimentos • Sólidos disueltos • Metales tóxicos • Radiactividad • Amianto	• Olores y sabores • Plaguicidas y herbicidas • Productos químicos orgánicos tóxicos. • Cloro





Las presencias de compuestos tóxicos en ecosistemas acuáticos son capaces de causar daño reversibles e irreversibles como letalidad de la biota. Los efectos que producen están en función del tipo de sustancias, concentración y metabolismo. En general, son alteraciones morfológicas, congénicas, mutagénicas (producen cambios genéticos), carcinogénicas o tóxicas. Una característica relevante es que son acumulables y su efecto se manifiesta solo después de un cierto periodo de exposición. Entre una concentración tolerable y una letal hay un nivel intermedio en donde se presenta efectos secundarios; este valor inferior corresponde al Umbral de Valor Límite (UVL) y representa la máxima concentración a la cual un organismo puede ser expuesto continuamente sin sufrir trastornos. El UVL se utiliza para definir los estándares de contaminación (Jiménez, 2001).

La complejidad de los ecosistemas acuáticos junto con su alta variabilidad inherente y la influencia de múltiples estresantes sugiere que, la medición de una sola o pocas variables, sea adecuada para estimar los efectos sobre la biota de múltiples factores con el fin de establecer las bases mecánicas de estos efectos (Botello, 2005).

De esta manera el crecimiento económico y la globalización han originado evidentes beneficios, pero al mismo tiempo han provocado la aparición de nuevos riesgos. Induciendo a la población a la exposición de sustancias y preparados químicos peligrosos, tales como, compuestos metálicos que son liberados en el ambiente tanto por fuentes naturales como

antropogénicas, especialmente por las actividades mineras e industriales. Ellos se filtran a las aguas subterráneas moviéndose a lo largo de la red de los cursos de agua y eventualmente alcanzando a los acuíferos o son llevados por las corrientes superficiales y por lo tanto resultando en la contaminación del agua y consecuentemente el suelo (Aldecoa, et .al.Sf).

Algunos metales tienen un rol biológico como elementos de traza, pero los efectos tóxicos de muchos de ellos en la bioquímica son motivo de gran preocupación, debido a que se combinan con proteínas y enzimas para formar biotóxicos estables, con lo cual mutilan sus estructuras e impidiendo las bioreacciones de sus funciones. Además, algunos metales también tienden a la bioacumulación que persiste a lo largo de la cadena trófica.

El agua de consumo puede transmitir numerosas enfermedades producidas por agentes microbiológicos y químicos. Los brotes de enfermedades hídricas son causados por contaminantes químicos, ya sea por contaminantes del agua de origen o bien debido a las características del abastecimiento, con lo cual puede representar un riesgo sanitario (Vargas Marcos, 2005)..

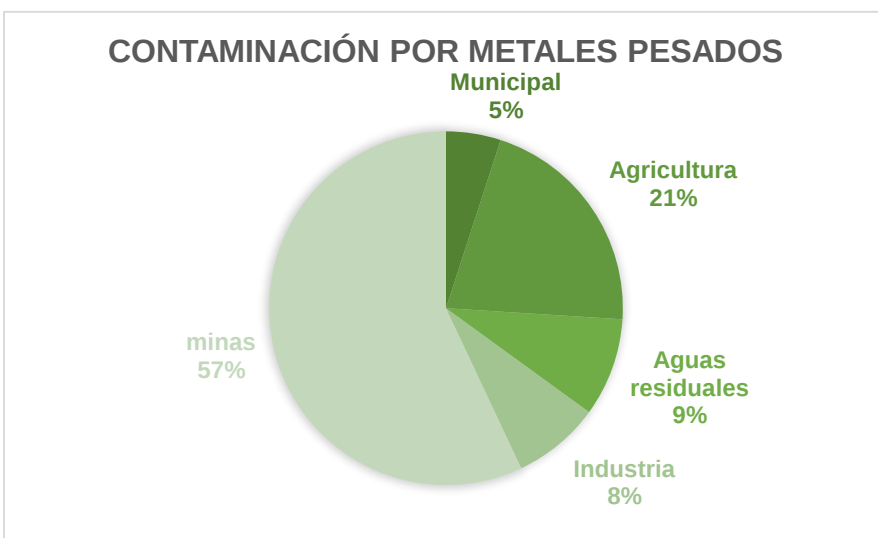
2.0.4 PRINCIPALES CONSECUENCIAS DE LA CONTAMINACIÓN ACUÁTICA

- ⊗ Generación de enfermedades infecciosas o toxiinfecciosas en las personas (cólera, hepatitis, cáncer, disentería, entre otras enfermedades) procesos carcinogénicos, etc.
- ⊗ Toxicidad en las especies de los diferentes ecosistemas.
- ⊗ Debilitación en el sistema inmunológico y efectos nocivos en el desarrollo de las especies marinas.
- ⊗ Contaminación del agua dulce, el cual es apto para el consumo humano.
- ⊗ Disminución en diversas actividades de recreo, así como la disminución en la producción de materia prima alimenticia.

2.1 CONTAMINACION ACUATICA POR METALES PESADOS

Las sustancias químicas pueden encontrarse en los compartimentos ambientales aire, agua y suelo de manera natural (por ejemplo, arsénico en el agua) o porque son emitidas por actividades industriales de extracción y explotación (como es el caso del mercurio en actividades mineras) (ver gráfica 1). En general, cada sector industrial se asocia a un grupo específico de contaminantes químicos y de residuos tóxicos. Por ejemplo, los metales se vinculan con la producción de cemento, la minería y la combustión de carbón, las dioxinas y los retardantes de flama con procesos de producción y reciclaje de productos electrónicos y los colorantes mutagénicos con la industria textil (PNUMA 2012). La liberación de sustancias químicas tóxicas puede ocurrir por fugas y derrames accidentales o descargas directas a ríos, lagos o mares. La disposición inadecuada de residuos, cuyos lixiviados contaminan suelos y acuíferos, es una fuente importante de contaminantes. La presencia de sustancias tóxicas en los compartimentos ambientales también puede ser causada por una actividad intencional como es la aplicación de plaguicidas y fertilizantes que posteriormente se dispersan en agua, suelo y aire (PNUMA 2012).

Una tercera forma de contaminación inorgánica consiste en la presencia de metales pesados en el medio ambiente. Los metales pesados son, en sentido estricto, los que tienen una densidad superior a 5 g/cm^3 . Esto es cierto para las cinco especies principales de mercurio, plomo, cadmio, cromo y arsénico. Sin embargo, otros elementos como el zinc y el aluminio tienden a afectar también a los organismos vivos, y cada vez es más claro que los metales ligeros están cargando el medio ambiente acuático tan fuerte como su capacidad más pesada (Potters, 2013).



Gráfica. 1 Porcentaje del grado de contaminación por metales pesados debido actividades antropogénicas.

La introducción de contaminantes metálicos en el sistema acuático tiene varias fuentes, algunas de las cuales se presentan en la Fig. 1, en donde se incluyen procesos de fundición y combustión de combustible a través de la lluvia atmosférica, contaminación por fugas, afluentes y actividades de vertido, forma de escorrentía de sistemas terrestres donde la acumulación ocurrió por la aplicación atmosférica en la tierra de materiales de aguas residuales y la lixiviación de basura. Por otro lado, los cuerpos de agua contaminados conducen a muchas vías hacia la contaminación por metales de los ecosistemas terrestres, por ejemplo, a través del riego, las actividades de dragado y el flujo de biota (Förstner & Wittmann, 2012).

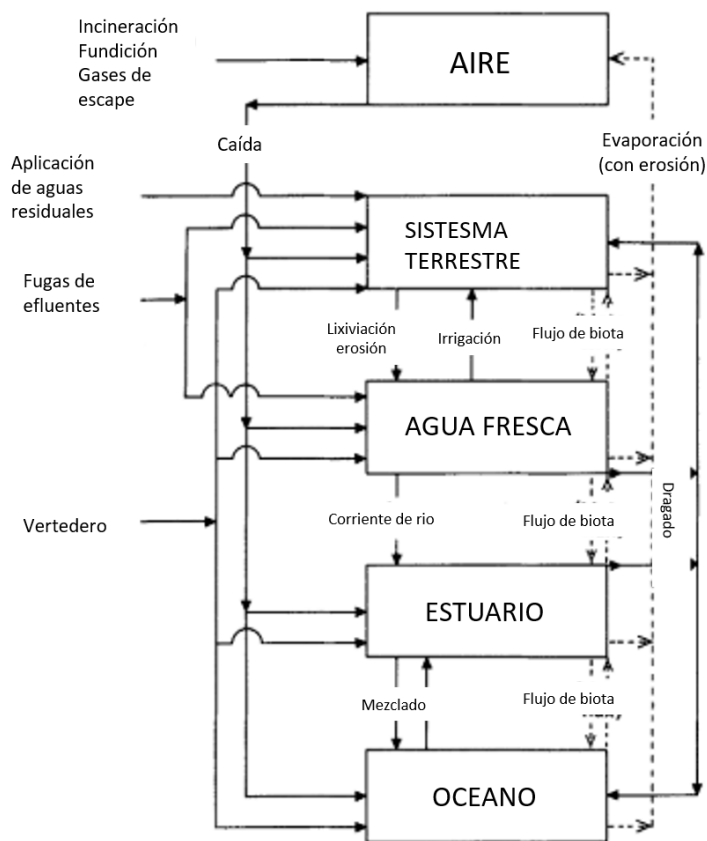


Fig. 1 Rutas de contaminantes metálicos al medio ambiente (Goldberg, 1976)

Los metales están naturalmente presentes en el medio ambiente, aunque normalmente en su forma oxidada, por ejemplo, en minerales o en material biológico. Sin embargo, la humanidad ha ideado un gran número de aplicaciones interesantes para metales y aleaciones, mejorando la propagación mundial de la contaminación por metales (incluso en aquellos lugares que nunca han visto minería o procesamiento de metales). Además, los metales son elementos químicos y no se pueden degradar (como los azúcares en CO_2 y H_2O), solo se reciclan de un organismo a otro.

Metales esenciales como Zn, Cu, Cr^{3+} , Se, Ni, Al, que tienen funciones biológicas benéficas para el crecimiento y productividad en el ecosistema, no obstante, son tóxicos en concentraciones altas. Ejemplos de tales metales se enumeran en la Tabla 2. Tanto el consumo excesivo como la escasez de metal tienen efectos nocivos sobre un organismo.

Tabla 2. Metales esenciales y tóxicos

Esenciales (fisiológicos) o No esenciales	
Esenciales	No esenciales
Zinc	Cadmio
Hierro	Níquel
Magnesio	Plomo
Cobre	Aluminio
Cobalto	Arsénico
<u>Algunos metales son biológicamente importantes</u> → Funcionan como cofactores. → Componentes integrales de enzimas (Mg) y moléculas biológicamente activas Ejemplos. Fe^{2+} : hemoglobina, citocromos. Mg^{2+} : Clorofila	

Ejemplos de metales tóxicos:

(Pb) Síntesis del hemo y síntesis de la clorofila.

(Hg^{2+} o MeHg, Pb) Neurológicos: daño mental, entumecimiento y visión túnel.

(Cd) Nefrotoxicidad, interrumpe la entrada del calcio y osteoporosis

Tabla 3. Metales esenciales para organismos (Potter G. 2013)

Metal	Función biológica
Potasio	Ayuda a preservar las propiedades electroquímicas sobre la membrana plasmática.
Sodio	Ayuda a preservar las propiedades electroquímicas sobre la membrana plasmática.
Calcio	Segundo mensajero Necesario en el funcionamiento del musculo. Necesario en la síntesis del hueso.
Magnesio	Cofactor en muchos ATPasas. Central ion en el grupo clorofila hemo.
Zinc	Cofactor en muchas enzimas: carboxipeptidasa, alcohol deshidrogenasa y anhídrido carbónico.

	Parte de la transcripción del factor del zinc.
<i>Hierro</i>	Central ion en el grupo hemoglobina hemo. Cofactor en el consumo de la vitamina C
<i>Manganeso</i>	Cofactor en muchas enzimas.
<i>Cobre</i>	Cofactor en muchas enzimas redox y citocromo oxidasa.
<i>selenio</i>	Cofactor esencial en la actividad de antioxidantes enzimas como glutatión peroxidasa.
<i>Cobalto</i>	Síntesis de vitamina B12

Otros metales (Hg, Cd, Pb) no son esenciales: constituyen solo una carga para el organismo y tienen un efecto nocivo sobre su metabolismo. Tan pronto como sus niveles en la célula u órganos de un organismo superen un umbral crítico, el organismo sufrirá una serie de síntomas, que en última instancia conducirán a mayores dosis, hasta la muerte (figura 3).

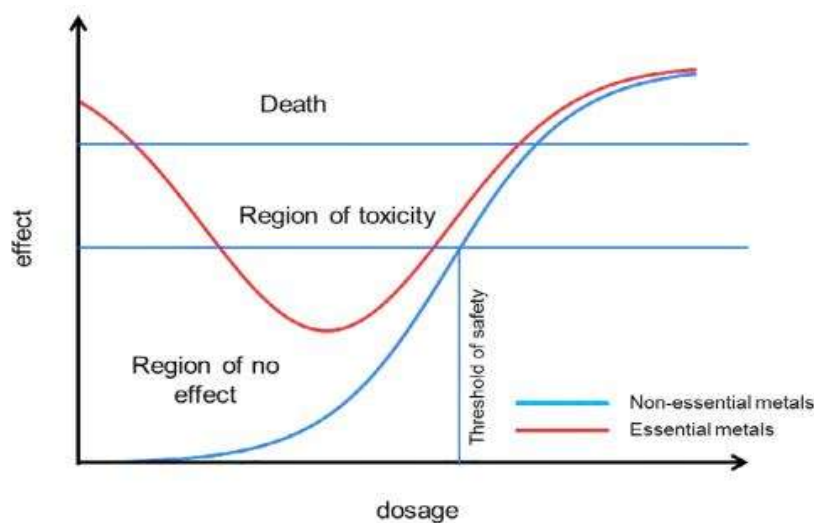


Fig. 2 Curva dosis- respuesta para metales esenciales y no esenciales (Potter G. 2013).

La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación. A pesar de las abundantes pruebas de estos efectos nocivos para la salud, la exposición a los metales pesados continúa y puede incrementarse por la falta de una política consensuada y concreta.

2.2 METALES CADMIO Y CROMO, Y SUS COMPUESTOS. TOXICODINAMIA

Las sales solubles en agua de los metales pesados son muy tóxicas y acumulables por los organismos que los absorben, los cuales a su vez son fuente de contaminación de las cadenas alimenticias al ser ingeridos por alguno de sus eslabones.

2.2.1 CADMIO

El cadmio (Cd, número atómico 48, masa atómica 111,40), significa calamina, nombre que recibía antiguamente el carbonato de cinc. El elemento cadmio lleva este nombre porque fue descubierto en Alemania en 1817 por Friedrich Stromeyer como una impureza en el carbonato de zinc (Ramírez, 2002). Este no se halla en el ambiente como un metal puro, es más abundante en la naturaleza en forma de óxidos complejos, sulfuros y carbonatos en el zinc, plomo y minas de cobre



Fig. 3 El cadmio se encuentra en la naturaleza, en la corteza terrestre, y se ha usado para la fabricación de baterías y otros productos. (Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU)

(García & Cruz, 2012) . Se obtiene como subproducto del tratamiento metalúrgico del zinc y del plomo, a partir del sulfuro de cadmio; en el proceso hay formación de óxido de cadmio, compuesto muy tóxico. Además de contaminar el ambiente desde su fundición y refinación, contaminación también por múltiples aplicaciones industriales (Ramírez, 2002).

El cadmio es un elemento altamente tóxico para el ser humano y está clasificado por la IARC (por sus siglas en inglés “International Agency for Research on Cancer”) en el grupo I (cancerígeno comprobado en humanos).

Uno de los mayores agentes tóxicos asociado a contaminantes ambiental e industrial, pues reúne cuatro de las características más preocupantes en un tóxico:

1. Efectos adversos para el hombre y el medio ambiente
2. Bioacumulación
3. Persistencia en el ambiente
4. Es fácilmente acarreado por corrientes de agua o viento.

Las principales fuentes de contaminación son: la minería, la metalurgia de metales no ferrosos, la metalurgia del hierro y acero, la fabricación de fertilizantes fosfatados, la incineración de residuos de madera, carbón o “plásticos”, la combustión de aceite y gasolina y las aplicaciones industriales de cadmio.

La concentración de cadmio en aire de áreas industriales varía de 9.1 a 26.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ frente a 0.1 a 6 ng/m^3 en el aire de áreas rurales. El tiempo de permanencia del cadmio en suelos es de hasta 300 años y el 90% permanece sin transformarse. El cadmio llega al suelo de los terrenos agrícolas por deposición aérea (41%), con los fertilizantes fosfatados (54%), por aplicación de abono de estiércol (5%) y, frecuentemente por efluentes que contienen residuos líquidos y sólidos de plantas hidrometalúrgicas de cadmio. Se ha encontrado que, en suelos contaminados, los niveles de cadmio alcanzan valores de hasta 1mg de Cd/g y el agua de ríos contaminados puede contener hasta 0.14 mg de Cd por L (Ramírez, 2002).

El cadmio siendo el miembro medio del subgrupo periódico que consiste en Zn, Cd y Hg revela propiedades intermedias. Los tres elementos muestran una profunda capacidad de combinarse con grupos tiol SH^- (y ligando que contienen imidazol); la estabilidad de tales complejos aumenta en los órdenes de $\text{Zn} < \text{Cd} < \text{Hg}$.

Cd y Hg compiten y desplazan al Zn en los procesos metabólicos. Esto, por supuesto, conduce a la secuencia de estabilidad absoluta que se explica mejor sobre la base de que el sulfhidrilo es un donante blando, el cadmio y el mercurio son aceptores blandos, mientras que el zinc es un caso límite. Sobre la premisa de que los aceptores blandos prefieren unirse a los donantes blandos, el desplazamiento de zinc se explica de forma inmediata (Förstner & Wittmann, 2012).

2.2.2 CLORURO DE CADMIO

El cloruro de cadmio se emplea como fungicida, componente de los baños galvanoplásticos, colorante en pirotecnia, aditivo en las soluciones de estañado y mordente en la tinción e impresión de textiles. También se utiliza para la producción de determinadas películas fotográficas, para la fabricación de espejos especiales y para el recubrimiento de tubos electrónicos de vacío

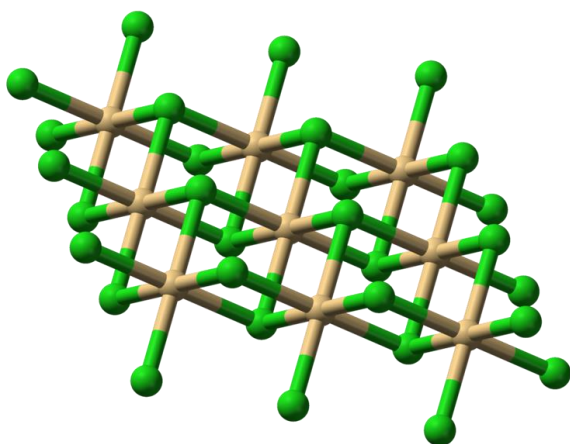


Fig. 4 Modelo de barras y esferas del cloruro de cadmio (Anatolievich, 2014)

Propiedades físicas y químicas	
Formula	CdCl ₂
Estado físico	Sólido, blanco, higroscópico, inodoro
Peso molecular	183.32 g/mol
Densidad	4047 kg/m ³ , 4,047 g/cm ³
Punto de fusión	841K (568 ° C)
Solubilidad en agua	Monohidratado: 119.6 g/100 mL (25 °C)

Tabla 4. Propiedades Fisicoquímicas del cloruro de cadmio

El cloruro de cadmio es muy resistente a la corrosión y se utiliza para su electrodeposición en otros metales, especialmente el acero y el hierro. Los tornillos, las tuercas de seguridad, los pestillos y diversas partes de los aviones y vehículos de motor están tratados con cadmio con el fin de protegerlos de la corrosión. Actualmente, sólo el 8 % de todo el cadmio refinado se utiliza para el galvanizado y los recubrimientos. Los compuestos de cadmio se utilizan también como pigmentos y estabilizadores de plásticos (30% de su uso en los países desarrollados) y en ciertas aleaciones (3%). Las baterías pequeñas, portátiles y recargables de cadmio que se utilizan, por ejemplo, en los teléfonos móviles representan un uso del cadmio cada vez mayor (en 1994, en los países desarrollados, el 55 % de todo el cadmio se utilizó en la fabricación de baterías) (Nordberg, 2011).

El cadmio es un metal pesado tóxico que puede causar numerosas alteraciones en el funcionamiento de la célula. La exposición al cadmio conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), trastornos en la estructura y funcionamiento de la membrana, inhibición de la respiración, alteraciones en la homeostasis iónica, perturbaciones en la

división celular e inicio de apoptosis y necrosis. Este metal pesado es considerado un carcinógeno por la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Al menos algunos de los efectos tóxicos descritos podrían resultar de la capacidad del cadmio para imitar otros iones divalentes y redes de transducción de señales de alerta (Chmielowska-Bak, Izbiańska, & Deckert, 2013).

2.2.3.1 Mecanismo de acción toxica

El cadmio es considerado un genotóxico porque, aunque es incapaz de generar directamente radicales libres, participa en la formación de superóxido, hidroxilo y óxido nítrico. La acción tóxica del cadmio se debe a su afinidad por radicales de los grupos –SH, – OH, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil y a su actividad competitiva con otros elementos funcionalmente esenciales como zinc, cobre, hierro y calcio.

Esto se da por dos tipos de mimetismo que pueden distinguirse a nivel celular: iónico y molecular. El mimetismo iónico es la capacidad para imitar iones no unidos u otros iones o elementos. Mientras que el mimetismo molecular, a su vez, consiste en recolocación de otros metales en las moléculas biológicas. El mimetismo molecular del cadmio puede alertar a las vías de transducción de señal y de contribuir a la citotoxicidad del Cd de varias maneras (Chmielowska-Bak et al., 2013).

Los mecanismos moleculares de la toxicidad de cadmio no son completamente conocidos hasta el momento; entre las respuestas tóxicas el Cd presenta en primer lugar la alteración y competencia por los sitios de unión con metales esenciales especialmente el Zn, Fe, Cu y Ca, desplazándolos para unirse a los grupos tiol con la consecuente depleción de proteínas, enzimas (ej. glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa) y factores de transcripción (Mera et al., 2016). Aunque el Cd carece de actividad redox, indirectamente induce estrés oxidativo (Cailliatte et al., 2009), y se presenta tanto como un ion hidratado como en complejos iónicos orgánicos e inorgánicos. Las formas solubles del metal (en asociación con cloruros, sulfhidrilo, hidroxilo y grupos tiol) gobiernan en gran medida la actividad biológica del Cd; mientras que las formas insolubles en unión a sulfatos e hidróxido son inmóviles y absorbidas por el sedimento al depositarse en él (Vig, 2003; Faroon et al., 2012). Se ha demostrado que la concentración total disuelta del Cd tiende a incrementarse si se encuentra en forma iónica y varía con la concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) (Fotovát & Naidu, 1998; Vig, 2003). En este contexto, las microalgas unicelulares son un componente fundamental de los distintos ecosistemas acuáticos, puesto que

constituyen el primer eslabón que soporta a la cadena trófica acuática, 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). En este contexto, los metales tóxicos al afectar a las comunidades planctónicas, provocan alteraciones en la fotosíntesis, crecimiento, inhibición de la actividad enzimática y la respiración (Yan & Pan, 2002), (Cortés-Téllez A. et al 2017).

Esto ocurre debido a que el cadmio es capaz de mimetizar a estos cationes divalentes en el sitio de unión de uno o más acarreadores de proteínas y/o canales que transportan estos metales (Ca^{2+} , Fe y Zn) a manera de obtener la entrada en las células diana; ocasionando que el Cd^{2+} pueda imitar a las especies catiónicas divalentes de uno o más metales nutritivos en el sitio de unión de una o más de estas proteínas transportadoras; puede formar un complejo coordinado covalente con ciertas biomoléculas que contienen grupos sulfhídrido como el glutatión(GSH) o cisteína(Cys) ;(Bridges & Zalups, 2005) asimismo una de las principales entradas del cadmio a la célula está dada por los canales de calcio, tomando en cuenta que Cd^{2+} y el calcio tienen un radio iónico similar, el metal puede introducirse libremente por esta vía a las células.

Los complejos que contienen Cd pueden servir o comportarse como imitadores moleculares de aminoácidos endógenos, oligopéptidos, aniones orgánicos o cationes orgánicos en el sitio de transportadores de membrana de estos sustratos.

Una de las proteínas importantes en una intoxicación por cadmio es la metalotioneína; esta proteína de bajo peso molecular y rica en cisteínas se encuentra presente en todos los tejidos, principalmente en hígado y riñones (donde se acumula más cadmio en el organismo), funciona principalmente atrapando iones de cadmio (Nava-Ruíz & Méndez-Armenta, 2011) . La endocitosis mediada por receptor de un complejo de Cd^{2+} - proteína, como CdMT o Cd-albúmina, también parece ser un mecanismo importante por el cual el Cd^{2+} es captado por algunas células epiteliales (Bridges & Zalups, 2005).

La alteración en la homeostasis del calcio intracelular lleva a la célula a una liberación del calcio mitocondrial y retículo endoplásmico; produciendo alteraciones en el metabolismo, interfiriendo con vías de señalización dependientes de calcio, con señales de transducción entre las células, daño a las membranas, bloqueo de canales dependientes de voltaje, regulación génica y bloqueo de la liberación de neurotransmisores. Uno de los mecanismos

de toxicidad más reportado por el cadmio es el incremento de lipoperoxidación (LPO) y generación de radicales libres en cerebro y otros órganos; estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que es capaz de incrementar la LPO por medio del aumento de radicales libres, además del radical superóxido, el radical hidroxilo y radicales del óxido nítrico que también pueden ser generados en diversos órganos y sistemas. El cadmio reemplaza al hierro o cobre en diferentes proteínas, por lo que estos iones al quedar libres ingresan al ciclo de Haber Weiss catalizando la reacción de Fenton causando un incremento en el estrés oxidativo. Estos efectos tratan de ser detenidos por mecanismos de defensa antioxidante en el cerebro y otros órganos; sin embargo, diversos reportes han mostrado que la actividad de los sistemas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) son disminuidas en presencia de cadmio, por lo que existe incremento significativo en la LPO en cerebro de ratas en desarrollo, lo que no se presenta en adultos, mostrando que los animales en desarrollo son más susceptibles a los efectos tóxicos del metal (Nava-Ruíz & Méndez-Armenta, 2011).

El mecanismo de acción del cadmio en plantas y algas se da por la absorción de Cd^{2+} en las células vegetales, manifestándose en la degradación de clorofila, inhibición de la fotosíntesis y la dirección del metabolismo para las síntesis de compuestos de protección, como lignina o flavonoides, debido a su capacidad para imitar iones esenciales. Un ejemplo de alteraciones en la estructura molécula diana resultantes de mimetismo cadmio incluyen interrupción de complejos / cadherina β -catenina que conducen a la liberación de β -catenina y la activación de la señalización de Wnt / β -catenina, y la sustitución de Mg^{2+} en clorofila causando alteraciones en la estructura y actividad de los fotosistemas (Chmielowska-Bak et al., 2013).

2.2.3 CROMO

El Cromo (Cr) es un metal, número atómico 24, del grupo VIB de la tabla periódica y peso molecular 51,996. Blanco plateado, brillante, duro y quebradizo, resistente a la corrosión. Se encuentra en estados de oxidación +2, +3, +6. El estado hexavalente Cr^{+6} el más importante toxicológicamente, lo presentan los cromatos, dicromatos y el ácido crómico. Es



Fig. 5 Cristales de cromo de alta pureza (Dayan A.D. 2001).

un oligoelemento presente en el organismo

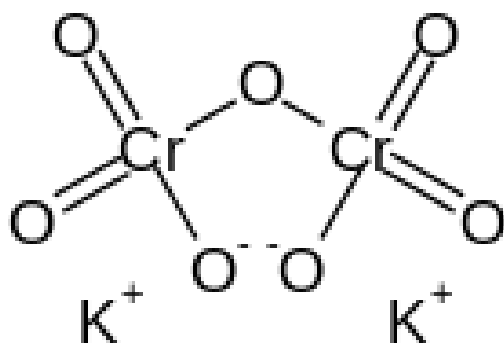
en forma trivalente Cr^{+3} , indispensable en el metabolismo de la glucosa, colesterol, ácidos grasos y cristalinicos, involucrado en otros múltiples procesos biológicos en organismos superiores. Hombre y animales están expuestos al Cr por vía inhalatoria (aire, humo del tabaco), por la piel o por ingestión (productos agrícolas, agua). El mayor peligro profesional ha sido el procesamiento del metal de cromita para producir cromatos Cr^{+6} (Cuberos, Rodriguez, & Prieto, 2009).

El cromo en forma trivalente es uno de los elementos traza menos tóxicos. En general, el cuerpo de los mamíferos puede tolerar entre 100 y 200 veces el contenido corporal total de Cr^{+3} sin efectos perjudiciales. Los compuestos de Cromo⁺⁴ son aproximadamente 100 veces más tóxicos que las sales de Cr^{+3} . La acidez estomacal conduce a la reducción de Cr^{+4} a Cr^{+3} , de la cual la absorción gastrointestinal es inferior al 1% (Förstner & Wittmann, 2012).

El cromo ⁺⁶ es un elemento altamente tóxico para el ser humano y está clasificado por la IARC en el grupo I (cancerígeno comprobado en humanos) (M. Roxs, & Gaitán, 2004).

2.2.4 DICROMATO DE POTASIO

El dicromato de potasio es un compuesto inorgánico de fórmula $K_2Cr_2O_7$ caracterizado por ser un poderoso agente oxidante. Es un compuesto iónico con dos iones potasio (K^+) y el ion dicromato cargado negativamente ($Cr_2O_7^{2-}$), en el que dos átomos de cromo hexavalente (con estado de oxidación +6) están unidos a tres átomos de oxígeno, así como un átomo de oxígeno puente (Potassium Dichromate Formula, S.F.).



Propiedades físicas y químicas	
Formula	$K_2Cr_2O_7$
Estado físico	Sólido, anaranjado intenso, inodoro, sabor metálico
Peso molecular	294,18g/mol
Densidad	4047 kg/m ³ , 4,047 g/cm ³
Punto de fusión	671,15K (398 ° C)
Solubilidad en agua	130 g/L a 20 °C

Tabla 5 Propiedades Fisicoquímicas del Dicromato de cadmio

El dicromato de potasio se produce naturalmente en forma mineral como lopezita, un mineral muy raro. El compuesto es tóxico y altamente cancerígeno. El Dicromato de potasio o sodio reacciona explosivamente con hidrazina. Una gota de hidroxilamina anhidra sobre dicromato de potasio en polvo produce una explosión violenta (Potassium Bichromate, 2016). Los agentes oxidantes, como el cromato y el dicromato de potasio, pueden reaccionar con los agentes reductores para generar calor y productos que pueden ser gaseosos (causando la presurización de los recipientes cerrados).



El dicromato de potasio y sodio, se utiliza en la industria del cromo, en la fabricación de pigmentos y tintes, en curtiembres, en la preparación de antisépticos, en el laboratorio de

cristalería de limpieza y como valorante entre otros. Por lo tanto, la principal fuente de liberación de cromo en los ecosistemas acuáticos está relacionada con la aplicación industrial de este metal (Rocha et al., 2015).

La incineración y las emisiones de los automóviles crean contaminación ambiental con pequeñas partículas de Cr (VI) y Cr (III), lo que conduce a la exposición por inhalación de bajo nivel por grandes segmentos de la población general y aumenta los niveles de Cr en las aguas superficiales, la mayor parte de casos graves de contaminación antropogénica de agua potable se da por los vertidos de Cr tóxico (VI) por las torres de refrigeración y eliminación inadecuada de millones de toneladas de mineral de cromo procesados de forma incompleta. La presencia de Cr (VI) en el agua potable también puede resultar de la oxidación de origen natural Cr(III) por monóxidos de bismuto (mineral común que recubre granos y fracturas en rocas que están enriquecidos en cromita)(Zhitkovich, 2011).

El Cr (VI) es un componente oxidante a pH altamente ácido donde cualquier molécula orgánica con grupos oxidables puede promover su reducción a Cr (III). Aunque en general el Cr (VI) es un componente persistente en muchas fuentes de agua debido a su bajo contenido orgánico y la falta de suficiente acidez para catalizar la reducción a Cr (III).

2.2.4.1 Mecanismos de acción tóxica

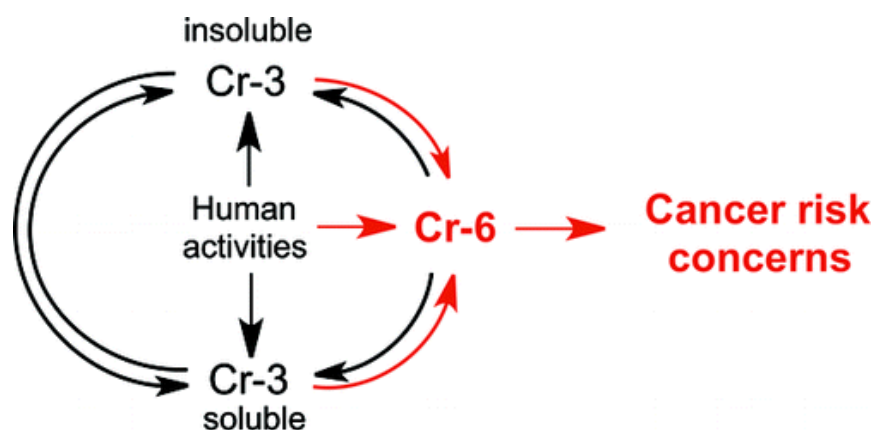


Fig. 6 origen e interconversión de diferentes formas de Cr en el agua. Ruta 1 es la fuente global más importante de Cr (VI) mientras que la ruta 2 se describe el proceso natural más importantes de la formación de Cr (VI) (Anatoly Zhitkovich 2011).

La potencia tóxica del cromo depende del estado de oxidación del átomo de cromo, con cromo (VI) más potente que el cromo (III). Los mecanismos de toxicidad y carcinogenicidad

del cromo son muy complejos. Están mediados por reactivos intermedios durante la reducción intracelular de cromo (VI) a cromo (III) y reacciones oxidativas, y parcialmente mediados por cromo (III) que es el producto final de la reducción del cromo intracelular (VI) y forma complejos nocivos con el objetivo crítico macromoléculas (Chen y Shi 2002; Costa 2003; Costa y Klein 2006; Ding y Shi 2002; Jeejeebhoy 1999; Levina y Lay 2005; Liu y Shi 2001, O'Brien et al 2003; Paustenbach y otros 2003; Salnikow y Zhitkovich 2008, Shrivastava et al 2002; Yao et al 2008; Zhitkovich 2005). El cromo (III) puede formar complejos con péptidos, proteínas y ADN, lo que produce enlaces cruzados ADN-proteína, roturas de cadenas de ADN y alteraciones en las vías de señalización celular, que contribuyen a la toxicidad y carcinogenicidad de los compuestos de cromo.

La mayor potencia tóxica del cromo (VI) en relación con el cromo (III) probablemente se relaciona con dos factores:

1. El mayor potencial redox de cromo (VI) (Levina y Lay 2005; Reddy y Chinthamreddy 1999).
2. La mayor capacidad del cromo (VI) para ingresar a las células (Costa 2003).

Las diferencias en la estructura molecular contribuyen a una mayor captación celular de cromo (VI) en comparación con el cromo (III) (Costa 2003; Costa y Klein 2006a). A pH fisiológico, el cromo (VI) existe como el anión cromato tetraédrico, que se asemeja a las formas de otros aniones naturales (por ejemplo, sulfato y fosfato) que son permeables a través de canales de membrana no selectivos. El cromo (III), sin embargo, forma complejos octaédricos y no puede entrar fácilmente a través de estos canales. Por lo tanto, la menor toxicidad para el cromo (III) puede deberse en parte a la falta de penetración a través de las membranas celulares. Se deduce que la reducción extracelular de cromo (VI) a cromo (III) puede dar como resultado una penetración reducida de cromo en las células, y, por lo

tanto, una toxicidad disminuida.

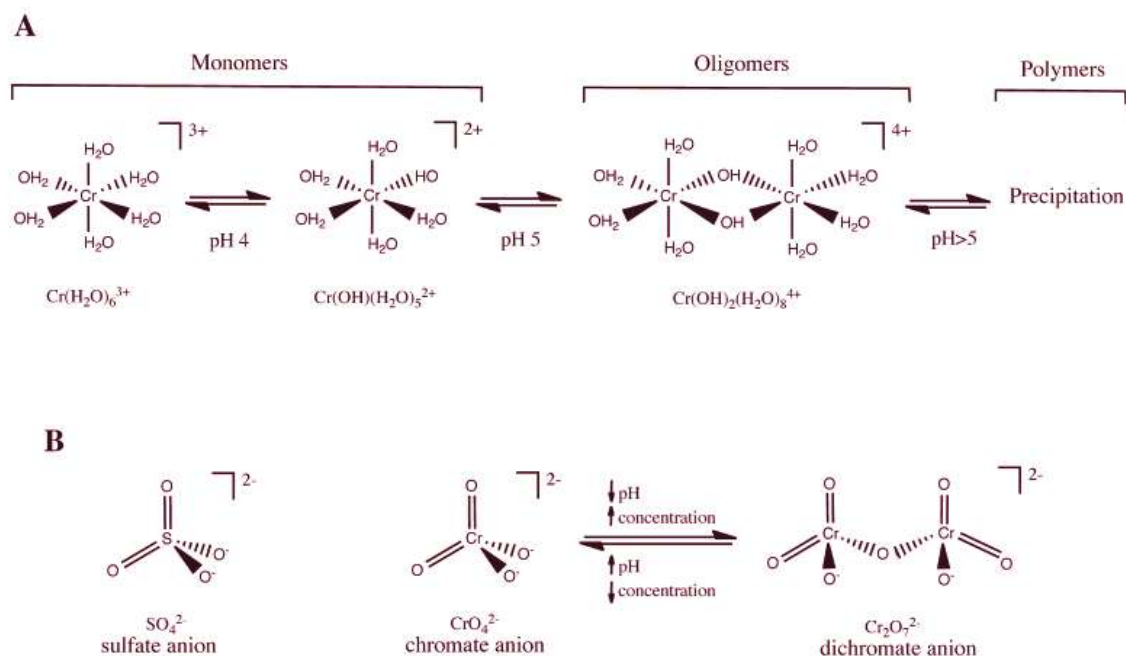


Fig. 7 Especies acuosas de Cr (III) y Cr (VI). (A) Hidrólisis y polimerización de hexaacuachromium (III). Los valores de pH de transición son aproximados. (B) Estructuras de sulfato, cromato y dicromato (Anatoly Zhitkovich 2011)

El mayor potencial redox de cromo (VI) contribuye a la mayor potencia tóxica del cromo (VI) en relación con el cromo (III) (Levina y Lay 2005), porque una vez que se toma en las células, el cromo (VI) se reduce rápidamente a cromo (III), con cromo (V) y cromo (IV) como intermedios. Estas reacciones comúnmente involucran especies intracelulares, tales como ascorbato, glutatión o aminoácidos (Aiyar et al., 1991; Blankenship et al., 1997; Capellmann et al., 1995; Hojo y Satomi, 1991; Kim y Yurkow, 1996; Lin et al., 1992.; Liu et al, 1997b; Mao et al, 1995; Wiegand et al., 1984; Zhitkovich et al., 1996). Se ha demostrado que el cromo (VI), el cromo (V) y el cromo (IV) están implicados en el ciclo oxidativo tipo Fenton, generando especies radicales de oxígeno (Aiyar et al., 1991; Chen et al., 1997; Liu et al. 1997b; Luo et al. 1996; Mao et al. 1995; Molyneux y Davies 1995; Tsou et al. 1996). Se cree que la formación de estos radicales, que conduce al estrés oxidativo, puede ser responsable de muchos de los efectos nocivos del cromo en las células, incluida la peroxidación lipídica (Bagchi et al., 2002a; Hojo et al., 1999, 2000) y alteraciones en comunicación celular, vías de señalización y citoesqueleto (Chen et al., 1997). El estrés oxidativo inducido por cromo (VI) resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno se ha demostrado en estudios *in vitro* que resulta en la inducción e inhibición de los factores de transcripción, -

NF- κ B y AP-1, activación de p53, activación de factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1), detención del ciclo celular y apoptosis dependiente de p53 (Yao et al., 2008). Los radicales bloqueadores pueden bloquear el daño celular por la exposición a diversos compuestos de cromo, reforzando aún más la hipótesis de que los radicales de oxígeno juegan un papel clave en la toxicidad del cromo (Hojo et al., 2000).

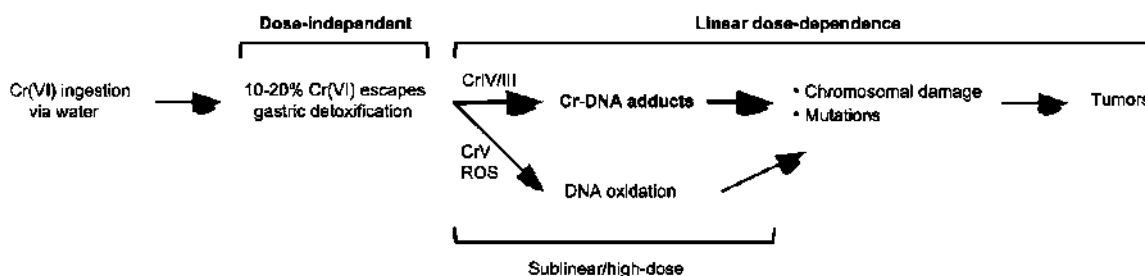


Fig. 8 Riesgos genotóxicos de Cr (VI) ingerido (Anatoly Zhitkovich, 2011)

Se cree que los productos de la reducción metabólica del cromo (VI) (radicales libres y cromo (IV) y (V) y el cromo recientemente generado (III) son en parte responsables de los efectos carcinogénicos observados en estudios humanos y animales. La interacción de radicales libres, cromo (V), cromo (IV) y cromo (III) con ADN puede provocar daño estructural en el ADN, daño funcional y otros efectos celulares (Levina y Lay 2005). Los tipos de daño estructural inducido por cromo incluyen rupturas de cadenas de ADN (Aiyar et al., 1991), ADN-proteína retícula (Aiyar et al., 1991), enlaces cruzados entre ADN-ADN (Xu et al., 1996), aductos de ADN de cromo y aberraciones cromosómicas (Blankenship et al., 1997). El daño funcional incluye la detención del ADN polimerasa (Bridgewater et al., 1994a, 1994b, 1998), la detención de la ARN polimerasa, la mutagénesis y la expresión génica alterada. Sin embargo, las roturas de doble cadena de ADN pueden no deberse a la formación de radicales libres, sino a la formación de aductos ternarios de cromo-ADN, que conducen a errores de reparación y a horquillas de replicación plegadas (Ha et al., 2004). Las roturas de doble cadena también pueden provocar alteraciones en la comunicación celular y efectos sobre las vías de señalización y el citoesqueleto. Además, los resultados de estudios recientes en células de pulmón humano sugieren que la inestabilidad cromosómica es un mecanismo importante en el desarrollo de cánceres de pulmón; específicamente, cromosoma inducido por cromo a inestabilidad parece estar mediada a través del centrosoma y el bypass del punto de control del ensamblaje del huso (Holmes et al., 2006; Wise et al., 2006a).

La ubicación de la deposición de partículas en el pulmón y la disolución extracelular de compuestos de cromo (VI) (por ejemplo, solubilidad) también son consideraciones importantes con respecto al mecanismo de carcinogénesis inducida por cromo (VI). En los trabajadores que están expuestos al cromato, el análisis de sus tejidos bronquiales muestra mayores concentraciones de cromo en las áreas de bifurcación bronquial en comparación con otras áreas en los bronquios (Ishikawa et al., 1994a). Además, los resultados de la autopsia muestran que algunas lesiones bronquiales precancerosas se originaron en las bifurcaciones bronquiales (Ishikawa et al., 1994b). La solubilidad de los compuestos de cromo (VI) también puede jugar un papel en la potencia carcinogénica, con la disolución extracelular del compuesto de cromo crítico para la actividad (Wise et al., 2004). Esta hipótesis está respaldada por datos *in vitro* que sugieren que los iones de cromo extracelulares son el clastogen próximo en las células de ovario de hámster chino (Wise et al., 2004).

El cromo (III) también puede interactuar con el ADN para formar aductos / complejos y enlaces cruzados ADN-proteína que interfieren con la replicación y transcripción del ADN, y pueden promover la expresión de genes reguladores como el factor nuclear- $\kappa\beta$ o pueden inhibir genes reguladores como GRP78 (O'Hara et al., 2003). La interrupción de estas vías por otros compuestos ha sido implicada en la carcinogénesis. El daño estructural y funcional puede llevar a la detención del crecimiento (Xu et al., 1996) y la apoptosis (Carlisle et al., 2000; Singh et al., 1999). Numerosos estudios muestran que el cromo puede inducir la apoptosis (He et al., 2007); aunque el mecanismo por el cual el cromo induce la apoptosis no se entiende completamente, se cree que implica estrés oxidativo y activación de la proteína p-53 (Pulido & Parrish 2003).

2.3 BIOENSAYOS, TIPOS Y APLICACIÓN

En el campo de la toxicología y la ecotoxicología es necesario determinar el efecto que produce uno o varios compuestos químicos (presuntamente tóxicos) a los individuos de una determinada especie; así como su capacidad de acumulación en los tejidos vivos y, en general, su comportamiento en el compartimiento biótico del ecosistema. Los experimentos diseñados para este fin son los denominados bioensayos. La FAO define el término *bioensayo* como: «Test en los cuales un tejido vivo, organismo o grupo de organismos, se usan como reactivos para la determinación de la potencia de alguna sustancia activa fisiológicamente».

Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

- Afectación del término de vida
- Alteración de la tasa de crecimiento
- Cambios de los parámetros reproductivos (Reish y Oshida, 1987).
- La selección del tipo de prueba a emplearse dependerá de los objetivos del ensayo, la disponibilidad de los recursos, los requerimientos de los organismos de prueba, las características de la sustancia a evaluar y de los objetivos y alcances particulares del estudio (Rodríguez y Esclapés, 1995).

Este tipo de experimentos se puede utilizar para determinar la toxicidad de contaminantes para diferentes especies de organismos, registrando la mortalidad que producen, u otros efectos no letales (subletales) que ponen en peligro la supervivencia de los individuos o de las poblaciones en el medio natural, como por ejemplo efectos negativos sobre el comportamiento, la reproducción o el metabolismo.

En un sentido más amplio, los bioensayos incluyen también test de acumulación de los tóxicos en los organismos, diferenciándose entre las diferentes vías de entrada de los xenobióticos. Mientras que los animales terrestres acumulan contaminantes principalmente a través del alimento, el medio acuático se pueden distinguir tres procesos bien diferenciados: *bioconcentración*, *bioacumulación*, y *biomagnificación*.

El potencial bioindicativo de organismos de bajo nivel trófico se ha investigado cada vez más para evaluar los posibles riesgos ambientales asociados con la transferencia de contaminantes a lo largo de diferentes redes tróficas, lo que justifica el uso de las microalgas como bioindicadores (Gallego, 2003)

La *bioconcentración* es el proceso por el que un compuesto entra en un organismo acuático desde el agua a través de las agallas o de los tejidos epiteliales como consecuencia de un simple equilibrio químico de participación entre los tejidos y el agua. La *bioacumulación* incluye tanto la *bioconcentración* como los procesos de entrada de residuos químicos a través de la comida. Por su parte, la *biomagnificación* hace referencia a la totalidad de procesos por los cuales la concentración tisular de un compuesto químico bioacumulado se incrementa a medida que este material pasa a través de dos o más niveles tróficos. Aunque la comida es, la principal vía de entrada de contaminantes en las especies terrestres, en la mayoría de los organismos acuáticos predominan los procesos de *bioconcentración* (Gallego, 2003).

2.3.1 TIPOS DE BIOENSAYOS

Ensayos de respuesta directa. Bioensayos de toxicidad:

1. Bioensayos agudos: Cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL50), y representa la concentración que causa la muerte al 50 % de la población experimental, en un tiempo determinado (generalmente 48 o 96 horas) (Esclapés, 1999).

1.1 De tipo estático: Se efectúa sin la renovación continua del flujo constante de las diluciones sometidas al ensayo (FAO, 1981).

1.1.1 Sin renovación: los organismos se exponen a la misma solución de prueba el tiempo de duración del ensayo (Esclapés, 1999).

1.1.2 Con renovación: los especímenes se someten a una preparación fresca de la misma concentración inicialmente empleada, periódicamente (generalmente cada 24 horas) (Esclapés, 1999). Tal renovación puede ser necesaria cuando importantes sustancias tóxicas se deterioran, o son

absorbidas, o se pierden por cualquier otra razón, con suficiente rapidez para influir considerablemente con los resultados del ensayo (FAO, 1981).

1.2 De flujo continuo: Circula continuamente una corriente de sustancia de prueba nueva en contacto con los individuos experimentales (Esclapés, 1999). Se realizan con la renovación continua o casi continua de las diluciones sometidas al ensayo, con el fin de mantener casi constantes las concentraciones de las sustancias tóxicas activas (FAO, 1981).

- 2. Bioensayos crónicos:** Estiman la concentración efecto media (CE50), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado; depende del estadio de vida considerado o del ciclo de vida del organismo empleado. Alternativamente, un ensayo definitivo puede utilizarse para estimar el tiempo requerido para producir un efecto al 50% de los organismos (TE50), a una concentración específica (Esclapés, 1999).
- 3. Bioestimulación:** Se mide la facultad de las aguas residuales o de las sustancias químicas de estimular la multiplicación y el desarrollo de algas, efecto este de eutroficación que frecuentemente se traduce en una superabundancia o proliferación de algas (FAO, 1981)
- 4. Bioensayos de repelencia:** Trata de medir en el laboratorio las reacciones de escapes de los animales acuáticos frente a un contaminante. Al organismo utilizado (generalmente pez o crustáceo de buen tamaño) se le ofrece la oportunidad de elegir entre aguas "contaminadas" y aguas "limpias" en un tubo o tanque pequeño; el gradiente de interfaz puede ser brusco. Los aparatos y procedimientos miden también, por lo general, cuando existe la atracción hacia el contaminante. Para las especies con motilidad el escapamiento puede ser a veces la respuesta subletal clave, de naturaleza más sensible y más significativa que el deterioro de la reproducción medido mediante ensayos de toxicidad crónicos. Sin embargo, es particularmente difícil predecir, a partir de estos resultados de laboratorio, lo que ocurriría en el medio. Las respuestas de escape pueden estar o no relacionadas con la toxicidad del contaminante, en algunos casos los organismos no pueden soportar determinadas concentraciones tóxicas o pueden ser atraídas por ellas (FAO, 1981).

5. **Bioacumulación:** Son necesarios para las sustancias que se acumulan en las plantas y animales acuáticos; las grandes concentraciones de sustancias tóxicas en los tejidos pueden causar la muerte, pero el organismo es capaz de acumular durante algún tiempo cantidades menores sin sufrir daño. En este último caso, los depredadores pueden acumular las sustancias en grado tal que resulte nociva para ellos o para los depredadores del nivel trófico siguiente (FAO, 1981).
6. **Ensayos organolépticos:** Algunos contaminantes pueden producir olores o sabores desagradables en los organismos acuáticos. El contaminante puede no ser nocivo para el organismo acuático, pero puede ocurrir que el organismo pierda valor económico. El mejor procedimiento consiste en la evaluación por parte de personas experimentadas en bromatología y emplear gran número de catadores diestros (FAO, 1981).
7. **Ensayos de bioestimulación:** Los efectos de los nutrientes adicionales pueden ser indirectos como, por ejemplo, la producción de sustancias tóxicas o la desoxigenación del agua debida a la proliferación de algas (FAO, 1981).

Ensayos de respuesta indirecta:

Los bioensayos se pueden realizar en el laboratorio bajo condiciones controladas o en el campo directamente en el medio natural.

Los bioensayos de laboratorio pueden ser mono o multiespecíficos. Los monoespecíficos son diseñados para obtener información acerca de los efectos de la calidad de agua sobre la supervivencia y aspectos de la estructura y dinámica de una población dada. Los multiespecíficos pueden ofrecer información sobre el impacto a nivel de una comunidad determinada.

Los bioensayos de campo consisten en la exposición de una o más poblaciones a la acción directa del cuerpo de agua, para ello se utilizan contenedores que permiten mantener la población en estudio en un espacio adecuado, sin afectar su relación con el medio. Estos proponen, principalmente, estudiar los efectos sobre comunidades o poblaciones, sin prestar atención a los mecanismos de acción de los contaminantes a nivel de los individuos en particular (Tortorelli & Hernández, 1995).

2.3.2 SELECCIÓN DE LOS ORGANISMOS PARA EL BIOENSAYO

Los bioensayos- tienen la ventaja de ser relativamente económicos y rápidos para establecer efectos letales o sub-letales que se analizan luego estadísticamente (George et al, 1991). Además, permiten establecer la responsabilidad de una sustancia tóxica en tales efectos, independientemente de otras posibles sustancias implicadas (Mason 1984). Sin embargo, la extrapolación de los resultados obtenidos en un bioensayo a situaciones reales puede originar confusiones, por lo que nunca remplazan las evaluaciones in situ pero si las complementan (Pinilla, 1998).

(Mason 1984) resume las características de que debe poseer un organismo para que sea adecuado en la ejecución de bioensayos esto se mantiene hasta la actualidad y se presenta en los siguientes puntos:

- El organismo debe ser sensible a las sustancias analizadas
- Debe pertenecer al ecosistema acuático que se está evaluando
- Su distribución debe ser amplia y su disponibilidad en cantidades suficientes
- Debe ser importante desde el punto de vista económico, recreativo o ecológico, tanto a nivel local como nacional.
- Debe poder cultivarse fácilmente en el laboratorio.
- Debe ser compatible con las técnicas de bioensayos.

Tabla. 6. Adaptabilidad de los organismos como especies para bioensayos (Henry, 1988).

Organismos para los bioensayos	Adaptabilidad del organismo		Comúnmente como un organismo para bioensayos.
	Cultivo de laboratorio	Recolección de campo.	
1. Algas	Excelente	Muy difícil de recolectar cultivo puro.	Si
2. Protozoos	Excelente	Muy difícil de recolectar cultivo puro.	Muy limitado
3. Invertebrados			
a. Planctónicos			
1. Rotíferos	Bueno	Muy difícil de recolectar cultivo puro.	Limitado
2. Cladóceros	Excelente	Alta tasa de mortalidad después de la recolección de campo.	Si
3. Copépodos	Mediano	Alta tasa de mortalidad después de la recolección de campo.	Limitado
4. Camarones	Bueno		Si
b. Bénticos			
1. Anélidos	Mediano	Mediano	Limitado
2. Insectos	Bajo	Mediano	Si
3. Moluscos	Bueno	Mediano	Si
4. Crustáceos	Bajo	Mediano	
5. Peces	Excelente	Alta tasa de mortalidad después de la recolección de campo.	Si

Tabla. 7. Criterios para la selección de pruebas biológicas en laboratorio para la evaluación toxicológica de sustancias químicas (Ramírez & Mendoza, 2008)

<i>Factibilidad</i>	Bajo costo Materiales y reactivos disponibles en la localidad Tiempo máximo de desarrollo, 5 días. Procedimiento de prueba simple Facilidad en la evaluación de la respuesta a medir.
<i>De los organismos</i>	Fácil obtención (cepario) Fácil mantenimiento Representatividad ecológica De un grupo funcional (productores primarios, herbívoros, carnívoros, descomponedores) De un grupo taxonómico (bacterias, peces, insectos, etc.) De una ruta de exposición (dérmica, ingestión, branquial, combinadas, etc.) Con información sobre su sensibilidad a compuestos tóxicos (base de datos) Estadio más sensible Respuesta relevante a los compuestos tóxicos Sensibilidad a bajas concentraciones Sensibilidad a una amplia variedad de compuestos tóxicos Sensibilidad no redundante con otras especies Con información sobre su biología
<i>De la prueba</i>	Condiciones presentes en los ecosistemas mexicanos (temperatura, salinidad, dureza, etc.) Concentraciones químicas reales (que se presenten en el medio ambiente) Técnicamente seguros y no contaminantes

	Posibilidad de ser estandarizada Buena exactitud y precisión analíticas Aplicación universal (usos, ventajas y limitaciones) Significado ecológico de los resultados Buenas prácticas de laboratorio Validación de la salud de los organismos de prueba Requerimientos mínimos de sobrevivencia /reproducción en pruebas y testigos Edades o etapas de vida requeridos al inicio de la prueba Comprobación de concentraciones nominales
--	--

Los organismos pequeños y de corto ciclo de vida son preferibles. Los invertebrados son más utilizados, pero los peces se usan a menudo por su importancia.(A, 1998).

En las investigaciones con microorganismos o en el medio acuático el toxico se puede añadir al medio de cultivo o al agua, en una concentración conocida (concentración nominal), provocando que el grupo de organismos reciba una dosis determinada de la sustancia objeto del estudio con el fin de observar un efecto determinado en ellos. En el diseño del experimento se deberán tener en cuenta los siguientes puntos (Gallego, 2003):

a) Selección y determinación de la condición de los organismos

Los organismos seleccionados para un bioensayo deben mantenerse en observación durante un periodo de tiempo determinado (*holding time*) que depende de la especie, con el fin de determinar su buena condición, comprobando que no han sido dañados durante el transporte ni por el cambio de condiciones ambientales. Si durante el tiempo de observación la mortalidad registrada es superior al 1%, el stock de organismos no es adecuado para la realización de los bioensayos. Se deben evitar cambios bruscos en las condiciones ambientales o dañar a los organismos durante su manipulación, ya que ambos factores pueden provocar el descarte de la población para posteriores experimentos.

b) Réplicas

Se deben realizar tres réplicas de cada tratamiento (dosis de tóxicos), lo que permitirá un tratamiento estadístico adecuado. El número de individuos por grupo

(por réplica) dependerá de las limitaciones impuestas por las características de los organismos a estudiar.

c) Reparto aleatorio de los organismos entre los grupos

Con el objeto de que las observaciones sean independientes es necesario preservar la aleatoriedad en el reparto de los organismos en los distintos grupos. Esto se puede conseguir fácilmente numerando los grupos (que se materializan de acuerdo a las características de la investigación) y generando números aleatorios con una calculadora, con un ordenador o, simplemente, sacando números de una urna que nos indica donde debemos situar cada organismo.

d) Determinación del efecto

En la mayoría de los casos se determinará la mortalidad o algún efecto sub-letal, dependiendo del objetivo del estudio.

2.3.3 TIPOS DE BIOENSAYOS

Los bioensayos utilizados en ecotoxicología acuática se clasifican, en función de su duración y del método que se emplea para añadir el toxico al agua, de la siguiente manera:

- **Test a corto plazo:** el periodo de tiempo oscila entre 48 y 96 horas y normalmente no se suministra comida a los organismos de experimentación; la gran ventaja de este tipo de bioensayos es la rapidez de los resultados.
- **Test a largo plazo:** se duración oscila entre 7 días y uno o varios meses; la ventaja que presenta frente a los anteriores es su mayor fiabilidad.
- **Test estático:** son bioensayos generalmente de corta duración en los que los organismos están durante todo el periodo de experimentación en el mismo medio.
- **Test de renovación o estático con renovación:** en este tipo de bioensayo y el medio se renueva periódicamente.
- **Test de flujo:** es el más sofisticado, ya que el medio se va renovando continuamente mediante sistemas de circulación y dosificación automática.

Para valorar la capacidad de *bioconcentración* que posee un compuesto se utiliza el **Factor de Bioconcentración (BFC)**, que se define como el cociente entre la concentración del

compuesto en un organismo determinado (C_0) y su concentración en el agua (C_a), en condiciones de equilibrio:

$$BCF = \frac{C_0}{C_a}$$

Este parámetro toxicológico es de primera importancia en los estudios sobre la peligrosidad de un determinado compuesto para la vida. Puede determinarse experimentalmente mediante ensayos largos, caros y asumen que la cinética de las reacciones de entrada y de las reacciones de depuración de varios compuestos, para peces, responden en las etapas iniciales a cinéticas de segundo orden. Dicho factor también puede deducirse a partir de algunas propiedades del compuesto químico en cuestión, tales como coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) y solubilidad en agua (S_w).

Diferentes organismos internacionales como la OECD, la ASTM o la USEPA han emitido una serie de recomendaciones para la realización de este tipo de ensayos con el fin de conseguir que los resultados de estos sean comparables, es decir, una estandarización de los parámetros que se obtenga (Burnison, 1998). Esta es una tarea ardua debido a la complejidad de los ensayos como consecuencia de las variables que intervienen. En general, las recomendaciones van encaminadas a la definición inequívoca de los diferentes parámetros toxicocinéticos y a evitar determinaciones erróneas de estos como consecuencia del amplio rango de diferentes propiedades físico-químicas que presentan los contaminantes (solubilidades, polaridades), y el uso de *carriers* o vehículos para la disolución en el medio acuático de compuestos poco solubles.

2.3.4 USO DE MICROALGAS EN BIOENSAYOS

El uso de bioensayos con microalgas en estudios de contaminación acuática comenzó con las evaluaciones de eutrofización eutroficación por nutrientes. La implementación del ensayo in vitro usando la microalga verde *Selenastrum capricornutum* en la década de 1960 sentó las bases para el desarrollo posterior de las técnicas de bioensayos de toxicidad en microalgas (revisado por Nyholm y Peterson 1997). El bioensayo de toxicidad con microalgas más utilizado es la determinación de la inhibición de crecimiento bajo exposición a algún contaminante en un cultivo estático durante 72-96 horas. Esta técnica se lleva a cabo bajo iluminación continua y en general, manteniendo el cultivo en movimiento (agitación o aireación) para el equilibrio de CO₂. Para la estimación de crecimiento o biomasa, se mide diferentes variables, como son la densidad de células (con microscopio o contador de partículas), la cantidad de clorofila (con métodos de extracción), la densidad óptica (usando espectrofotómetros), la fluorescencia in vivo (mediante fluorímetros), y también la fotosíntesis (basada en la asimilación de ¹⁴C). Es importante considerar que las diferentes respuestas de las microalgas dependen de su sensibilidad a los contaminantes, y además de la condición fisiológica del cultivo que puede afectar el tamaño celular o la cantidad de clorofila por célula (Nyholm y Peterson 1997). Un aspecto importante es que las especies utilizadas en bioensayos deben ser de fácil cultivo en laboratorio, y se han usado especies de un amplio rango taxonómico tanto de agua dulce como marinas. Entre las especies más utilizadas se puede mencionar al alga verde de agua dulce *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente *Selenastrum capricornutum*), y que está incluida dentro de las especies recomendadas en los protocolos definidos por varias instituciones de estandarización (ej. ISO, OECD, INN Chile). (Huovinen & Gómez, 2017)

Dentro de las ventajas del uso de microalgas en bioensayos de toxicidad se encuentra la sensibilidad relativa de estos organismos a contaminantes, se consideran costo-efectivos, son en general más fáciles de mantener en condiciones experimentales de laboratorio comparado a animales, lo que evita también conflictos bioéticos por el uso de animales en bioensayos. Debido a su rápido ciclo de división celular, las respuestas de toxicidad aguda pueden ocurrir dentro de pocas horas de exposición, y las respuestas subletales de toxicidad crónica se puede medir también dentro de un periodo bastante corto (días). Las respuestas de las microalgas representan a una población y no sólo a células individuales, lo que permite inferir las respuestas de diferentes generaciones. Como desafíos prácticos se puede mencionar la selección de medio de cultivo idóneo para cada especie y

contaminante, el agotamiento de los nutrientes y el aumento del pH durante el bioensayo en el cultivo a medida que aumenta la biomasa, etc. Las características de medio de cultivo, por ejemplo, el pH o la concentración de sustancias quelantes, pueden afectar la toxicidad de ciertas sustancias químicas, tales como los metales pesados (Nyholm y Peterson 1997). (Huovinen & Gómez, 2017)

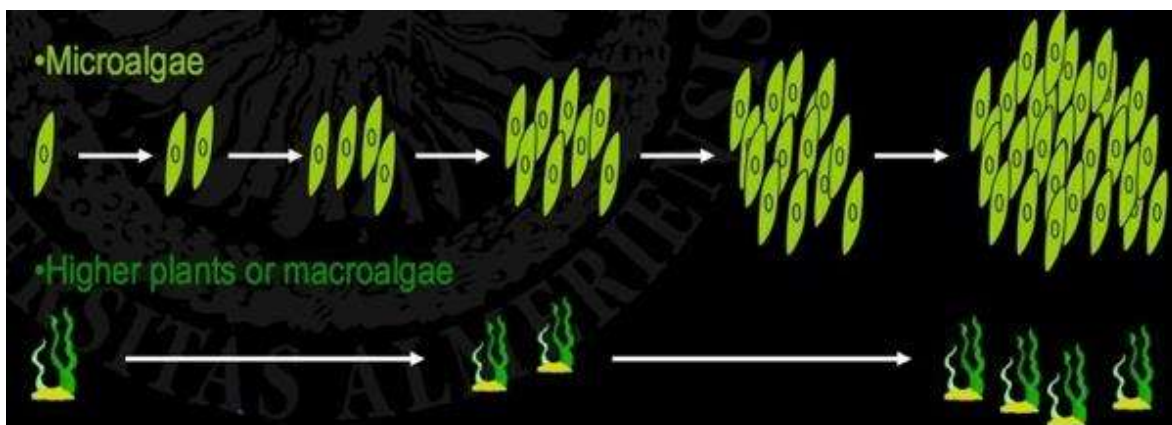


Fig. 9 Comparación de la capacidad de generación de biomasa microalgal. Estas pueden duplicarse mucho más de 2 o 3 veces más rápidamente que las plantas superiores. (Fernández, 2014)

2.4 BIOINDICADORES

Aunque la medición de variables fisicoquímicas es una buena herramienta de evaluación de la calidad del agua, analiza básicamente los efectos de la contaminación a corto plazo. Por esta razón los métodos biológicos se han venido desarrollando desde la década de los cincuenta con herramientas que evalúan las respuestas que ofrecen plantas y animales a la contaminación. Se ha encontrado que estos organismos indicadores determinan los efectos de los impactos en el ecosistema acuático a través de un tiempo más prolongado (Vásquez et al., 2006). En sentido general, todo organismo es indicador de las condiciones del medio en el cual se desarrolla, ya que de cualquier forma su existencia en un espacio y momento determinados responde a su capacidad de adaptarse a los distintos factores ambientales. Sin embargo, en términos más estrictos, un indicador biológico acuático se ha considerado como aquel cuya presencia y abundancia señala algún proceso o estado del sistema en el cual habita, en especial si tales fenómenos constituyen un problema del manejo del recurso hídrico (Pinilla, 2000). Los indicadores biológicos se han asociado directamente con la calidad del agua (Mason, 1984) más que con procesos ecológicos o con su distribución geográfica, sin que ello impida utilizarlos en tales circunstancias. Odum (1972) define un organismo indicador como una especie en particular cuya presencia demuestra la existencia de ciertas condiciones en el medio, mientras que su ausencia es la consecuencia de la alteración de tales condiciones. Es de aclarar que más que a un organismo, el indicador biológico se refiere a la población de individuos de la especie indicadora y, en el menor de los casos, al conjunto de especies que conforman una comunidad indicadora (Pinilla 2000). Entre los indicadores biológicos comúnmente utilizados en la clasificación de los lagos de zonas templadas se destacan los representantes del fitoplancton. En dicha región, estos organismos están fuertemente ligados a las condiciones ambientales reinantes en cada tipo de lago. De esta forma, en lagos oligotróficos predominan las Crisofíceas, Dinofíceas y Bacilariofíceas; mientras que en los eutróficos se presentan las Cianofíceas, Clorofíceas y Euglenofíceas (Roldan, 2008). Para los lagos tropicales, se ha observado en muchos casos que los diferentes grupos de algas se distribuyen independientemente de las condiciones tróficas de estos ambientes (Esteves, 1988 - 1998). Por eso, es necesario profundizar en este campo, para establecer indicadores claros de estado trófico, con base en los principios ya establecidos para regiones templadas (Roldan, 2008). Es importante en el uso de bioindicadores tener en cuenta que actualmente no se ha encontrado un grupo que pueda considerarse como

indicador universal, debido a que todos los ambientes son distintos, incluso dentro de un mismo ecosistema, y en muchos casos se podrán encontrar organismos indicadores que serán específicos de algún tipo de evento. Igualmente, debido a que el conocimiento en el campo de la evaluación del estado de los ecosistemas aun es escaso, no existe una formula general para determinar el estado de un ecosistema (Jorgesen et al., 2005).

2.4.1 BIOINDICADORES PLANCTÓNICOS

El fitoplancton constituye el conjunto de microorganismos fotosintéticos adaptados a vivir parcial o continuamente en la columna de agua, que utilizan la radiación solar como fuente de energía para la síntesis de materia orgánica (fotoautotróficos), y que están habilitados para desarrollar todo su ciclo vital suspendidos en las aguas abiertas de los sistemas lénticos (Reynolds, 2006. Tomado de Pulido 2015). El fitoplancton de agua dulce incluye especímenes tanto de algas como de bacteria. De éstos, los más representativos son las algas, pero no debe subestimarse ni la contribución del bacterioplancton al funcionamiento del ecosistema acuático (Ramírez, 2000). El fitoplancton, tiene fundamental importancia por integrar la base de las tramas tróficas acuáticas. Las algas del fitoplancton, en general, no tienen capacidad de movimiento, pero algunas poseen cierta capacidad de locomoción, desplazándose mediante flagelos y otros mecanismos. La coexistencia simultánea de numerosas poblaciones de especies en un mismo hábitat es una de las principales propiedades de las comunidades fitoplanctónicas. Algunas de estas especies presentan en determinados momentos una dominancia mayor, otras una intermedia y una gran porción son especies raras (Ramírez, 2000). Otra característica especial del fitoplancton es la capacidad de mantenerse en suspensión con el fin de permanecer dentro de la zona fótica, desarrollando adaptaciones como las vacuolas de gas, el almacenamiento de lípidos, regulación de iones, la resistencia morfológica, entre otras (Ramírez, 2000).

2.4.2 MICROALGA *SCENEDESMUS INTERMEDIUS* BIOLOGÍA ECOLOGIA MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDAS

Scenedesmus es una clorofita de organización cenobial cosmopolita comun en aguas dulces y contaminadas por drenaje doméstico. Este género, originalmente descrito como *Achnanthes*, se conoce desde hace más de 150 años; las formas más comunes son cenobios de cuatro células, con una sola espina. Estas algas verdes son autoesporicas caracterizadas por ser lisas o coenobia curvada, fueron descritos por Meyen (1829) como *Scenedesmus* (Akgül, 2017)

Siguiendo los lineamientos taxonómicos tradicionales, los primeros intentos de clasificación de este género se basaron en caracteres morfológicos, como la forma y número de células y la presencia y disposición de espinas (Smith G; 1996, en Trainor, et al 1976).

Habiéndose basado su clasificación en características estructurales las clorofitas cenobiales con cuatro células en disposición lineal han sido agrupadas en el género *Scenedesmus*, dentro de la familia Scenedemaceae. Por otra parte, las clorofitas unicelulares con dos espinas en cada polo se han clasificado dentro del género *Chodatella*. Ahora, se sabe que en ciertos casos el cenobio y los organismos unicelulares son etapas distintas del ciclo de vida del mismo organismo, y que se presentan en diferentes condiciones ambientales (Swale, E; 1997 en Trainor et al; 1976).

Las algas del género *Scenedesmus* presenta células de forma elipsoidal, fusiforme o, con menor frecuencia, esférica. Se dispone de forma que sus ejes queden paralelos entre sí, congregándose en colonias planas o cenobios en múltiplos de dos, siendo las de cuatro y ocho células los más comunes. Las especies se diferencian por la presencia, tipo y número de espinas, así como la textura de la pared celular. Las células son uninucleadas tienen un único laminoploroplasto que constituye la mayor parte del volumen celular, de tipo laminado o parietal. La pared celular contiene principalmene celulosa, pecina y esporopelenina (politerpenos derivados de carotenoides), lo que le confiere una resistencia extrema. De acuerdo al medio de crecimiento, la morfología de la colonia varía de forma considerable, por lo que no se considera un carácter taxonómico (Bourrelly, 1972; Trainor, 1998; Lee, 2008).

El modo más común de reproducción de *Scenedemus* (zoosporas) es un fenómeno muy raro en la naturaleza y solo se puede observar en condiciones de estrés como la privación

de nitrógeno. Como todo el género *Scenedesmus* tiene clorofila a y b como pigmentos fotosintéticos y forman almidón dentro del cloroplasto. El *Chlorophyta* difiere así del resto de las algas eucarióticas en la formación del producto de almacenamiento en el cloroplasto en lugar del citoplasma.

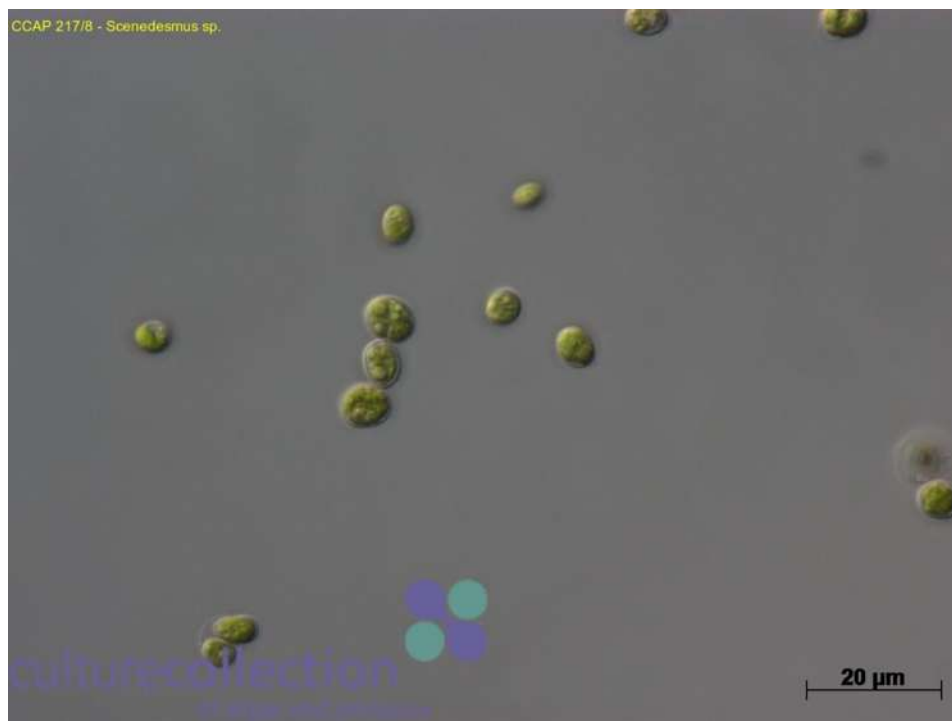


Fig. 10 Fotografía microscópica (2000X) de la microalga *Scenedesmus* sp. fuente CCAP 217/8

Fotosíntesis:

La capacidad de las algas de convertir la energía luminosa en energía química es un cambio evolutivo importante (Berg et al. 2002). Componentes como la ubiquinona y citocromo oxidoreductasa están tanto en los sistemas respiratorios como en la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis. Este proceso metabólico de las plantas es una de las actividades más importantes de la célula vegetal y tiene una gran incidencia en la estructura trófica de los ecosistemas, especialmente los acuáticos marinos.

Es por eso que al penetrar la luz en el océano cambia su cantidad y también su calidad (Lobban & Harrison 1994). El agua absorbe la radiación roja e infrarroja en los primeros metros, por lo que muchas algas deben estar adaptadas a capturar esa luz, como complemento de la luz capturada con menores longitudes de onda. En las algas hay 3

clases de pigmentos encargados de capturar la luz para la fotosíntesis: clorofilas, ficobiliproteínas y carotenoides. En las algas se encuentran 4 clases de clorofilas, además de la clorofila a. En las Chlorophytas además se encuentra la clorofila b, absorbiendo con máximos en los 470 y 650 nm (Luning 1990).

La fotosíntesis es el principal proceso vinculado con la producción de biomasa en los vegetales, y su medición puede ser considerada representativa de tal proceso (Israel 1995).

Durante la fotosíntesis se produce liberación de oxígeno en una proporción cercana a la unidad del índice fotosintético, que expresa el número de moles de CO₂ fijados/número de moles de O₂ liberado. Midiendo la tasa de liberación de oxígeno en un alga es posible obtener la tasa de fijación de carbono, y estimar su productividad en condiciones determinadas de crecimiento. La evolución de la concentración de oxígeno disuelto en botellas claras (producción neta) y oscuras (respiración).

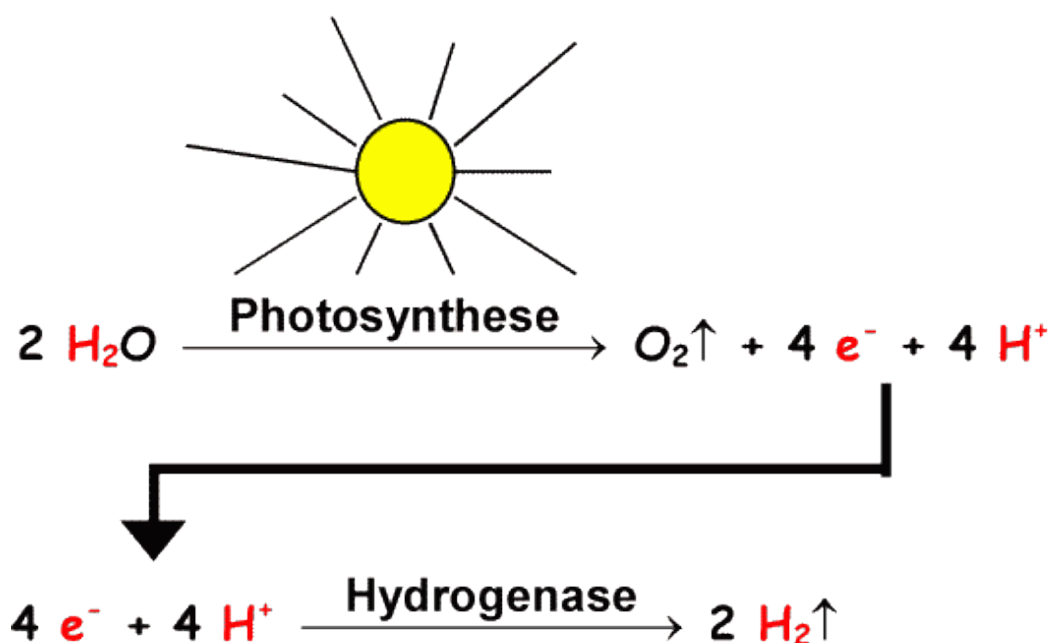


Fig. 11 Proceso de fotosíntesis (producción de hidrogeno) (Wünschiers R. 2002)

La clasificación taxonómica de *Scenedesmus Intermedius* se ubica de la siguiente forma («*Scenedesmus intermedius* Chodat :: Algaebase», s. f.): s

- Imperio: Eukaryota
 - Reino: Plantae
 - Subkingdom: Viriplantae

- Infrakingdom: Chlorophyta
 - Phylum: Chlorophyta
 - Subphylyum: Chlorophytina
 - Clase: Chorophyceae
 - Orden: Sphaeropleales.
 - Familia: Scenedesmaceae
 - Subfamilia: Scenedesmaceae
 - Género: Scenedesmus

El género *Scenedesmus intermedius* está compuesto de algas coloniales de amplia distribución, encontrándose tanto en ambientes naturales como en artificiales. Son organismos que rara vez se presentan como dominantes en ambientes oligotróficos; sin embargo, en cuerpos acuáticos en proceso de eutrofización o altamente eutrofizados, *Scenedesmus* constituye el género dominante, exhibiendo una gran plasticidad fenotípica conforme el organismo se adapta a las condiciones ambientales (Trainor, 1998).

Scenedesmus intermedius presenta colonias de 2 a 8 células (coenobio de 4 células siendo el más común), dispuestas en una sola fila lineal, o levemente alternas, células con forma ovoide con ápices ampliamente redondeados, 2-8 μm de ancho, 5-17.5 μm de largo; Células marginales con una sola espina larga en cada ápice, curvadas o rectas, o solo en un ápice y diagonalmente simétricas, células internas sin espinas, paredes celulares lisas, pero a veces con filas o verrugas, discontinuas, dispuestas irregularmente en los ápices. (William et al 1982)



Fig. 12 Fotografía microscópica(1000X) *Scenedesmus Intermedius* colonia de 4 células. Fotografía por Stream Algae of California

Scenedesmus resiste muy bien la contaminación y por este motivo se emplea en algunas plantas depuradoras, si se desarrolla masivamente puede proporcionar el oxígeno que necesitan las bacterias descomponedoras que viven en el agua y así acelerar el proceso de depuración. Esta forma de resistencia puede estar formada por células vegetativas o como parte del ciclo de la vida sexual.

Los elementos químicos que influyen directamente sobre la morfología de las clorofitas en cultivos son varios, e incluyen el hierro, calcio, sodio, magnesio, nitrógeno y fósforo, además de ciertos compuestos orgánicos y el extracto de suelo. Los efectos más notorios sobre la morfología de *Scenedesmus* se producen con el nitrógeno y el fósforo, que son los elementos utilizados en mayor exceso en los medios de cultivo. El nitrógeno se usa a altas concentraciones para acelerar el crecimiento, mientras que el fósforo, en forma de fosfato, se utiliza para amortiguar el pH del medio. La respuesta a estas concentraciones elevadas de nutrientes consiste en acelerar la formación de gametos; además de los efectos son relacionados directamente con la reproducción, que son los más variados especialmente en *Scenedesmus*.

Las colonias de *Scenedesmus*, así como otras formas coloniales del orden de las *Chlorococcales* (nombre anterior de las *Sphaeropleales*), carecen de división celular vegetativa. El crecimiento de una colonia no se produce con la división ni adición de individuos, sino que unas de las células de la colonia experimentan de una a cuatro divisiones del protoplasto, las cuales se reagrupan para formar una colonia hija o *autocolonia* (fig.13). este tipo de reproducción se encuentra también en organismos como *Pediastrum* y *Volvox* (Trainor, 1998).

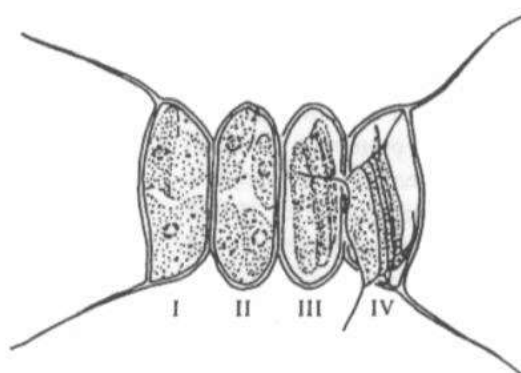


Fig. 13 Formación de autocolonias en *Scenedesmus*. Los números romanos indican las secuencias de las divisiones (Trainor, 1998).

En condiciones de temperatura baja, escasez de nitrógeno y densidad celular elevada, *Scenedesmus* pone en marcha un ciclo reproductivo sexual haploide, caracterizado por la formación de isogametos biflagelados, carentes de pared celular y de vida muy corta. La unión de los isogametos dará origen a una zoospora tetraflagelada y luego una zigospora de gran tamaño que liberará células individuales haploides, que formaran posteriormente cenobios. (Fig. 14)

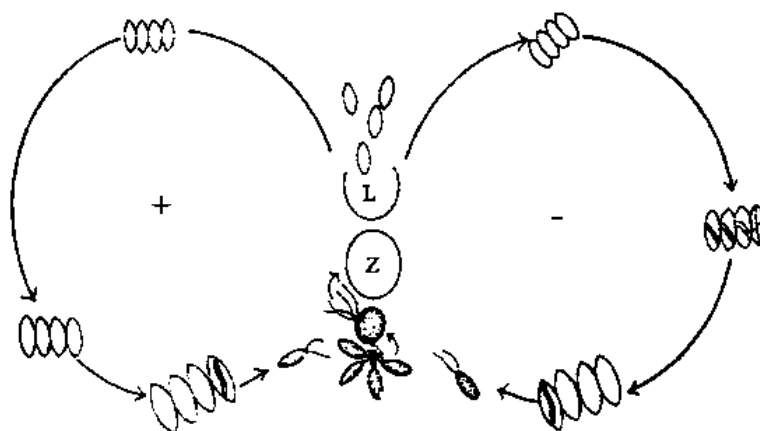


Fig. 14 ciclo reproductivo sexual de *Scenedesmus*. Z representa la formación de la zigoespora y L la liberación de células haploides (Trainnor, 1998).

3. HIPOTESIS

La presencia de metales (Cd y Cr) y su interacción binaria en ecosistemas acuáticos marinos generan respuestas tóxicas a corto plazo sobre el bioindicador fitoplanctónico *Scenedesmus intermedius*

4. JUSTIFICACIÓN

Incalculables cantidades de sustancias contaminantes de origen natural o antropogénico convergen en los ecosistemas acuáticos entrando en contacto con los organismos vivos, siendo los metales pesados de los más problemáticos debido a que no son degradables y tienden a la bioconcentración y bioacumulación, logrando llegar incluso a producir problemas de biomagnificación. Por ello la aportación de datos para mejorar la evaluación de la ecotoxicidad acuática está incluido en el IPCS (Programa Internacional De Seguridad de las Sustancias Químicas). Otro aspecto importante a tener en cuenta es que, en la actualidad, la bioética fomenta los estudios *in vitro* y con especies no mamíferas, de esta manera usando especies fitoplanctónicas como bioindicadores, por ejemplo, *Scenedesmus intermedius*, se ajustan a las nuevas demandas en la investigación. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 los límites permitidos de Cadmio son 0.005 mg L⁻¹ y de Cromo 0.05 mg L⁻¹, mientras que la EPA maneja como valor máximo en Cr de 0.1 mg L⁻¹ y de cadmio en 5ppb en agua. El desarrollo del presente trabajo tiene como propósito establecer una metodología básica y sencilla para evaluar el riesgo medioambiental, provocado por la presencia de cadmio y cromo que puede estar presente en los vertidos y efluentes provenientes de la contaminación antropogénica de aguas, utilizando como bioindicador la microalga *Scenedesmus intermedius*. Los organismos fitoplanctónicos ocupan una posición central en las cadenas tróficas, debido a sus numerosas propiedades, entre las que se pueden mencionar ciclos de vida cortos, tamaño pequeño y facilidad de cultivo. La obtención de datos a través de bioensayos que valoran la inhibición de crecimiento en microalgas con estos metales, cadmio (Cd) y cromo (Cr) es de gran utilidad ya que ayudara a contribuir en la información del efecto eco-toxicológico causado por estos metales impactando positivamente en la normatividad.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Valorar el impacto tóxico agudo que supone la presencia de los compuestos metálicos cloruro de cadmio y dicromato de potasio sobre la microalga *Scendesmus intermedius*.

5.2 OBJETIVO ESPECIFICOS

- Determinar la Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) del cloruro de cadmio a las 96 h de exposición sobre la microalga *Scendesmus intermedius*.
- Determinar la Inhibición de Crecimiento 50 (IC_{50}) del dicromato de potasio a las 96 h de exposición sobre la microalga *Scendesmus intermedius*.
- Señalar la concentración más alta a la cual no se observa efecto a las 96 h (96 h-NOEC) del cloruro de cadmio y dicromato de potasio sobre la microalga *Scendesmus intermedius*.
- Comparar los resultados obtenidos de ambos compuestos metálicos mediante la concentración inhibitoria IC_{50} obtenidas *Scendesmus intermedius*.
- Determinar tanto individualmente como en su mezcla su posible efecto sinérgico o antagónico de los compuestos metálicos.

6. MATERIAL Y METADOS

6.1 COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

Sustancia testada

Las sustancias de ensayo utilizadas fueron cloruro de cadmio (CdCl_2) y dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (-Sigma- Aldrich-). Se realiza dilución del agente en agua destilada para la obtención de concentraciones crecientes 1-100mg L^{-1} .

La preparación de los compuestos químicos utilizado se realizó a partir de 10 mg de cloruro de Cadmio y dicromato de potasio de la marca Sigma-Aldrich los cuales se disolvieron en 1000 μL de agua bidestilada (J.T. BAKER). Para obtener las diferentes concentraciones exponenciales para cada uno de los compuestos siendo las de el cloruro de cadmio de 0.15 mg L^{-1} , 0.25 mg L^{-1} , 0.75 mg L^{-1} , 1.25 mg L^{-1} , 2.0 mg L^{-1} y las del dicromato de potasio 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 25 mg L^{-1} , 50 mg L^{-1} .

6.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El alga verde *Scenedesmus intermedius* (Si), se mantiene en cultivo axénico a 21 °C y periodo de luz-oscuridad 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).

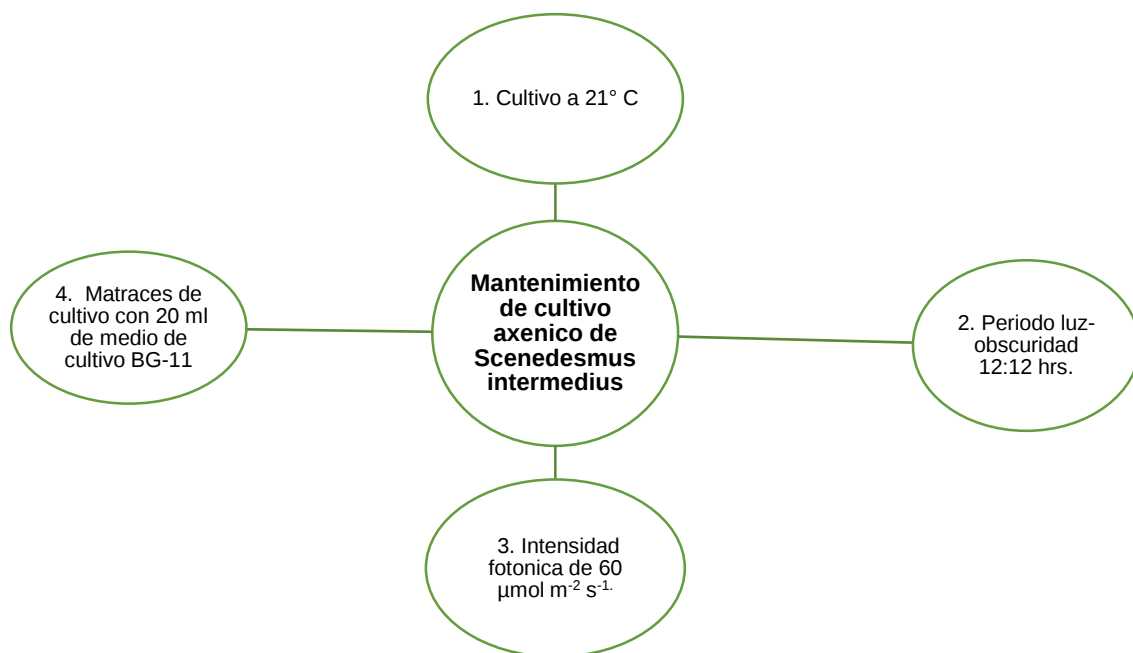


Diagrama. 1 Mantenimiento de cultivo de *Scenedesmus Intermedius*.

6.1.2 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE TASA DE CRECIMIENTO

Los bioensayos fueron realizados para la determinación del efecto inhibitorio de crecimiento 50 (IC₅₀) 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 8 días.

Para estudiar el efecto inhibitorio se utilizan tubos de doble cierre estériles y de poliestireno (Sarstedt, AG & Co. Germany) se estableciendo 8 réplicas por cada concentración ensayada y un control sin xenobiótico.

Inicialmente, en cada tubo se incluye una concentración de 10^5 cel ml⁻¹ en volumen total de 10 ml. Las células se obtienen de cultivos madre, y la concentración se ajusta por recuento sobre cámara de Neubauer (BlauBrand, GmbH + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany). Los sets son expuestos a las concentraciones crecientes del xenobiótico. Tubos control y tubos expuestos al tóxico son mantenidos durante todo el ensayo a 21°C e iluminación en ciclo 12:12 de luz-oscuridad. A tiempos 0, 24, 48, 72 y 96h (4d) se mide la biomasa celular en cámara de Neubauer.

6.1.3 ANÁLISIS DE DATOS

Cada ensayo se repite ocho veces ($n=8$), y a través de una curva de dosis-respuesta por regresión no lineal y regresión lineal, se obtuvieron la media y desviación estándar, considerando un grado de significación $p<0.05$.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL CLORURO DE CADMIO Y DICROMATO DE POTASIO SOBRE LA MICROALGA DE *SCENEDESMUS INTERMEDIUS*

La metodología para la determinación de las concentraciones de inhibición de crecimiento 50 (IC_{50}) consiste en la determinación de la concentración que causa la inhibición del 50% de la microalga *S. Intermedius* en 96 h sobre un cultivo celular en tubos de doble cierre estériles y de poliestireno (Sarstedt, AG & Co. Germany). Primero se selecciona el cultivo axénico descrito en el diagrama 1; del cual se extraerá una concentración de 10^5 cel ml^{-1} de *S. Intermedius* que se agregará a cada uno de los tubos de doble cierre a los cuales serán expuestos a las diferentes concentraciones del cloruro de cadmio y dicromato de potasio respectivamente, obteniendo un volumen total de 6ml (6000 μL). Para cada concentración del compuesto químico se estableció un control y 8 repeticiones con un número de 10 ensayos, posteriormente se incubaron los tubos a 21 °C por 96 h manteniéndolas con un periodo de luz-obscuridad de 12:12. Finalmente transcurridas las 96 h de exposición se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento, el cual se realizó sobre cámara de Neubauer (BlauBrand, GmbH + CO KG, Germany) en microscopio óptico (Zeiss, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) contabilizando el número de células por cuadrante para obtener la concentración total de células mediante la fórmula (Diagrama 2).

$$concentración\ celular = \frac{(\# \text{ células})(1000)(factor\ de\ dilución)}{\#total\ de\ cuadrantes}$$



Diagrama. 2 Metodología para la determinación de las concentraciones inhibitorias de crecimiento del cloruro de cadmio y dicromato de potasio.

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de los valores CI_{50} y NOEC sobre *S.intermedius* fueron obtenidos por los métodos de regresión no lineal y regresión lineal a través de una relación concentración-respuesta calculando los logaritmos de las concentraciones finales, (% inhibición vs Log concentración)

Mediante estos métodos se obtuvieron las concentraciones de CI_{50} con sus límites de confianza de 95%; para posteriormente realizar una gráfica de CI_{50} (inhibición vs concentración) para las 96 h.

Aplicando el teorema de Tchebysheff para expresar la respuesta de inhibición de cada una de las concentraciones, el cual nos indica que:

$$\mu \pm k\sigma$$

Donde:

μ = Media

k = Es un constante que puede tomar cualquier valor mayor a 1 (en este caso se trabajó con un valor de 2, que fue tomado de acuerdo a la regla empírica para distribución normal la cual nos dice que aproximadamente el 95% de los valores caerán dentro de dos desviaciones estándar a la medida de cada una de las concentraciones).

σ = Desviación estándar

La prueba de distribución normal de los datos se realiza a través de la prueba D'Agostino y Pearson. Para determinar las diferencias estadísticas entre cada valor de Cl_{50} a 96 hrs. fue realizado a través de la comparación múltiple por t-student utilizando un intervalo de confianza de $p < 0.05$ (95%) por el test de normalidad de D'Agostino & Pearson.

Los cálculos estadísticos son realizados por el paquete estadístico Graphpad Prism v7.0 (Graph-Pad Software Inc., USA). La determinación del efecto de las combinaciones de los productos químicos 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 desarrollado por (Chou & Martin, 2005, 2010).

6.4 DETERMINACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO, ADITIVO O ANTAGÓNICO DEL CLORURO DE CADMIO Y DICROMATO DE POTASIO SOBRE LA MICROALGA DE *SCENEDESMUS INTERMEDIUS*

La determinación del efecto sinérgico, aditivo o antagónico que puedan presentar distintas las combinaciones de cloruro de cadmio y dicromato potásico se realizó a través de sus IC_{50} sobre *Scenedesmus intermedius* basándonos en la metodología descrita por Chou & Talalay (1984) a través de una evaluación cuantitativa en la combinación de las dos sustancias de acuerdo a la potencia de cada producto; Así si dos xenobióticos que presentan mecanismos de acción similares o son mutuamente excluyentes se presentan en un Índice de Combinación $IC < 1$ muestran un efecto sinérgico, pero si por el contrario dos xenobióticos 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 (Chou & Talalay, 1984).

7. RESULTADOS

El análisis de la toxicidad aguda a las 96 horas de exposición de los compuestos metálicos cloruro de cadmio y dicromato de potasio sobre cultivos de microalgas *Scenedesmus Intermedius* por medio de la determinación del índice de inhibición de crecimiento (CI_{50}) de cada compuesto ensayado tanto en su forma individual como en mezcla, expresó los siguientes resultados:

7.1 RESPUESTA INDIVIDUAL DEL CLORURO DE CADMIO Y EL DICROMATO DE POTASIO

Para el cloruro de cadmio se encontró una toxicidad con respecto a su repuesta de CI_{50} (96 h) de 0.522 mg L^{-1} , mientras que para el dicromato de potasio fue de 6.64 mg L^{-1} siendo más elevada la concentración para provocar la inhibición del 50% del crecimiento en la población evaluada, presentando una toxicidad a corto plazo relativamente alta, mientras que el cloruro de cadmio la toxicidad aguda es más elevada a más baja concentraciones. En la Tabla 8 se muestran los valores de la 95 h-NOEC, la CI_{50} a 96 h de cada compuesto respetivamente con sus límites de confianza del 95%.

Acorde a la clasificación propuesta por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) para categorizar a las sustancias o contaminantes en ambientes acuáticos para toxicidad aguda (CI en mg L^{-1}), la categoría o clase I corresponde a una $CI_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$ y a ella corresponde la clasificación de todas las sustancias muy tóxicas para el ambiente acuático, en la categoría II la CI_{50} corresponde a $1-10 \text{ mg L}^{-1}$ y engloba a las sustancias tóxicas para el ambiente acuático, en la categoría III con una CI_{50} $10-100 \text{ mg L}^{-1}$ estarían las sustancias peligrosas para el ambiente acuático y por último en la categoría IV con una $CI_{50} \geq 100 \text{ mg L}^{-1}$ identificaríamos a las sustancias que no se consideran tóxicas (Cortés, 2012; Sánchez-Fortún & Barahona, 2002).

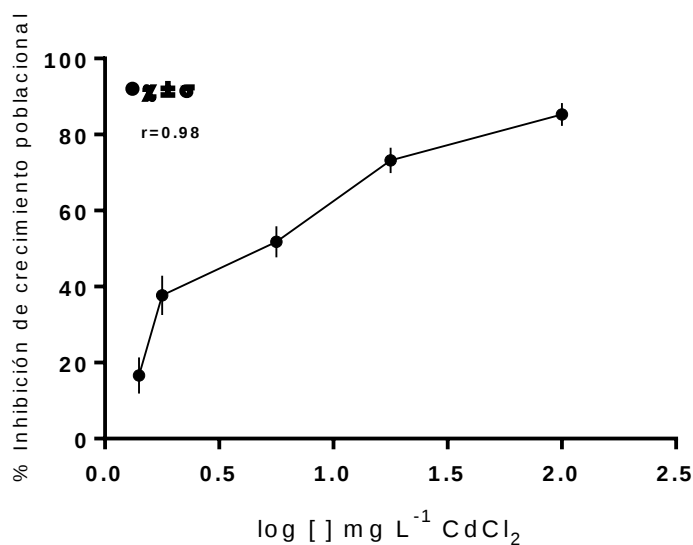
Atendiendo a lo anterior, se determinó que el dicromato de potasio cuando se expone a la microalga *Scenedesmus intermedius* se encontraría en la categoría II, es decir, se comportaría como una sustancia tóxica para el ambiente acuático, mientras que el cloruro de cadmio se clasificaría en la categoría I determinándolo como una sustancia muy tóxica para el ambiente acuático.

Tabla 8. Índices de toxicidad (CI_{50} y 96 h-NOEC) de ambos compuestos metálicos expuestos en forma individual sobre *S. Intermedius*.

Índices de toxicidad	$CdCl_2$ en $mg\ L^{-1}$ (L.C al 95%)	$K_2Cr_2O_7$ en $mg\ L^{-1}$ (L.C al 95%)
96 h- NOEC	0.696 (0.021 – 0.128)	0.799 (0.68-0.993)
CI_{50} (96h)	0.522 (0.3609 - 0.7324)	6.64 (5.50-7.99)
r	0.98	0.96

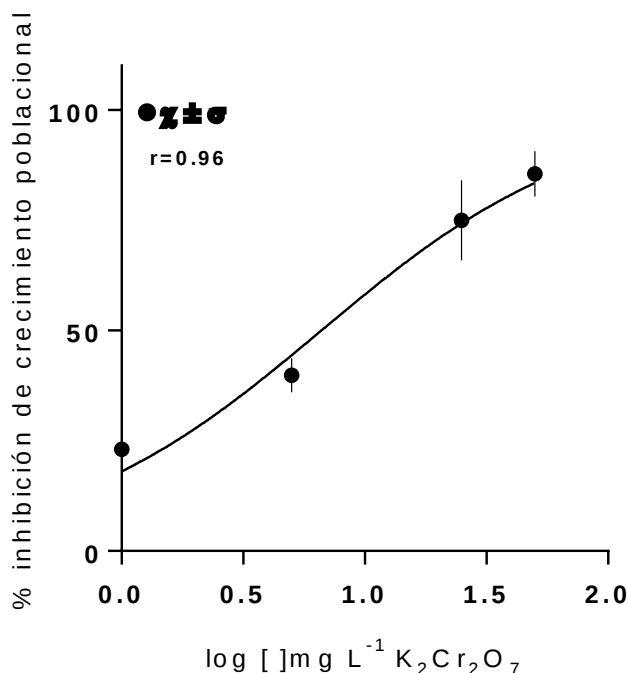
En el Gráfico 2 se muestra la recta correspondiente de la relación concentración-respuesta lineal a 96 h del cloruro de cadmio sobre *S.intermedius*, el valor del coeficiente de variación (r^2) nos indica que existe una fuerte correlación entre la concentración y la letalidad del cloruro de cadmio: a medida que aumenta la concentración es mayor su letalidad.

De la misma manera se comporta el dicromato de potasio, como se muestra en la recta del Grafico 3.



Grafica. 2

Relación concentración-respuesta del $CdCl_2$ sobre *S. intermedius* a las 96 h. Cada punto (●) representa la media $\pm$ su desviación estándar ($\mu \pm \sigma$).

**Grafica. 3**

Relación concentración-respuesta lineal del $K_2Cr_2O_7$ sobre *S. intermedius* a las 96 h.

Cada punto (●) representa la media $\pm$ su desviación estándar ($\mu \pm \sigma$).

7.1 RESPUESTA EN MEZCLA DEL CLORURO DE CADMIO Y EL DICROMATO DE POTASIO

En la mezcla del cloruro de cadmio y el dicromato de potasio se obtuvo una respuesta antagónica principalmente, al ver la fracción afectada que es la respuesta de inhibición de crecimiento en mezcla de los dos compuestos metálicos, el valor de IC50% es de 2.13 es una respuesta antagónica bloqueándose la acción tóxica y eso mismo se observa con el DRI que sería el valor de la CI50(96h) de ambos, no obstante, al IC95% la respuesta se potencia al sinergismo y por tanto los valores de DRI incrementan. Esto es debido a que el $IC > 1$ lo que nos indica un antagonismo por parte de los compuestos, pero a medida que incrementa la respuesta de inhibición el $IC < 1$ lo que nos indica un sinergismo. Ver en Tabla 10.

Tabla 9. Índice de combinación e índice de reducción de dosis (DRI) en mezcla de ambos metales experimental.

%Fa (respuesta)	IC	DRI CdCl_2^{+2}	DRI $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
10	5.19	0.78	0.25
25	3.55	0.80	0.43
50	2.13	0.98	0.88
75	1.81	0.92	1.36
95	0.52	2.44	8.50

Mientras que al analizar los valores de forma no experimental obtenemos una variación en los resultados obtenidos debido a que con respecto a los valores de forma individual en $\text{CI}_{50}(96)$ se obtuvo una respuesta sinérgica en la NOEC de la mezcla binaria ($\text{IC}_{0\%} = 0.69$), no obstante, para la $\text{CI}_{50}(96)$ de ambos es aditiva ($\text{IC}_{50\%} = 1.038$), manteniéndose esta respuesta incluso hasta el 95% de inhibición de la mezcla de ambos.

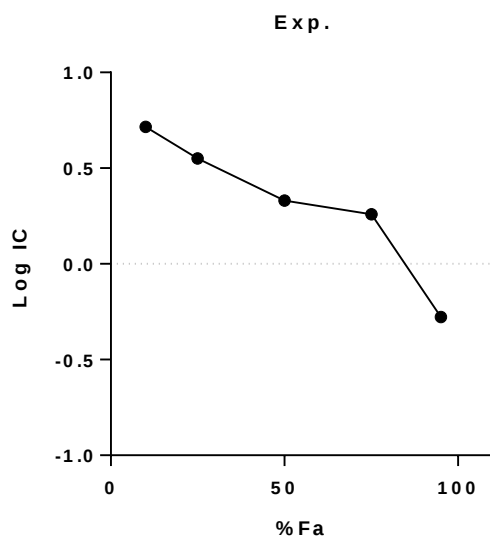
Tabla 10. Índice de combinación e índice de reducción de dosis (DRI) en mezcla de ambos metales No experimental.

%Fa (respuesta)	IC	DRI CdCl_2	DRI $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
10	0.69	1.39	1.39
25	0.84	1.50	1.50
50	1.03	1.41	1.41
75	1.27	1.70	1.70
95	1.79	1.86	1.86

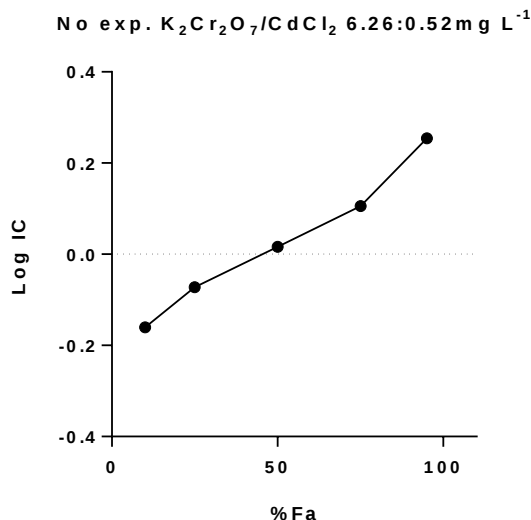
El antagonismo entre ambos compuestos metálicos es confirmado por la (Gráfica 5) donde se muestra claramente como la mayoría de los logaritmos de los índices de combinación de la curva están por encima del 0 (que es el logaritmo de 1), pero a medida que se incrementa el %Fa el antagonismo entre los compuestos cambia a sinergismo, debido a que los índices combinación se encuentran por debajo del 0 (que es el logaritmo de 1)

Mientras tanto se puede observar que los resultados no experimentales (Gráfica 6), obtenidos en la mezcla de ambos de metales muestran una diferencia significativa, debido a que la respuesta sería sinérgica en los primeros %Fa, es decir a que los valores de Índice de combinación se encuentran por debajo de 0 (que es el logaritmo de 1), y a medida que

incrementa el %Fa el índice de combinación cambia a un antagonismo entre ambos metales.

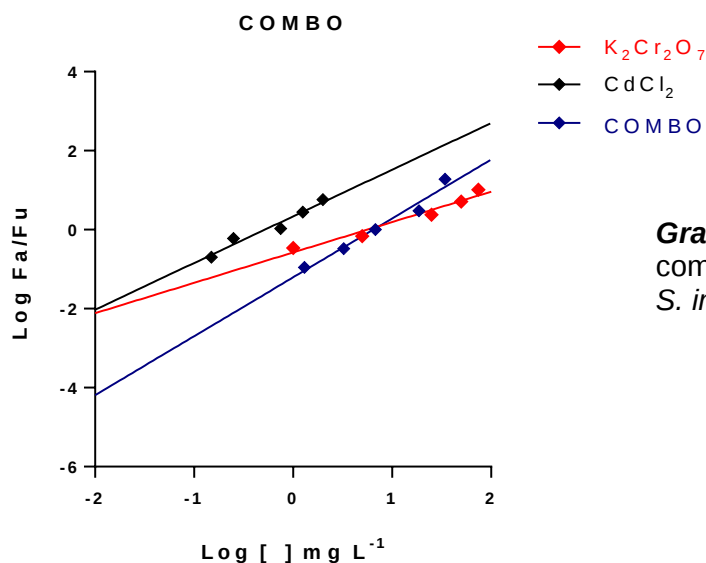


Gráfica. 5 Índice de combinación experimental $\text{CdCl}_2 / \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre *S. intermedius*



Gráfica. 4 Índice de combinación no experimental $\text{CdCl}_2 / \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre *S. intermedius*

En la Gráfica 6 se tiene que en las rectas del CdCl_2 y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ de forma individual se observa como el CdCl_2 tiene forma sigmoidea ($m > 1$) mientras el cromo muestra una sigmoidea plana ($m < 1$), la de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ mucho más inclinada con respecto a la del CdCl_2 lo cual muestra más toxicidad.



Gráfica. 6 Efecto medio de la combinación del $\text{CdCl}_2 / \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ sobre *S. intermedius*

En la Tabla 11 se presentan los parámetros del $\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ tanto en forma individual como en mezcla, dando una respuesta antagónica con un Cl_{50} (96) de 6.44 mg L^{-1}

Tabla 11. Parámetros en el índice de combinación de $\text{CdCl}_2/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Parámetro	CdCl_2	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Combo
$\text{Cl}_{50} (\text{mg L}^{-1})$	0.51	5.54	6.44
R	0.97	0.97	0.98
M	1.16	0.75	1.49
IC	-	-	2.03

En resumen, se puede decir que la mezcla de ambos agentes resultó en una respuesta antagónica –sinérgica ($\text{IC} < 1$ y > 1), donde conforme aumenta la concentración se observa un cambio a sinergismo en ambos compuestos como se muestra en la Gráfica 5 y Tabla 11.

8. DISCUSIÓN

La contaminación de ríos y lagos repercute de forma vital en plantas y animales acuáticos. En los últimos años se ha prestado gran atención a los contaminantes primarios del agua donde se encuentran los metales pesados, debido al efecto persistente y bioacumulable a largo plazo de estos contaminantes sobre el ambiente y la salud humana. Y es que, debido a su origen natural y a su uso milenario como materias primas, los metales pesados no fueron considerados contaminantes peligrosos sino hasta la segunda mitad del siglo XX. El trágico e histórico accidente de contaminación con mercurio en la bahía de Minamata, Japón, modificó radicalmente las ideas vigentes sobre las repercusiones de la contaminación por metales pesados y sobre la contaminación ambiental en general. De esta manera, en las últimas cinco décadas, los metales pesados se han convertido en contaminantes ambientales de primera importancia, principalmente por el incremento y la diversificación de los procesos industriales, así como por el uso masivo de combustibles fósiles y su incorporación en muchos artículos domésticos. La Agencia de Protección del Medio Ambiente 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., 2008).

8.1 RESPUESTA INDIVIDUAL

El valor de la Cl_{50} para el cloruro de cadmio (II) obtenido en este estudio fue de 0.522 mg L^{-1} en la microalga *Scenedesmus intermedium* a 96 h. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos por Romero et al (2002), los cuales investigaron sobre *Tretraselmis* sp. Demostró que existen diferencias considerables ya que su valor obtenido de la Cl_{50} fue de 0.63 mg L^{-1} a 96 h. La similitud puede deberse a que, a pesar de ser dos ecosistemas distintos, ambos se comportaron de manera similar en presencia del cloruro de cadmio.

Los criterios de calidad ambiental deben tener en consideración la tolerancia de las especies sensibles, así como de las especies resistentes, a fin de proteger la mayor proporción de la comunidad acuática (Cardwell et al., 1999).

En tal sentido, es necesario conocer la variabilidad y comparar la sensibilidad de especies pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos y niveles tróficos, por ejemplo en trabajos

realizados por Sánchez (2001) con cadmio usando diferentes especies acuáticas, permitió establecer una ordenación según la sensibilidad al cadmio de mayor a menor: *Selenastrum capricornutum* (microalga) > *Emerita analoga* (crustáceo) > *Chaetoceros gracilis* (microalga) > *Odontesthes regia regia* (pez) > *Skeletonema costatum* (microalga) > *Argopecten purpuratus* (molusco) > *Jordanella floridae* (pez) > *Platichthys flesus* (pez) (Sánchez, G. & G. Vera. 2001).

Otro estudio realizado por Romero et al, (2002) en la microalga *Chaetoceros sp.* mostrarán una CI_{50} de 0.56 mg L^{-1} a 96 h. Donde se observa una similitud significativa con la IC_{50} obtenida en *Scedesmus intermedius*.

La exposición de cadmio a concentraciones menores, sugiere el establecimiento de adaptaciones fisiológicas de las células a las condiciones ambientales, probablemente por mecanismos metabólicos de restricción de la reproducción o división celular. Estos resultados coinciden con los reportados por Sathya y Balakrishnam (1988), quienes mostraron que *Chlorella pyrenoidosa*, detiene su crecimiento en exposición a $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd

De acuerdo a Cordero et al. (2005) el efecto del Cd en *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) a 48 h a concentraciones menores de 0.1 mg L^{-1} producen un comportamiento como micronutriente, aunque este metal no ha sido establecido como micronutriente, estudios recientes (Cullen et al. 1999; Sunda y Huntsman 2000) han considerado que puede actuar como tal cuando se encuentra en concentraciones trazas y existe limitación de algunos micronutriente esenciales; situación que probablemente fue establecida en los cultivos ensayados, ya que el bioensayo se estableció con cultivos en una fase logarítmica avanzada, donde gran parte de los elementos trazas del medio de cultivo, probablemente se encontraban consumidos. Estos resultados, con respecto al Cd, son acordes con Romero (1999), quien en un estudio realizado con *Tetraselmis sp.* y *Chaetoceros sp.* encontró que la disminución del crecimiento poblacional de estas microalgas ante el Cd se manifiesta a partir de concentraciones superiores a 4.0 mg L^{-1} (Cordero et al, 2005)

En referencia a Vera (2009) el efecto del cadmio en el crecimiento poblacional de la microalga (Diatomea) *Chaetoceros gracilis* produjo un efecto inhibitorio del 20% al 99% con una CI_{50} de 0.591 mg L^{-1} .

Tabla 12 IC₅₀ con Cadmio en diferentes especies

Concentración	Forma del cobre utilizada	Especies	Referencias
0.63 mg L ⁻¹ (96h)	Cd ⁺²	<i>Tetraselmis sp.</i>	(Romero et al., 2002)
0.56 mg L ⁻¹ (96h)		<i>Chaetoceros sp.</i>	(Romero et al., 2002)
5,44 mg L ⁻¹ (48h)	CdCl ₂	<i>Tetraselmis chuii</i>	(Cordero et al., 2005)
0.591 mg L ⁻¹ (120 h)	CdCl ₂	<i>diatomea</i> <i>Chaetoceros</i> <i>gracilis</i>	(Marina, 2009)

Las diferencias de sensibilidad al cadmio entre las diferentes especies de microalgas, dependerían de las características de la pared y membrana celular (e. g. permeabilidad), de los mecanismos de detoxificación (e.g. almacén en cuerpos polifosfato), de la gravedad de la acción tóxica (e. g. bloqueo de enzimas, deformación de tilacoides y mitocondria) y del grado de bioconcentración (Vymazal, 1987).

Las microalgas expuestas al cadmio y bajo estrés provocado por éste, exhiben una diversidad de estrategias para mitigar los efectos adversos del metal (Zouari et al., 2016). Precisamente, existe información previa sobre la aparición de varios géneros de microalgas (*Stigeoclonium*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* y *Scenedesmus*), resistentes a la exposición de distintos metales de carácter tóxico (ej. Cd, Pb, Cr) (Nishikawa & Tominaga, 2001; Pawlik-Skowrońska, 2001; Rehman & Shakoori, 2001; Baos et al., 2002; Lavoie et al., 2014). En otros estudios, se evaluó la sensibilidad de *Dictyosphaerium chlrelloides* por exposición al cromo como Cr(VI), evidenciando una destrucción masiva celular en la mayoría de la población, no obstante, se encontraron algunas cepas variantes resistentes con viabilidad a los ambientes contaminados con Cr(III) (Sánchez-Fortún et al., 2009; D'ors et al., 2010; Pereira et al., 2014). Dentro de los mecanismos básicos que se inducen por la exposición al Cd, se presenta la quelación intracelular a través de polipéptidos como las Metalotioneínas de clase III (Mt[III])

Procedimientos de pruebas estándar para conducir pruebas de toxicidad con microalgas marinas han sido publicados por numerosas organizaciones como la Agencia de Protección

Ambiental (USEPA, 1978), la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1995), la Sociedad Americana para la Evaluación de Materiales (ASTM, 1990) y la Organización Internacional para la Cooperación Económica y Desarrollo (OECD, 1984). Con estos métodos estándares, que son muy similares, se determina el efecto tóxico en un crecimiento algal rápido en un medio enriquecido en nutrientes por 3-4 días (Lewis, 1993).

El valor de la LC_{50} para el dicromato de potasio (IV) obtenido en este estudio fue de 6.64 mg L^{-1} en la microalga *Scenedesmus Intermedius* a 96 h. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos por Alayo, Iannacone & Arrascue (2004) en la microalga *Isochrysis galbana* Parke mostraron un valor de 11.94 mg L^{-1} en 96 h. lo que muestra una diferencia significativa en los valores. Esto puede deberse al entorno y los parámetros establecidos en dicho bioensayo en el cual se tuvo una variación en el pH y temperatura, no obstante, no debe despreciarse la variación de especie en las microalgas.

Mientras que un estudio realizado por Alayo et al, (2004) en la microalga *Chaetoceros gracilis* Schütt mostraron una CI_{50} de 12.17 mg L^{-1} a 96 h. Donde se observa una concentración distante a la obtenida en este estudio que pudiera ser debido a las diferencias en géneros de microalgas y su ecosistema, no obstante el mecanismo de Cr pudiera ser similar.

Tabla 13 IC_{50} a 96 hrs en Cobre sobre diferentes especies acuáticas

Concentración	Forma del cobre utilizada	Especies	Referencias
11.94 mg L^{-1} (96h)	$K_2Cr_2O_7$	<i>Isochrysis galbana</i> Parke	(Alayo, Iannacone, & Arrascue, 2004)
12.17 mg L^{-1} (96h)	$K_2Cr_2O_7$	<i>Chaetoceros gracilis</i> Schütt	(Alayo et al., 2004)

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, reacciones redox causadas por exudados o enzimas) y de la duración de la exposición (Chen et al., 2003; Pinto et al., 2003; Zayed & Ferry, 2003).

La microalga *Euglena gracilis* Klebs es considerada como un modelo intermedio entre los sistemas bacteriales y los modelos animales; se ha observado que el cromo no produce un

efecto mutagénico, pero provoca efectos adversos en la curva de crecimiento microalgal (Gajdosova & Reichrtova, 1996). Wong & Chang (1991) indican que el Cr provoca efectos en el crecimiento, la fotosíntesis y en la síntesis de clorofila a del alga *Chlorella protothecoides* Krüg (*C. pyrenoidosa*), y que actúa sinérgicamente con el Cu y el Pb.

8.2 RESPUESTA EN MEZCLA

Al comparar los resultados obtenidos en las mezclas de dichos compuestos con otros autores se encontró escasas de información referente a la mezcla maneja en conjunto con el bioindicador *S. Intermedius*, no obstante, se realizó la comparación de mezclas que conlleven dichos compuestos.

La mezcla de cloruro de cadmio/dicromato de potasio presenta respuesta antagónica-sinérgica presentando así una CI_{50} (96) de 6.44 mg L^{-1} en la microalga *S. intermedius* y al comparar en la literatura con diferentes autores encontramos que la mezcla en el estudio Mo et al., (2016) La mezcla de Cd/Cr en *C. pyrenoidosa* presenta una respuesta sinérgica-antagónica con un CI_{50} de 4.32 mg L^{-1} a 96h, presentando una similitud en cuanto a los valores pero diferenciándose en cuanto a la respuesta obtenida, mientras que con *S. capricornutum* aunque presenta un efecto sinérgico con una CI_{50} de 3.77 mg L^{-1} a 96h no existe una similitud significativa a la obtenida en este estudio que se realizó además que la respuesta es puramente sinérgica lo contrario a la obtenida en el estudio, esto puede deberse a las concentraciones usadas en dichas mezclas o a la diferencia entre los bioindicadores.

Comparando con otros autores la mezcla de cadmio/cobre de acuerdo a Barahona Mercy A. et al. 2007, tenemos una CI_{50} de 0.005 mg L^{-1} a 24h en *Daphnia magna*, lo que muestra una diferencia altamente significativa a la obtenida en este estudio, esto puede deberse a la diferencia en los bioindicadores usados (fitoplancton- zooplacton), a la interacción entre la mezcla de los metales, o las condiciones presentadas

Mientras que de acuerdo a Barahona Mercy A. et al. 2007 la mezcla de Cd/Zn muestra una CI_{50} de 2.09 mg L^{-1} a 24h en *D. magna*, donde se observa una similitud en relación con la mezcla de Cd/Cr realizada en este estudio, lo que puede deberse a los mecanismos de acción que presentan los metales o a la interacción generada por la mezcla.

De acuerdo con Iannacone J. & Salazar N. 2007, en la mezcla de Cd/ Hg se obtuvo una CL₅₀ de 0.16 mg L⁻¹ a 48h con un efecto antagónico en larvas de *C. calligraphus*, mientras que la mezcla de Pb/Cd se obtuvo una respuesta sinérgica con un Cl₅₀ 11.80 mg L⁻¹. Observándose que los porcentajes de mortalidad de *C. calligraphus* se incrementaron con el aumento de la concentración binaria de metales pesados.

Concentración	Forma del cobre utilizada	Especies	Respuesta	Referencias
6.44 mg L ⁻¹ (96h)	CdCl ₂ /K ₂ Cr ₂ O ₇	<i>Scenedesmus intermedius</i>	Antagónica-sinérgica	
3.77 mg L ⁻¹ (96h)	Cd/Cr	<i>S. capricornutum</i>	sinérgico	Mo et al., (2016)
4.32 mg L ⁻¹ (96h)	Cd/Cr	<i>C. pyrenoidosa</i>	Sinérgico - antagónica	Mo et al., (2016)
2.09 mg L ⁻¹ (24h)	Cd/Cu	<i>Daphnia magna</i>	Antagónica -sinérgica	Barahona Mercy A. et al. 2007
0.005 mg L ⁻¹ (24h)	Cd/Zn	<i>Daphnia magna</i>	Antagónica -sinérgica	Barahona Mercy A. et al. 2007
0.16 mg L ⁻¹ (48h)	Cd/Hg	<i>C. calligraphus</i>	Sinérgico	Iannacone J. & Salazar N. 2007
11.80 mg L ⁻¹ (48h)	Pb/Cd	<i>C. calligraphus</i>	Antagónica	Iannacone J. & Salazar N. 2007

En este contexto, los metales tóxicos al afectar a las comunidades planctónicas, provocando alteraciones en la fotosíntesis, crecimiento, inhibición de la actividad enzimática y la respiración (Yan & Pan, 2002). En general, los niveles elevados de metales inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); por tanto, como respuesta a ese estrés, la célula presenta mecanismos antioxidantes enzimáticos que incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y sistemas no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), ascorbato y compuestos fenólicos (Xu et al., 2010). De acuerdo con Macfie & Welbourn (2014), entre los mecanismos principales que presentan las células fotosintéticas para mantener las concentraciones de iones metálicos libres en niveles que no superen las necesidades celulares se incluyen: (1) unión en la pared celular,

(2) cambios en la permeabilidad de iones, (3) exclusión activa (ej. sistemas de eflujo), (4) biotransformación. (Belfiore & Anderson, 2001; Cortés-Téllez, A. et al. 2017).

Los ensayos con estas microalgas son fácilmente reproducibles y de bajo costo, pudiéndose llevar a cabo en un laboratorio de escasos recursos económicos. Este bioensayo puede usarse como una herramienta alternativa para el monitoreo ambiental de rutina (Lewis, 1993).

También se debe destacar que algunos microorganismos toman metales pesados del medio ambiente, siendo capaces de concentrar y acumular grandes cantidades de ellos en diferentes estructuras citoplasmáticas, sin que lleguen a ocasionarles efectos tóxicos. Las microalgas son un ejemplo de este comportamiento, ya que tienen afinidad por los metales polivalentes, de ahí, la posibilidad de su aplicación como agentes descontaminantes en aguas que contengan iones metálicos en disolución como método alternativo cuando es eficaz su empleo como método de recuperación y/o la eliminación de cromo y cadmio presentes en aguas residuales galvánicas, empleando un reactor con un cultivo de *Scenedesmus obliquus* inmovilizado. Se ha obtenido una eficiencia de eliminación de Cr(III) del 92.40 y del 95 % para el Cd(II). El rápido ascenso experimentado en el pH tuvo un efecto importante sobre la forma de eliminación del metal por la microalga *Scenedesmus obliquus*. De esta manera, se logra recuperar del 83 al 85 % de la masa de los iones metálicos presentes en el agua residual tratada. La temperatura del agua residual se mantuvo entre 22.5 y 34 C, condición óptima para el buen desarrollo del *Scenedesmus obliquus*, así como del proceso de eliminación de esos metales pesados (Pellón, Frades, Chacón, Pérez, & Oña, 2004)

9. CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que la mezcla de cloruro de cadmio y dicromato de potasio a altas concentraciones en el medio acuáticos pueden causar efectos tóxicos sobre *S.intermedius*, presentando mayor toxicidad en mezcla que en su forma individual, debido que al encontrarse los dos agentes en forma de mezcla su efecto se vuelve sinérgico aumentando su toxicidad; Por esta razón, la exclusiva determinación y medición de los agentes tóxicos o componentes de los residuos peligrosos por separado no es idónea, y precisa también de estudios de mezclas para obtener resultados más representativos del efecto toxico de los contaminantes.

9. RECOMENDACIONES

La predicción de los efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, requiere de la consideración de las mezclas de los agentes químicos contaminantes. Para así poder establecer normativas que eviten el daño en los medios acuáticos.

Debido a que el Cr es un elemento traza no se le considera un elemento dichamente tóxico, pero como se ha demostrado a bajas concentraciones presenta un efecto negativo por lo que sería necesario realizar estudios en organismos superiores para así estipular los efectos tóxicos que tiene a lo largo de la cadena trófica.

REFERENCES

- 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.
- Akgül, F. (2017). Morphological and Molecular Characterization of Scenedesmus-Like Species from Ergene River Basin (Thrace, Turkey), 10.
- Alayo, M., Iannacone, J., & Arrascue, A. (2004). Sensibilidad al cromo: microbiopruebas con las diatomeas marinas *Isochrysis galbana* Parke y *Chaetoceros gracilis* Schütt. *Ecología Aplicada*, 3(1-2), 154-161. Recuperado de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1726-22162004000100022&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Aldecoa, J. J. (s. f.). Contaminación de Metales Pesados y Efectos Biotóxicos Humanos, 11.
- Alloway, B., & Ayres, D. (1993). *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Nueva York, 291 p: Blackie Academic and Professional.
- Anatolievich, Kiper Ruslan (Consultado el 25 de junio de 2014.) Cadmium chloride. chemister.ru, ed.
- Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., & Ivanov, K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and products*, 19: 197–205.
- Bagchi D, Balmoori J, Bagchi M, (2002). Comparative effect of TCDD, endrin, naphthalene and chromium (VI) on oxidative stress and tissue damage in the liver and brain tissues of mice. *Toxicology* 175:73-82.
- Berg Jm, JI Tymoczko, L Stryer. (2002). *Biochemistry*. Fifth Edition. W.H. Freeman. New York, 1050 pp.

- Blankenship LJ, Carlisle DL, Wise JP, (1997). Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: Differential effects of vitamins C and E on genotoxicity and survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 146:270-280.
- Botello, A. V. (2005). *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. Univ. J. Autónoma de Tabasco.
- Bridges, C. C., & Zalups, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 274-308.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.09.007>
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S. & Curie, C. (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem. J.*, 422(2), 217–228. DOI: 10.1042/BJ20090655.
- Capellmann M, Mikalsen A, Hindrum M, (1995). Influence of reducing compounds on the formation of DNA-protein cross-links in HL-60 cells induced by hexavalent chromium. *Carcinogenesis* 16(5):1135-1139.
- Cardwell, R. D.; M. S. Brancato; J. Toll; D. DeForest and L. Tear. (1999). Aquatic ecological risks posed by tributyltin in United States surface waters: pre-1989 to 1996 data. *Env. Tox. Chem.* 18:567-577
- Chen F, Shi X. (2002). Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit Rev Oncol Hematol* 42(1):105-121.
- Chen F, Ye J, Zhang X, et al. (1999). One-electron reduction of chromium (VI) by α -lipoic acid and related hydroxyl radical generation, dG hydroxylation and nuclear transcription factor- κ B activation. *Arch Biochem Biophys* 338(2):165-172.
- Chen H., Pan G., Yan H. & Qin Y. (2003). Toxic effects of hexavalent chromium on the growth of the bluegreen microalgae [Artículo en chino]. *Huan Jing Ke Xue*. 24: 13-18.
- Chmielowska-Bak, J., Izbiańska, K., & Deckert, J. (2013). The toxic Doppelganger: On the ionic and molecular mimicry of cadmium. *Acta Biochimica Polonica*, 60(3), 369-374.
- Chou, T. C., & Martin, N. (2005). *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug*

- Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values. NJ: ComboSyn, Paramus.
- Chou, T., & Martin, N. (2010). Compusyn for Drug Combinations. PC software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations and the Determination of IC50, ED50 and LC50 Values. Combosyn Paramuts, NJ.
- Chou, T.-C., & Talalay, P. (1983). Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, 4, 450-454. doi:10.1016/0165-6147(83)90490-X.
- Chou, T.-C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 27-55. doi:10.1016/0065-2571(84)90007-4
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 325-330. <https://doi.org/10.15517/rbt.v53i3-4.14408>
- Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 325-330. <https://doi.org/10.15517/rbt.v53i3-4.14408>
- Costa M, Klein C. 2006a. Response to comments by Post and Stern on article "Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans". (Comment on: 36(2):155-163). *Crit Rev Toxicol* 36(9):779.
- Costa M. 2003. Potential hazards of hexavalent chromate in our drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol* 188(1):1-5.
- Cuberos, E., Rodriguez, A. I., & Prieto, E. (2009). Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11, 278-289. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642009000200012>

- Cullen, J., T. Lane, F. Morel & A. Sherrel. (1999). Modulation of Cd uptake in phytoplankton by seawater CO₂ concentration. *Nature* 402: 165-166.
- Dayan A.D., Paine A.J., (2001) Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity. *Hum Exp Toxicol* 20:439.
- Díaz-Báez, M.C., Cruz, L.E., Rodríguez, D., Pérez, W.J. & Vargas, C.M., (2000), "Evaluation of Three Water Concentration Techniques as a Prior Step to Test Acute Toxicity", *Environ. Toxicol.*, 15:345-351
- Ding M, Shi X. (2002). Molecular mechanisms of Cr (VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 234/235:293-300.
- FAO. (1981). Bases para la elección de ensayos biológicos para evaluar la contaminación marina. Manual de métodos de investigación del medio ambiente acuático. Parte 4a FAO, Doc. Tec. Pesca. (164): 34pp.
- Faroon, O., Ashizawa, A., Wright, S., Tucker, P., Jenkins, K., Ingerman, L. & Rudisill, C. (2012). Toxicological Profile for Cadmium, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological Profiles. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), Atlanta (GA).
- Ferenandez J. (2014). Microalgal Biotechnology. Universidad de Almería
- Finney, D. (1971). L. Probit Analysis (tercera A ed.). Londres: Cambridge University Press.
- Förstner, U., & Wittman, T. (1979). *Metall Pollution in the aquatic Environment*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 486 S., 102 Abb., 94 Tab.
- Förstner, U., & Wittmann, G. T. W. (2012). *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer Science & Business Media.
- Fotovat, A. & Naidu, R. (1998). Changes in composition of soil aqueous phase influence chemistry of indigenous heavy metals in alkaline sodic and acidic soils. *Geoderma*, 84(1-3), 213–234. DOI: 10.1016/S0016-7061(97)00130-4.
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Markich, S.J. & Lim, R.P. (2000). pHdependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.*, 48(2), 275–289.

- Gajdosova J. & Reichrtova E. (1996). Different growth response of *Euglena gracilis* to Hg, Cd, Cr and Ni compounds. *Analysis and Bioanalysis Chemistry*. 354: 641-642.
- Gallego, R. S. (2003). *Introducción al análisis de datos experimentales: tratamiento de datos en bioensayos*. Publicacions de la Universitat Jaume I.
- García, P. E. P., & Cruz, M. I. A. (2012). Los efectos del cadmio en la salud. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 17(3), 199-205.
- Geroge C., J Viña., G Ramírez, AY Mojica, JI. (1991). Manual de métodos de monitoreo biológico con aplicación en la industria del petróleo (Componente acuático). ECOPETROL, Bogotá. 1370 (Mecanografiado).
- Gupta, D.K. & Sandalio, L.M. (2012). Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 275. DOI: 10.1007/978-3-642- 22081-4
- Ha L, Ceryak S, Patierno SR. (2004). Generation of S phase-dependent DNA double-strand breaks by Cr (VI) exposure: Involvement of ATM in Cr (VI) induction of gamma-H2AX. *Carcinogenesis* 25(11):2265-2274.
- Henry, L. (1988). Recomendaciones concernientes a la selección de organismos para bioensayos acuáticos. Revisado en www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/publica/orimuest/omnax51html.
- Hojo Y, Nishiguchi K, Kawazoe S, (2000). Enhancement of lipid peroxidation by chromium (IV) and chromium (V) is remarkable compared to that by chromium (VI) and is effectively suppressed by scavengers of reactive oxygen species. *J Health Sci* 46(2):75-80.
- Hojo Y, Satomi Y. (1991). *In vivo* nephrotoxicity induced in mice by chromium (VI): Involvement of glutathione and chromium (V). *Biol Trace Elem Res* 31:21-31.
- Huovinen, P., & Gómez, I. (2017). Hacia el desarrollo de microbioensayos, 3.
- Ishikawa Y, Nakagawa K, Satoh Y, et al. (1994a). Characteristics of chromate workers' cancers, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: An autopsy study. *Br J Cancer* 70(1):160-166.

- Ishikawa Y, Nakagawa K, Satoh Y, et al. (1994b). "Hot spots" of chromium accumulation at bifurcations of chromate workers' bronchi. *Cancer Res* 54(9):2342-2346.
- Israel A. (1995). Determinación de producción primaria en macroalgas marinas. En: Alveal K, ME Ferrario, EC Oliveira & E Sar (eds) *Manual de Métodos Ficológicos*: 397-416. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Ize I., Zuk M. y Bracho Rojas L. (2010). Introducción al análisis de riesgos ambientales. 2a edición. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F., México, 219 pp.
- J. Aiyar, HJ. Berkovits, RA Floyd, KE. Wetterhahn 1991. Reaction of chromium (VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: Identification of reactive intermediates and their role in chromium (VI)-induced DNA damage. *Environ Health Perspect* 92:53-62. <https://doi.org/10.1289/ehp.919253>
- J. Iannacone & N. Salazar. (2007) efecto de mezclas binarias de tres metales pesados sobre larvas de *Chironomus calligraphus*. Laboratorio De Invertebrados, Facultad De Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma (URP), Lima, Perú.
- Jaramillo J., F. (2008). *Toxicología ambiental*. Aguascalientes, Mx.: Universidad Autonoma de Aguascalientes.
- Jeejeebhoy KN, RC Chu, EB Marliss, (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 30:531-538.
- Jiménez, B. E. (2001). *La Contaminación Ambiental en México*. Editorial Limusa.
- Jordan , C. (1998). Working with Nature: Resource Management for Sustainability. *Harwood Academic. The Netherlands.*, 171pp.
- Kim G, Yurkow EJ. (1996). Chromium induces a persistent activation of mitogen-activated protein kinases by a redox-sensitive mechanism in H4 rat hepatoma cells. *Cancer Res* 56:2045-2051.
- Lenntech. (2004). *Water Treatment and air purification*. Rotterdamseweg, Netherlands: Lenntech (www.excelwater.com/thp/filters/WaterPurification.htm).

- Levina A, Lay PA. (2005). Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev* 249(3-4):281-298.
- Lewis M.A. (1993). Freshwater primary producers. En: *Handbook of Ecotoxicology*. Calow, P. (ed.). Blackwell Scientific Publ. U.K.: 28-51
- Lin X, Zhuang Z, Costa M. (1992). Analysis of residual amino acid-DNA crosslinks induced in intact cells by nickel and chromium compounds. *Carcinogenesis* 3(10):1763-1768.
- Liu KJ, Shi X, Dalal NS. (1997). Synthesis of Cr (IV)-GSH, its identification and its free hydroxyl radical generation: A model compound for Cr (VI) carcinogenicity. *Biochem Biophys Res Commun* 235:54-58.
- Liu KJ, Shi X. (2001). *In vivo* reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222:41-47.
- LOBBAN CS & PJ HARRISON. (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. New York. 366 pp.
- Lucho, C., Alvarez , M., Beltran, R., Prieto, F., & Poggi , H. (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractionation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. *Environmental International* , On Line: 01604120-D 2004 doi:10.1016/j.envint.2004.08.002. .
- LÜNING K. (1990). *Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology*. John Wiley & Sons Inc. New York, 527 pp.
- Luo H, Lu Y, Shi X, (1996). Chromium (IV)-mediated Fenton-like reaction causes DNA damage: Implication to genotoxicity of chromate. *Ann Clin Lab Sci* 26(2):185-191.
- M, J. T., Roxs, M. C., & Gaitán, A. M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(1), 50-61. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/43297>

- M.L, T. (1999). Cont. Toxicol. In C. P. Topalián M.L., *Principal component analysis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista River* (pp. 63, 484.). Buenos Aires, Argentina: Bull. Environ.
- Macfie, S.M. & Welbourn, P.M. (2014). The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39(4), 413–419. DOI: 10.1007/s002440010122.
- Mao Y, Zang L, Shi X. (1995). Generation of free radicals by Cr (IV) from lipid hydroperoxides and its inhibition by chelators. *Biochem Mol Biol Int* 36(2):327-337.
- Marina, D. (2009). Efecto del Cadmio sobre la Diatomea Marina Efecto del Cadmio sobre la Diatomea Marina.
- Marina, D. (2009). Efecto del Cadmio sobre la Diatomea Marina Efecto del Cadmio sobre la Diatomea Marina.
- Martí, M. C. (2015). Procesos tóxicos ambientales de los metales pesados. In M. C. Martí, J. M. Mateo, M. J. Baselga, M. T. Moya, & M. d. Bartolome, *Procesos tóxicos ambientales de los metales pesados y metaloides en poblaciones humanas* (p. p:51). Madrid, España: Universidad internacional SEK.
- Mason, C.F. (1984). *Biología de la contaminación del agua dulce*. Editorial Alhambra, 1ª. Edición en español, Madrid 289p.
- Mera, R., Torres, E. & Abalde, J. (2016). Influence of sulphate on the reduction of cadmium toxicity in the microalga *Chlamydomonas moewusii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 128, 236–245. DOI:10.1016/j. ecoenv.2016.02.030
- 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>
- Molyneux MJ, Davies MJ. (1995). Direct evidence for hydroxyl radical-induced damage to nucleic acids by chromium (VI)-derived species: Implications for chromium carcinogenesis. *Carcinogenesis* 16(4):875-882.

- National Institute for Occupational Safety and Health. (2014, Julio 1). Potassium Dichromate.
- Nava-Ruíz, C., & Méndez-Armenta, M. (2011). Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio), 8.
- Neuzil, M. y W. Kovarik. (1996). Mass Media and Environmental Conflict: America's Green Cruzades. Sage Publications, Nueva York. 245 pp.
- Nordberg, G. (2011). PRODUCTOS QUÍMICOS. *metales: propiedades químicas y toxicidad*, 63.15- 63.18.
- Nyholm N, Peterson HG (1997) Laboratory bioassays with microalgae. En: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS (Eds), Plants for Environmental Studies. CRC Press. pp. 225-276. ISBN: 978-1-56670- 028-3.
- O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: Role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutat Res* 533(1-2):3-36.
- Paustenbach DJ, Finley BL, Mowat FS, (2003). Human health risk and exposure assessment of chromium (VI) in tap water. *J Toxicol Environ Health* a 66(14):1295-1339.
- Pellón, A., Frades, J., Chacón, A., Pérez, E., & Oña, A. (s. f.). Eliminación de cromo y cadmio mediante *Scenedesmus obliquus* en estado inmovilizado, 36(3), 6.
- Pinilla G.A (1998). *Indicadores biológicos en ecosistemas acuáticos continentales de Colombia: compilación bibliográfica*. Fundación universidad de Bogotá U. Jorge Tadeo Lozano
- Pinto E., Sigaud-Kutner T.C.S., Leitao M.A.S., Okamoto O.K., Morse D. & Colepiloco P. (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*. 39: 1008-1018. Podemski C.L. & Culp J.M. 2001.
- PNUMA (2012). Global chemicals outlook. Hacia una gestión racional de las sustancias químicas. Informe de síntesis para los responsables de la toma de decisiones. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Informe. Ginebra, Suiza, 44 pp

- Potassium Bichromate. (2016). Recuperado de cameochemicals.
- Potters, G. (2013). *Marine Pollution*. Bookboon.
- Public Broadcasting Service (PBS). 2001. Trade Secrets: A Moyers Report. Disponible en: <http://www.pbs.org/tradesecrets>. Consultado en diciembre 2006.
- Pulido MD, Parrish AR. (2003). Metal-induced apoptosis: Mechanisms. *Mutat Res* 533:227-241.
- Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=37963107>
- Ramírez, P. R., & Mendoza, A. C. (2008). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. México, D.F.: Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Instituto Nacional de Ecología.
- Reish, D. y Oshida, P. (1987). Manual of methods in aquatic environment research. Part 10 – Short-term static bioassays. FAO. Roma – Italia. 62 pp.
- REPETTO, M. y SANZ, P. Toxicología de los metales. En: M. REPETTO. Postgrado en Toxicología. 1 ed. Sevilla (España): Ilustre Colegio oficial de Químicos, 2012,192 p.
- Rocha, C., Cardoso, P., Cunha, L., Gomes, C., Júnior, R. R., Pinheiro, R. H., ... Burbano, R. (2015). Mutagenic Effects of Potassium Dichromate as Evaluated by Means of Animal and Plant Bioindicators. *In Vivo*, 29(6), 729-735. Recuperado de <http://iv.iiarjournals.org/content/29/6/729>
- Rodríguez, J. y Esclapés, M. (1995). Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP. PDVSA. Venezuela. 109pp.
- Romero, Y. (1999). Efecto del cadmio sobre las microalgas *Tetraselmis* sp. y *Chaetoceros* sp. Tesis de Licenciatura. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. 92 p.
- Romero, Y., Lodeiros, C., Esclapés, M., & Marín, N. (2002). Efecto Tóxico Del Cadmio Sobre Microalgas Aisladas Del Nororiente De Venezuela, 27, 7.

- Salnikow K, Zhitkovich A. (2008). Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* 21(1):28-44.
- Sánchez, G. y G. Vera. 2001. Manual introductorio de Ecotoxicología Acuática. Inf. Inst. Mar Perú. (161):40 pp.
- Sathya KS, Balakrishnam KP (1988) Physiology of phytoplankton in relation to metal concentration. Effect of cadmium on *Scenedesmus bijugatus* and *Nitzschia palea*. *Water Air. Soil. Poll.* 38: 283-297.
- Scenedesmus intermedius* Chodat :: Algaebase. (s. f.). Recuperado 7 de octubre de 2018, de http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=34726
- Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, (2002). Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34:1-7.
- Soft-Bodied Stream Algae of California: *Scenedesmus intermedius*. (s. f.). Recuperado 9 de octubre de 2018, de http://dbmuseblade.colorado.edu/DiatomTwo/sbsac_site/species.php?g=Scenedesmus&s=intermedius
- Spain, A. (2003). Implications Of Microbial Heavy Metals Tolerance in the Environment. *Reviews In Undergraduate Research*, 2:1-6. .
- Topollian, M. (1999). Analisis de componentes principales de metales pesados disueltos en agua del rio. In C. P. Topalián M.L., *Principal component analysis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista River* (pp. 484-490). Buenos aires, Argentina: Bull. Environ
- Tortorelli, M. y Hernández, D. 1995. Calidad de agua de un ambiente acuático sometido a efluentes contaminantes. *Ecosistemas de Aguas Continentales*.
- Trainor, F. R. (1998). Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae) - phenotypic plasticity, volume 117 of *Nova Hedwigia*. J. Cramer, Berlin.

- Tsou TC, Chen CL, Liu TY, et al. 1996. Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* 17(1):103-108
- US-EPA (1991) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms EPA- 600/4-90-027F y US EPA (1995).
- Vargas Marcos, F. (2005). La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Revista Española de Salud Pública*, 79, 117-127.
<https://doi.org/10.1590/S1135-57272005000200001>
- Vig, K. (2003). Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Adv. Environ. Res.*, 8(1), 121–135. DOI:10.1016/S1093-0191(02)00135-1.
- Vymazal, J. (1987). Toxicity and accumulation of cadmium with respect to algae and cyanobacteria: a review. *Toxicity assessment: an international quarterly*. 2: 398-415.
- Wiegand HJ, Ottenwalder H, Bolt HM. (1984). The reduction of chromium (VI) to chromium (III) by glutathione: An intracellular redox pathway in the metabolism of the carcinogen chromate. *Toxicology* 33:341-348.
- William M. Lewis, Jr and Endula Riehl (1982) Phytoplankton composition and morphology I lake Valencia Venezuela. Department of environmental, population and organismic Biology, University of Colorado, Boulder and Escuela de Biología, Universidad central de Venezuela, Caracas. <http://www.cires.colorado.edu/limnology/sites/default/files/.../Pub041.pdf>
- Wise SS, Holmes AL, Ketterer ME, (2004). Chromium is the proximate clastogenic species for lead chromate-induced clastogenicity in human bronchial cells. *Mutat Res* 560:79-89.
- Wong P.K. & Chang L. (1991). Effects of copper, chromium and nickel on the growth, photosynthesis and chlorophyll synthesis of *Chlorella pyrenoides*. *Environmental Pollution*. 72: 127-139.
- Xu J, Bubley GJ, Detrick B, (1996). Chromium (VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. *Carcinogenesis* 17(7):1511-1517.

- Xu, J., Tian, Y.-S., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Zhu, B., Hou, X.-L. & Yao, Q.-H. (2010). Cyanobacteria MT gene SmtA enhance zinc tolerance in Arabidopsis. *Mol. Biol. Rep.*, 37(2), 1105–1110. DOI: 10.1007/s11033-009-9867-x.
- Yan, H. & Pan, G. (2002). Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. *Chemosphere*, 49(5), 471–476. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00285-0.
- Yao H, Guo L, Jiang BH, (2008). Oxidative stress and chromium (VI) carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 27(2):77-88.
- Zhitkovich A, Voitkun V, Costa M. (1996). Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: Importance of trivalent chromium and the phosphate group. *Biochemistry* 35:7275-7282.
- Zhitkovich, A. (2011). Chromium in drinking water: Sources, metabolism, and cancer risks. *Chemical Research in Toxicology*, 24(10), 1617-1629. <https://doi.org/10.1021/tx200251t>